

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nađa Đ. Grozdanić Stanisavljević

**BIOLOŠKI ODGOVOR ODABRANIH TIPOVA  
ĆELIJA NA DELOVANJE EKSTRAKATA ALGI  
*Fucus spiralis* Linnaeus I *Fucus virsoides*  
J.Agardh *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nađa Đ. Grozdanić Stanisavljević

**BIOLOGICAL RESPONSES OF SELECTED  
CELL TYPES TO THE ACTIVITY OF *Fucus  
spiralis* Linnaeus AND *Fucus virsoides*  
J.Agardh ALGAE EXTRACTS *IN VITRO***

doctoral dissertation

Belgrade, 2020

**Sastav komisije za odbranu doktorske disertacije:**

Dr **Tatjana Stanojković**, naučni savetnik (mentor),

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Dr **Maja Čakić Milošević**, vanredni profesor (mentor),

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr **Marija Marin**, docent (član),

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr **Gordana Zdunić**, naučni savetnik (član),

Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

Dr **Vesna Mačić**, viši naučni saradnik (član),

Univerzitet Crne Gore, Institut za biologiju mora

Datum odbrane:

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije je urađen na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju uz pomoć multidisciplinarnog i internacionalnog tima sa Univerziteta "El Jadida", Maroko; Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Josif Pančić", Beograd; Instituta za biologiju mora, Kotor, Crna Gora; Univerziteta u Kragujevcu, Prirodno-matematičkog fakulteta; Univerziteta u Beogradu, Farmaceutskog fakulteta. Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja je omogućilo izradu ove disertacije u okviru projekta 175011 „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“, a zatim i projekata 46013, 173032 i 46001.*

*Želim da se zahvalim svima koji su učestvovali u mom dugom putovanju od upisivanja doktorskih studija, volontiranja u histološkoj laboratoriji, zaposlenju na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, do završetka pisanja doktorata. Želim da se zahvalim Dr Zorici Juranić, što je verovala u mene i omogućila mi da se zaposlim na projektu. Posebnu zahvalnost dugujem mentoru dr Tatjani Stanojković, koja me je odabrala da budem deo tima, davala nesebičnu podršku i imala puno strpljenja i razumevanja za mene tokom svih ovih godina rada u laboratoriji i na disertaciji.*

*Želela bih da se zahvalim profesorki dr Aleksandri Korać na pruženoj prilici, inspiraciji, razumevanju i podršci, zatim, dr Vesni Koko, kao i celoj katedri za Biologiju ćelija i tkiva, Biološkog fakulteta u Beogradu na odličnoj saradnji, a posebno mentoru dr Maji Čakić Milošević i članu komisije dr Mariji Marin, na posvećenosti i svim sugestijama vezanim za tekst ove disertacije. Takođe, želim da se zahvalim članovima komisije dr Gordani Zdunić, i dr Vesni Mačić koje su znatno doprinele izradi ove teze i dale značajne sugestije za konačan oblik moje disertacije. Zahvalnost dugujem i pokojnom dr Zoranu Kljajiću na nesebičnoj podršci i obezbeđivanju materijala za istraživanje. Hvala i dr Marijani Kosanić sa PMF-a Kragujevac na pomoći oko ispitivanja mikrobioloških efekata kao i dr Katarini Šavikin na pomoći oko pravljenja ekstrakata i frakcija. Zahvalila bih se i dr Samiri Etahiri i njenom timu, koji su mi obezbedili materijal iz Maroka, kao i dr Ivani Đuričić sa Farmaceutskog fakulteta na analizi sastava masnih kiselina.*

*Kad imate dobar tim, iz toga moraju proizaći dobri rezultati i ogromna podrška, a to je tim Eksperimentalnog odeljenja IORS-a i Laboratorije za modifikatore biološkog odgovora. Nakon svih ovih godina provedenih zajedno to nisu samo kolege, od kojih sam puno naučila, to su pravi prijatelji: dr Milica Nedeljković, dr Ivana Matić, dr Ana Damjanović Veličković, dr Marija Đorđić Crnogorac, dr Irina Besu Žižak, dr Željko Žižak, dr Nina Petrović, dr Jelena Milovanović i sve ostale koleginice i kolege sa instituta, malo je reći hvala! Nemoguće je ne pomeniti ni dr Anu Krivokuću, dr Katarinu Mirjačić, dr Tatjanu Srđić Rajić, dr Jelenu Grahovac, dr Milenu Čavić, dr Nevenku Gligorijević, dr Lanu Filipović i druge koje su uvek bile tu i za druženje i za poslovnu saradnju. Hvala puno i svim tehničarima sa odeljenja a pogotovo Tanji Petrović, na svesrdnoj pomoći.*

*Zahvaljujem se mojoj porodici i prijateljima na podršci i razumevanju.*

*Ovu disertaciju posvećujem mami, izuzetnoj ženi, Saši i Marku.*

# **Biološki odgovor odabranih tipova ćelija na delovanje ekstrakata algi *Fucus spiralis* Linnaeus i *Fucus virsoides* J.Agardh *in vitro***

## **Rezime**

Makroalge iz roda *Fucus* predstavljaju značajan izvor biološki vrednih komponenti jer su bogate kompleksnim polisaharidima, masnim kiselinama i polifenolima. Cilj ove studije je bio ispitivanje hemijskog sastava, *in vitro* antikancerskih, antioksidativnih, antidijabetičkih, antimikrobnih svojstava, dihlormetan-metanolnog ekstrakta i tri frakcije algi *F. spiralis* i *F. virsoides* kao i sezonskih varijacija u sastavu i aktivnosti između letnjih i jesenjih ekstrakata i frakcija alge *F. virsoides*.

Od osnovnog dihlormetan-metanolnog ekstrakta (1:1) su tečno - tečnom ekstrakcijom dobijene petroletarska, etilacetatna i n-butanolna frakcija. Određen je sadržaj masnih kiselina i ukupnih fenola. DPPH metodom je utvrđena antioksidativna sposobnost ekstrakata i frakcija. MTT testom ispitana je *in vitro* citotoksičnost ekstrakata i frakcija prema nizu kancerskih ćelijskih linija kao i prema normalnoj ćelijskoj liniji. Distribucija HeLa ćelija (adenokarcinom grlića materice) po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana ekstraktima i frakcijama, evaluirana je uz pomoć protočne citometrije. Analiziran je tip ćelijske smrti HeLa ćelija nakon primene ekstrakata i frakcija. Antimigracijski i antiangiogeni efekat ekstrakata i frakcija je ispitivan na humanim transformisanim endotelnim ćelijama umbilikalne vene EA.hy926. Ispitan je uticaj ekstrakata i frakcija na inhibiciju enzima  $\alpha$ -glukozidaza, i time je utvrđena antidijabetička aktivnost. Antimikrobni efekat ekstrakata i frakcija je ispitivan mikrodilucionom metodom.

Petroletarska frakcija vrste *F. spiralis* je imala najveći citotoksični efekat prema HeLa ćelijskoj liniji. Jesenji ekstrakt i frakcije vrste *F. virsoides* su ispoljili jači citotoksični efekat prema kancerskim ćelijskim linijama u poređenju sa letnjim uzorcima. Pokazana je i selektivnost ekstrakata i frakcija u odnosu na normalnu ćelijsku liniju. Rezultati su pokazali razliku u sadržaju masnih kiselina i ukupnih fenola i biološkoj aktivnosti ekstrakata i frakcija dobijenih iz vrste *F. virsoides* uzorkovanih tokom različitih sezona. Proapoptotska aktivnost prema HeLa ćelijama je bila izražena nakon tretmana etilacetatnim frakcijama letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* a zatim i vrste *F. spiralis*. Najizraženiji uticaj na zaustavljanje ćelijske migracije EA.hy926 ćelija je iskazala etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*. Sprečavanje formiranje mreže EA.hy926 ćelija je bilo pod uticajem osnovnih ekstrakata, petroletarske i etilacetane frakcije vrsta *F. spiralis* i jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*, dok je samo etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* iskazala *in vitro* antiangiogeno dejstvo. Svi ispitani ekstrakti i frakcije su inhibirali aktivnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Ekstrakti i frakcije obe vrste algi su iskazali antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost.

Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata i frakcija vrsta *F. spiralis* i *F. virsoides*, ukazuje na obećavajući antikancerski i farmakološki potencijal ovih jestivih makroalgi.

**Ključne reči:** antimikrobni efekat, antioksidativna aktivnost, angiogeneza *in vitro*, apoptoza, citotoksičnost, *Fucus spiralis*, *Fucus virsoides*, invazivnost, kancer, masne kiseline

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Eksperimentalna onkologija

# Biological responses of selected cell types to the activity of *Fucus spiralis* Linnaeus and *Fucus virsoides* J.Agardh algae extracts *in vitro*

## Abstract

Macroalgae from the *Fucus* genus are a valuable source of bioactive components as they are rich in complex polysaccharides, fatty acids, and polyphenols. This study aimed to investigate the chemical composition and *in vitro* anticancer, antimicrobial, antioxidative and antidiabetic activities of the dichloromethane-methanol extract and three fractions of the *Fucus spiralis* and *Fucus virsoides* as well as seasonal variations on algal composition and activity of summer and fall extracts and fractions of *Fucus virsoides*.

Fractions were made from dichloromethane-methanol (1:1) extract of algae using liquid - liquid extraction: petroleum-ether, ethyl-acetate n-butanol. Fatty acid and total phenolic content were obtained. DPPH method was used to determine the antioxidative capacity of extracts and fractions. Extract and fractions were screened for *in vitro* cytotoxicity by MTT assay against human cancer and normal human cell lines. Cell cycle distribution of the human cervical adenocarcinoma HeLa cells was evaluated using flow cytometry. The type of cell death of HeLa cells was evaluated after treatment with extracts and fractions. Antimigratory and antiangiogenic properties were investigated using scratch and tube formation assays against human endothelium derived permanent EA.hy926 cell line. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase assay was used to assess antidiabetic activity. The antimicrobial effect was tested using the microdilution method against bacterial and fungal strains.

Petroleum-ether fraction of *F. spiralis* exerted the highest cytotoxicity against HeLa cells. Fall extract and fractions of *F. virsoides* exerted stronger cytotoxic effect against cancer cell lines compared to summer extract and fractions. Cytotoxic activity towards cancer cells was selective compared to normal cells. The seasonal variation in content and biological activity of *F. virsoides* samples was detected. Results have shown differences in fatty acid and total phenolic content. Proapoptotic activity against HeLa cells was pronounced after treatment with ethyl-acetate fractions of *F. virsoides* summer sample followed by *F. spiralis*. Ethyl-acetate fraction of *F. spiralis* showed the best results in suppressing the migration of EA.hy926 cells. Extracts, petroleum-ether, ethyl-acetate of *F. spiralis*, and *F. virsoides* fall samples, as well as ethyl-acetate summer sample of *F. virsoides*, prevented tube formation of EA.hy926 cells. All tested extract and fractions inhibited  $\alpha$ -glucosidase enzymatic activity. Extract and fractions of both species exerted antioxidative and antimicrobial activities.

The investigation of biological activities of the extract and fractions obtained from *F. spiralis* and *F. virsoides* may suggest a promising anticancer and pharmacological potential of these edible macroalgae.

**Key words:** antimicrobial effect, antioxidative activity, angiogenesis *in vitro*, apoptosis, cytotoxic, *Fucus spiralis*, *Fucus virsoides*, invasion, cancer, fatty acids

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Experimental oncology

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Morske makroalge: rasprostranjenje i klasifikacija.....	1
1.2. Mrke alge.....	1
1.2.1. Klasifikacija mrkih algi .....	1
1.2.2. Rod <i>Fucus</i> .....	2
1.2.3. Vrsta <i>Fucus spiralis</i> .....	2
1.2.4. Vrsta <i>Fucus virsoides</i> .....	3
1.3. Hemijski sastav mrkih algi .....	3
1.3.1. Primarni metaboliti mrkih algi.....	4
1.3.2. Sekundarni metaboliti mrkih algi .....	5
1.4. Kancer .....	6
1.4.1. Ćelijski ciklus .....	8
1.4.2. Ćelijska smrt .....	10
1.4.3. Invazivnost i metastaziranje malignih ćelija.....	13
1.4.4. Angiogeneza .....	14
1.4.5. Antikancerski potencijal mrkih algi.....	14
1.4.6. Antioksidativna aktivnost mrkih algi.....	16
1.5. Dijabetes i enzim $\alpha$ -glukozidaza .....	16
1.5.1. Antidijabetička aktivnost mrkih algi .....	17
1.6. Infekcije i patogeni mikroorganizmi .....	18
1.6.1. Antimikrobna aktivnost mrkih algi.....	19
2. Ciljevi istraživanja .....	20
3. Materijal i metode .....	21
3.1. Prikupljanje materijala i priprema ekstrakata i frakcija .....	21
3.2. Određivanje sastava masnih kiselina.....	21
3.3. Određivanje ukupnih fenola .....	21
3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti .....	22
3.5. Ćelijske kulture i ispitivanje citotoksične aktivnosti.....	22
3.6. Analiza faza ćelijskog ciklusa .....	23

3.7. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti.....	23
3.8. <i>In vitro</i> ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju ćelijske migracije.....	24
3.9. Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju angiogeneze <i>in vitro</i> .....	24
3.10. Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju $\alpha$ -glukozidaze .....	24
3.11. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i frakcija .....	25
3.11.1. Mikroorganizmi i podloga .....	25
3.11.2. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) .....	25
4. Rezultati .....	26
4.1. Sadržaj masnih kiselina u petroletarskim frakcijama.....	26
4.2. Određivanje ukupnih fenola .....	27
4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti.....	29
4.4. Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata i frakcija.....	31
4.5. Analiza faza ćelijskog ciklusa .....	34
4.6. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti.....	40
4.7. <i>In vitro</i> ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju ćelijske migracije.....	44
4.8. Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju angiogeneze <i>in vitro</i> .....	47
4.9. Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju $\alpha$ -glukozidaze .....	50
4.10. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata i frakcija .....	52
4.11. Ispitivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata i frakcija.....	53
5. Diskusija.....	54
5.1. Hemijska karakterizacija i antioksidativna aktivnost ekstrakata i frakcija .....	54
5.2. Antikancerski potencijal ekstrakata i frakcija .....	56
5.3. Antidijabetički potencijal ekstrakata i frakcija.....	60
5.4. Antimikrobni potencijal ekstrakata i frakcija.....	61
6. Zaključci.....	63
7. Literatura.....	64
8. Prilozi.....	75



# 1. UVOD

## 1.1. Morske makroalge: rasprostranjenje i klasifikacija

Alge čine široko rasprostranjenu grupu nižih biljaka koje imaju značajnu ulogu u primarnoj produkciji organske materije. Alge najčešće nastanjuju vodena staništa ali se mogu naći i van vodene sredine. Stupnjevi morfološke organizacije algi mogu biti jednoćelijski, kapsalni, kolonijalni trihalni, sifonalni, sifokladalni i parenhimatični. Vegetativno telo algi se naziva talus, bez diferencijacije na koren, stablo i list. Alge u svojim ćelijama poseduju hlorofil, ali sem primarnog autotrofnog načina ishrane mogu biti i miksotrofi i sekundarni heterotrofi. Razmnožavanje se vrši vegetativno, bespolno pomoću spora i polno (Blaženčić, 2007; Lee, 2008)

Alge su veoma varijabilna grupa organizama različitog taksonomskog porekla koja se, u zavisnosti od toga koji kriterijum prihvatimo kao polaznu osnovu, može stratifikovati na više načina. Stoga ne čudi što je sistematika algi i dalje kontroverzna tema sa više predloženih podela i predmet je stalnih revizija. Alge se najbazičnije mogu podeliti na jednoćelijske, kolonijalne i višećelijske - makro alge. Ako se kao parameter podele uzme njihovo geografsko rasprostranjenje onda prvenstveno razlikujemo morske i slatkovodne alge (koje mogu biti bentosne, neustonske i planktonske); zatim aerofitne alge; zemljišne alge; alge snega i leda; termalne alge i alge izuzetno slanih voda (Blaženčić, 2007; Lee, 2008).

Shodno iznad navedenim kriterijumima, razlikujemo morske makroalge - višećelijske alge koje se mogu naći široko rasprostranjene u morima i okeanima od tropskih do polarnih regiona (Collins i sar., 2016). Brojni biotički i abiotički činioci imaju važan uticaj na njihovu fiziologiju i stvaranje metabolita koji im omogućavaju opstanak u datoj sredini (Collins i sar., 2016). Abiotički faktori sredine imaju velikog uticaja na diverzitet vrsta makroalgi, pogotovo na većim geografskim širinama, to jest u hladnijim morima, dok biološke interakcije imaju veći uticaj na diverzitet u tropima (Keith i sar., 2014). Do sada je opisano preko 10000 vrsta morskih makroalgi (Collins i sar., 2016).

Predstavnici morskih makroalgi se svrstavaju u dva razdela: Rhodophyta (crvene alge) i Chlorophyta (zelene alge), kao i jednu klasu koju čine Phaeophyceae (mrke alge) u okviru razdela Ochrophyta (Keith i sar., 2014).

Crvene alge su bentosne alge i mogu se naći u velikim dubinama. Centar diverziteta su topli mora. Od pigmenata sadrže hlorofil a i d, karotene, ksantofile, fikoeritrin i fikobilin (Keith i sar., 2014; Blaženčić, 2007). Zelene alge su široko rasprostranjene u priobalnom pojasu mora. Zelene alge od pigmenata sadrže hlorofil a i b, karotene, lutein, neoksantin, violaksantin, enteroksantin (Collins i sar., 2016; Blaženčić, 2007). Treba naglasiti da, iako sve morske makroalge spadaju u gore navedene tri grupe, oni uključuju i slatkovodne vrste.

## 1.2. Mrke alge

Mrke alge su složena grupa algi koju sačinjavaju višećelijski, makroskopski, pretežno morski predstavnici. Mrke alge uključuju oko 1500 vrsta čije se dimenzije kreću od veoma malih do dugih više desetina metara. Centri diverziteta mrkih algi su hladna mora. Sem u priobalju mogu se naći i na velikim dubinama, dok su neke vrste plutajuće. Njihova boja potiče od pigmenata hlorofila a i c, karotena i ksantofila (fukoksantin i flavoksantin) (Blaženčić, 2007; Keith i sar., 2014).

### 1.2.1. Klasifikacija mrkih algi

Klasifikacija mrkih algi je poslednjih godina pretrpela brojne izmene. Tako autori poput Gomez-Zavaglia i sar., Guiry, Keith i sar., u savremenoj klasifikaciji mrke alge svrstavaju u klasu Phaeophyceae u okviru razdela Ochrophyta (Gomez-Zavaglia i sar., 2019; Guiry, 2012; Keith i sar., 2014). Poreklo mrkih algi se dovodi u vezu sa zlatnim, silikatnim, žutozelenim i vatrenim algama.

Klasi Phaeophyceae pripada i red Fucales Alge reda Fucales predstavljaju izvor brojnih korisnih bioaktivnih jedinjenja. Smatraju se za potencijalno obećavajući izvor novih lekova za različite bolesti, uključujući kancer, što je poslednjih godina dovelo do porasta interesovanja za njihovo izučavanje (Lee, 2008; Dias i sar., 2012).

Pripadnici reda Fucales razmnožavaju se isključivo polnim putem, oogamijom. Polni organi su oogonije i anteridije koje se razvijaju u udubljenjima talusa koje se nazivaju skafidije. Ovi delovi talusa su najčešće zadebljali vršni delovi koji se zovu receptakulumi (Blaženčić, 2007).

Redu Fucales pripada i familija Fucaceae sa rodом *Fucus* (Guiry i Guiry, 2020).

### 1.2.2. Rod *Fucus*

Rod *Fucus* je rasprostranjen u morima severne hemisfere, u priobalnom pojasu. Alge su visine do jedan metar. Talus je dihotomo granat, žbunast i kožaste strukture, pričvršćen za podlogu pločastim delom kratkog kauloida. Po sredini talusa pruža se centralno rebro. Neke vrste imaju vršne delove u obliku mehura ispunjenih vazduhom. Na vrhu grana talusa, nalaze se receptakulumi sa osam jajnih ćelija u oogonijama i po 64 spermatozoida u anteridijama. *F. spiralis* je monetska vrsta. Razmnožavanje prati ritam plime i oseke, a oplodjenje se vrši u vodi. Zigot raste u diploidnu biljku - sporofit. Nema smene generacija, samo su gameti haploidni (Blaženčić, 2007; Lee, 2008).

Rod *Fucus* obuhvata tridesetak vrsta od kojih se neke koriste u industriji kao đubrivo, hrana za stoku i za dobijanje alginata (Blaženčić, 2007).

### 1.2.3. Vrsta *Fucus spiralis*

Vrsta *Fucus spiralis* pripada rodu *Fucus* (Slika 1). Nastanjuje litoralni pojas Evrope, severne Amerike i severne Afrike. Može se naći uz obale Atlantika u: Britaniji, Irskoj, Francuskoj, Španiji, Portugaliji, Maroku, Azorskim i Kanarskim ostrvima. Takođe prisutna je i u: Danskoj, Farskim ostrvima, Nemačkoj, Holandiji i Baltičkim državama (Guiry i Guiry, 2020). Specifični mikroklimatski uslovi na lokaciji Sidi Buzid na obali Maroka, koje čine jake i hladne okeanske struje doprinose da alge sa ove lokacije budu bogate jedinstvenim sekundarnim metabolitima (Oumaskour i sar., 2012). Analizom etanolnog ekstrakta vrste *F. spiralis* gasnom hromatografijom-masenom spektrometrijom (engl. *gas chromatography–mass spectrometry*, GC–MS), otkriveno je da ova vrsta algi sadrži floroglucinol, manitol, masne kiseline (palmitinsku, stearinsku,  $\alpha$ -lialeinsku, oleninsku, arahidonsku, eikozapentaensku, tetradekanonsku) i fukosterol (Andrade i sar., 2013).



**Slika 1.** Vrsta *Fucus spiralis* u prirodnom staništu. Preuzeto iz:

<http://www.freenatureimages.eu/Plants/Phaeophyceae%2C%20Bruinwieren%2C%20Brown%20algae/Fucus%20spiralis%2C%20Spiral%20Wrack/index.html#>

### 1.2.4. Vrsta *Fucus virsoides*

*Fucus virsoides* je endemična vrsta Jadranskog mora (Slika 2). Pripada rodu *Fucus*. Vrsta *F. virsoides* raste na čvrstom supstratu, načešće krečnjaku, u litoralnom pojasu. Talus je visine 2-22 cm, maslinasto-zelene boje, kožaste strukture. Proširenja u vidu mehura se javljaju samo nakon pražnjenja receptakuluma. Grananje je dihotomo, obično četiri do devet puta, a izgled podseća na lepezu ili busen. Ogranci imaju srednje rebro, nisu nazubljeni i pljosnati su (Blaženčić, 2007). Sem o morfološkom opisu i rasprostranjenju, nema mnogo podataka o hemijskom sastavu i bioaktivnim svojstvima ove vrste algi. Antikancerske i antidijabetičke aktivnosti vrste *F. virsoides* nisu do sada bile detaljno ispitivane.



**Slika 2.** Vrsta *Fucus virsoides* u prirodnom staništu. Preuzeto iz:

<https://www.pms-lj.si/si/koledar/2016/06/620-Morske-makroalge>

### 1.3. Hemijski sastav mrkih algi

Mrke alge su izuzetan izvor minerala (11-55% suvog ostatka u vidu pepela) i bioaktivnih jedinjenja: polisaharida (15-76% suve materije), proteina (1-50% suvog ostatka), lipida (0.3-5% suve mase), fitohormona, pigmenata, kao i sekundarnih metabolita (kao što su fenolna jedinjenja i terpenoidi) (Bedoux i sar., 2014). Zbog svog sastava mrke alge imaju široku primenu u savremenom društvu, od poljoprivrede i ishrane, preko kozmetike, građevinske, hemijske i tekstilne industrije, do farmakoloških istraživanja (Slika 3) (Chojnacka, 2012).

Mrke alge su važan izvor masnih kiselina, a balansiran odnos polinezasićenih u odnosu na zasićene masne kiseline kao i odnos n-3 i n-6 masnih kiselina u mrkim algama je važan i može imati blagotvoran uticaj na zdravlje čoveka, ukoliko se ove alge redovno konzumiraju (Bedoux i sar., 2014; Biancarosa i sar., 2014). Hemijski sastav mrkih algi izrazito varira u zavisnosti od sezone, mesta sakupljanja, kao i od uslova sredine u kojima rastu. Sezonske varijacije sredinskih uslova značajno utiču na životni ciklus algi i sastav njihovih metabolita (Pacheco i sar., 2018; Zenthoefer i sar., 2017).





**Slika 3.** Aktivnost ekstrakata algi i njihova primena. Preuzeto i modifikovano iz: (Chojnacka, 2012)

### 1.3.1. Primarni metaboliti mrkih algi

Primarne metabolite čine jedinjenja koja su neophodna za rast, razvoj, funkcionisanje i reprodukciju algi. Primarne metabolite mrkih algi čine sledeće grupe jedinjenja: polisaharidi, proteini, lipidi, pigmenti i vitamini (Dias i sar., 2012).

**Polisaharidi** koji se javljaju u mrkim algama su: alginati, laminarini, sargasani i fukani.

*Alginati* se ne nalaze u kopnenim biljkama. Mogu činiti i do 47% suve mase mrkih algi. Nalaze se u obliku kiselina (alginska kiselina) i soli. Imaju koloidna svojstva. Od bioloških efekata najizraženiji su antibakterijsko i antiinflamatorno dejstvo (Chojnacka, 2012).

*Laminarini* su jedni od najzastupljenijih polisaharida u mrkim algama. Njihova struktura se sastoji od linearnih polimera 1,3-β-D-glukana sa bočnim granama od 1,3-β-d-glukopiranoze (Dunstan i Goodall, 2007). Nalazi se u koncentraciji od 10% do 32% suve mase. Laminarin je dijetetsko vlakno i prebiotik, sa antivirusnim i antibakterijskim svojstvima (Chojnacka, 2012).

*Sargasani* su sulfatisani polisaharidi izolovani iz familije Sargassaceae rastvorljivi u vodi (Pavlenko i sar., 1974).

*Fukane* čine tri grupe polisaharida: fukoidani, sulfatisani galaktofukani i askofilini.

*Fukoidani* su sulfatisani polisaharidi, koji se uglavnom sastoje od fukoze i sulfata, ali njihov sastav može biti i složeniji. U zavisnosti od vrste algi fukoidani, pored fukoze i sulfata, mogu sadržati i druge monosaharide (glukoze, manozu, ksiloze, galaktozu itd.), uronsku kiselinu, acetil grupe i proteine (Li i sar., 2008). Količina fukoidana u algama može biti i do 10% suve mase. Apsorpcija i iskorišćenost fukoidana zavise od njihove molekulske težine. Što je molekulska težina manja to je veća bioiskoristljivost. Dokazano je da fukoidani imaju brojne biološke aktivnosti, kao što su antioksidativna, antitumorska, antivirusna, antiinflamatorna, antikoagulantna, antiangiogena, imunomodulatorna i antiadheziona (Cumashi i sar., 2007; Damonte i sar., 2004; Chojnacka, 2012).

**Proteini i aminokiseline** mogu činiti 1-24% suve mase mrkih algi, ali uglavnom čine manje od 5% suve mase (Bedoux i sar., 2014; Chojnacka, 2012). U proteine ovih algi spadaju; lektin i fikobiliproteini. Mrke alge u svom sastavu imaju esencijalne aminokiseline: treonin, valin, leucin, lizin, glicin i alanin. Lektini se mogu vezivati za ugljene hidrate i tako učestvovati u mnogim biološkim procesima (Bedoux i sar., 2014).

Sve velike klase **lipida** su zastupljene u mrkim algama i to su masne kiseline, trigliceridi, glikolipidi, fosfolipidi, steroli (fukosterol). (Bedoux i sar., 2014). Pri smanjenju temperature vode alge imaju sposobnost nagomilavanja polinezasićenih masnih kiselina (PNMK), pa tako vrste koje žive u hladnijim morima imaju više PNMK od onih koje naseljavaju toplije predele (Chojnacka, 2012). Od posebnog značaja su PNMK dugog lanca, jer imaju važnu ulogu u očuvanju dobrog zdravstvenog stanja ljudi, a sintetišu se samo u biljkama. Ovi lipidi imaju više od 20 atoma ugljenika, sa najmanje dve dvostruke veze. Kada se prva dvostruka veza nalazi na trećem atomu ugljenika, tada se taj lipidni molekul označava kao omega-3 (n-3), (Chojnacka, 2012). Masne kiseline mogu imati terapeutska svojstva u lečenju nekoliko ozbiljnih bolesti kao što su kancer, dijabetes tip 2, bolesti srca i krvnih sudova, aritmija, arterioskleroza i inflamaciju (Doughman i sar., 2007).

**Pigmenti** koji se mogu naći u mrkim algama se mogu podeliti dve velike grupe: hlorofili i karotenoidi.

*Hlorofili* mrkih algi su hlorofili a, b i c (Gomez-Zavaglia i sar., 2019; Kumar i Singh, 1979).

*Karotenoidi* u mrkim algama su zastupljeniji od hlorofila, što algama daje mrku boju. Prisutni su:  $\beta$ -karoten, fukoksantin, zeaksantin, violaksantin, anteraksantin. Karotenoidi su liposolubilni i jaki antioksidansi. Oni mogu da inhibiraju kiseonične i druge slobodne radikale (Chojnacka, 2012; Gomez-Zavaglia i sar., 2019; Kumar i Singh, 1979).

Mrke alge su bogate **vitaminima** i to liposolubilnim vitaminima (A, D, E i K), kao i hidrosolubilnim vitaminima (C i grupe B) (Bedoux i sar., 2014).

### 1.3.2. Sekundarni metaboliti mrkih algi

Sekundarni metaboliti su derivati primarnih metabolita, imaju ulogu u zaštiti algi od abiotičkog stresa i interakciji algi sa drugim organizmima. Sekundarni metaboliti nisu uključeni u primarne fiziološke procese u algama kao što su: fotosinteza, ćelijska deoba ili reprodukcija algi (Dias i sar., 2012). Mrke alge proizvode veliki broj sekundarnih metabolita, koji imaju širok spektar različitih bioloških efekata. Neki od njih imaju značajnu ulogu u odbrani od biljojeda, a omogućuju i zaštitu od oksidativnog stresa, bakterija, gljivica i virusa. Glavne klase sekundarnih metabolita kod mrkih algi čine: fenolna jedinjenja, steroli, terpeni, aminokiseline slične mikosporinu i fitohormoni (Bedoux i sar., 2014).

**Fenolna jedinjenja** obuhvataju dve klase polifenola i flavonoide. U morskim ekosistemima, mrke alge gornje interplimske zone se nalaze van vode za vreme oseke gde su izložene jakim nefiltriranim UV zracima. Ova pojava indukuje proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta i slobodnih radikala. Pokazano je da je produkcija fenolnih jedinjenja u morskim algama deo različitih protektivnih mehanizama, upravo u zaštiti od oksidativnog ili citotoksičnog dejstva UV zraka. Mrke alge su bogatije fenolnim jedinjenjima u odnosu na ostale makroalge (Bedoux i sar., 2014; Brglez Mojzer i sar., 2016).

*Polifenoli* štite alge od oksidativnog stresa ali i od biljojeda. Alge su bogate polifenolima, ali njihova količina u ekstraktu zavisi od metoda ekstrakcije (Chojnacka, 2012). Polifenolna jedinjenja formiraju klasu molekula podeljenih na floroglucinole (mono-, di-, tri-, tetra- i oligomeri) i florotanine.

*Florotanini* su najviše izučavana grupa polifenolnih jedinjenja u mrkim algama. Formiraju se polimerizacijom floroglucinola u putu acetatmalonata. Ovi polimeri imaju brojne biološke aktivnosti i uključeni su u mehanizme odbrane algi od herbivora, mikroporganizama i oksidativnog stresa. Ekol i diekol, jedinjenja iz ove grupe, nađeni su samo u mrkim algama. Iz mrkih algi izolovani su i florofukofuroekol A, diekol, katehin, epigalokatehin, 7-florakol (Besednova i sar., 2019; Rosa i sar., 2020). Količina florotanina varira od 1 do 10% suve materije. Molekularni skelet florotanina se sastoji od osam fenolnih prstenova, dok terestrične biljke sadrže florotanin sa tri do četiri prstena. Njihova jedinstvena struktura omogućava da fenolni prstenovi služe kao elektronske zamke za slobodne radikale. Florotanini pored antioksidativne imaju i jaku antimikrobnu aktivnost,

čiji se mehanizam ogleda u sposobnosti inaktivacije bakterijskih proteina, što rezultuje eliminacijom mikroorganizama (Bertoni, 2013; Chojnacka, 2012).

*Flavonoidi* su fenoli koji su strukturne komponente ćelijskog zida, a imaju funkciju u zaštiti od UV zračenja i od biljojeda, u formi hemijske odbrane (Curti i sar., 2017).

Od *sterola* u mrkim algama ima najviše fukosterola. Saringasterol je izolovan iz algi roda *Sargassum* (Milkova i sar., 1997; Patterson, 1971).

Mrke alge se smatraju najbogatijim izvorima *terpena* od svih makroalgi. Strukturno terpeni u algama se razlikuju od analoga u višim biljkama. U mrkim algama su najzastupljeniji diterpeni i meroditerpeni (Gaysinski i sar., 2015).

*Aminokiseline slične mikosporinu* (engl. *mycosporine-like amino acids*, MAA) su familija sekundarnih metabolita čija produkcija direktno ili indirektno zavisi od apsorpcije solarne energije, a koji štite morske organizme od UV zraka sunčeve svetlosti. Prisustvo mikosporinu sličnih amino-kiselina varira tokom godine zbog efekta insolacije (Bhatia i sar., 2011).

*Fitohormoni* uključuju brojna jedinjenja nalik hormonima kao što su citokinini, auksini, gibberelini, betaini, apscisinska kiselina, jasmonska kiselina, poliamini, brazinosteroidi i rodomorfin. Gibberelini su estrahovani iz vrsta *F. spiralis* i *F. vesiculosus*, a indukuju klijanje semena (Chojnacka, 2012).

## 1.4. Kancer

Kancer je ozbiljno oboljenje koje pogađa stanovništvo svih zemalja sveta i jedan je od vodećih uzročnika smrti. Prema podacima svetske zdravstvene organizacije (SZO) za 2020., u celom svetu uzrok smrti jedne od šest osoba je kancer (WHO Cancer report, 2020). Priroda bolesti je takva da je lečenje kompleksno, a često i neuspešno.

Glavna odlika kancera je nekontrolisan rast ćelija usled narušavanja ravnoteže između proliferacije ćelija i ćelijske smrti. Kancerske ćelije, pored toga što se nekontrolisano dele, vrše invaziju i u okolna i udaljena tkiva (Alberts i sar., 2015). U najvećem broju slučajeva, kancer potiče od jedne abnormalne progenitorske ćelije. Progenitorska ćelija i njene ćerke nose somatske mutacije, a mogu imati i epigenetičke promene, što im daje prednost u odnosu na normalne ćelije u pogledu deobe, rasta i rasejavanja (Yu i sar., 2012).

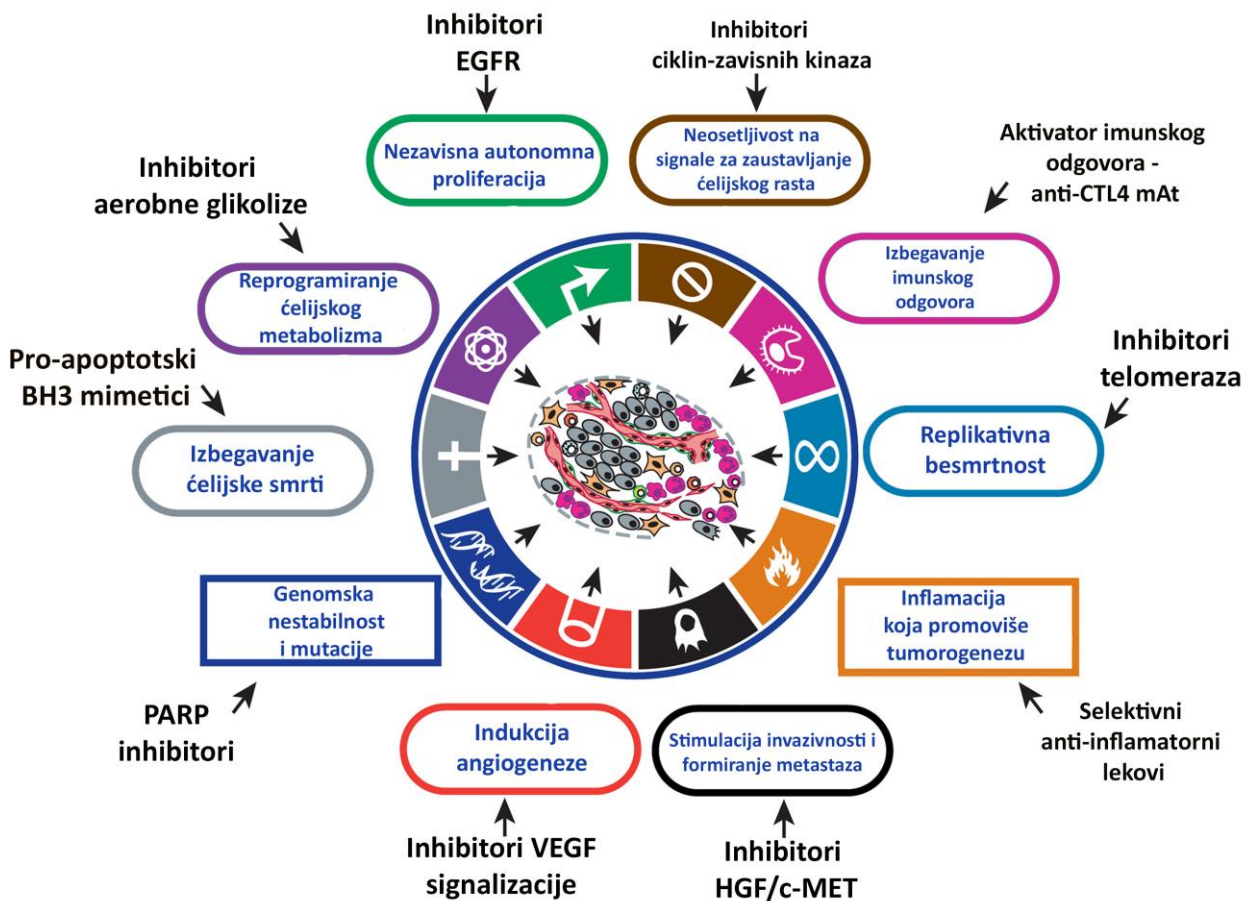
Do brze akumulacije mutacija i drugih aberacija dolazi zbog velike genetičke nestabilnosti koja je karakteristična za kancerske ćelije. Genetička nestabilnost potiče od nemogućnosti maligno transformisanih ćelija da repariraju oštećenu DNK usled inaktivacije gena zaduženih za očuvanje integriteta genoma što dovodi do povišene stope svih tipova mutacija u ćeliji. S toga možemo zaključiti da je genetička nestabilnost glavni mehanizam odgovoran za sticanje novih osobina neophodnih za proces kancerogeneze. Genetička nestabilnost, zajedno sa proinformativnom mikrosredinom, predstavlja mehanizam koji je u osnovi glavnih obeležja kancera (Alberts i sar., 2015; Yao i Dai, 2014).

Prema Hanahan i Weinberg (2011, Slika 4) glavna obeležja kancera su:

1. **Nezavisna, autonomna proliferacija** - Ćelije kancera pokazuju izražene promene u kontroli rasta i proliferacije što može biti posledica povećane ekspresije i/ili mutacija receptora za faktore rasta, inaktivacije kontrolnih inhibitornih proteina, autokrine sinteze liganada ili konstitutivne aktivacije nishodnih signalnih puteva faktora rasta (Haugsten i sar., 2010). Ove promene omogućavaju kancerskim ćelijama kontinuiranu proliferaciju nezavisnu od spoljašnjih mitogenih signala. Brojne strategije u lečenju kancera se oslanjaju na ciljanje signalnih puteva faktora rasta i uključuju blokadu odgovarajućih receptora monoklonskim antitelima (mAt).
2. **Neosetljivost na signale za zaustavljanje ćelijskog rasta** - Inhibitorni, kontrolni signali rasta omogućavaju održavanje tkivne homeostaze. Njihovom inaktivacijom i zaobilazanjem gubi se kontrola ćelijskog ciklusa i kancerske ćelije postaju neosetljive na supresiju rasta. Poslednjih godina u kliničku upotrebu su ušli lekovi koji ometaju ćelijski ciklus kroz ciljanje njegovih regulatornih tačaka.

3. **Replikativna besmrtnost** - Normalne, netransformisane ćelije nakon određenog broja replikacija ulaze u stanje mirovanja ili u programiranu ćelijsku smrt što je posledica skraćivanja telomera na krajevima hromozoma prilikom svake deobe. Kancerske ćelije uspevaju da održe dužinu telomera i tako stiču sposobnost neograničene proliferacije. Inhibitori telomeraza mogu ponovo uspostaviti skraćivanje telomera i tako dovesti do smrti tumorskih ćelija.
4. **Izbegavanje ćelijske smrti** - Programirana ćelijska smrt odnosno apoptoza je odbrambeni mehanizam koji se aktivira kao odgovor na širok spektar fizioloških stresora od kojih mnogi imaju važnu ulogu u kancerogenezi. Izbegavanje apoptoze je opaženo kod gotovo svih tipova humanih maligniteta. Pošto su mehanizmi koji indukuju i kontrolišu apoptozu brojni i kompleksni, maligne ćelije su razvile raznolike strategije za njihovo prevazilaženje pa su i mogući terapijski pristupi raznovrsni i uključuju korišćenje lekova koji deluju na kontrolne tačke ćelijskog ciklusa.
5. **Izbegavanje imunskog odgovora** - Imunski sistem kontinuirano vrši nadzor svih ćelija u organizmu i ima (između ostalog) funkciju da prepozna i uništi transformisane ćelije pa tako predstavlja snažnu i time spreči razvoj tumora. Samo maligne ćelije koje su razvile uspešne mehanizme, kojima se izbegava imunski odgovor, mogu opstati i formirati primarni tumor. Imunoterapija tumora je trenutno u ekspanziji sa više agenasa koji daju dobre rezultate u različitim kancerima.
6. **Stimulacija invazivnosti i formiranje metastaza** - Pod invazivnošću se smatra sposobnost malignih ćelija da prodru u okolna tkiva dok metastaze predstavljaju sekundarne akumulacije u udaljenim tkivima koji vode poreklo od migratornih ćelija primarnog tumora. Ključne karakteristike koje omogućavaju invaziju su gubitak kontaktne inhibicije kod tumorskih ćelija i sinteza i transport proteaza u međućelijski prostor, koje zatim degradiraju ekstraćelijski matriks i tako omogućavaju kretanje ovih ćelija. Navedene karakteristike ogledaju se i u morfološkim osobinama kancerskih ćelija koje su uglavnom izmenjenog oblika i pokretljivosti, u odnosu na normalne ćelije. Invazivnost i metastaziranje su složeni procesi u koje su uključeni brojni signalni mehanizmi. Za uspešnu terapiju je potrebno da se ciljaju ključni signalni putevi.
7. **Indukcija angiogeneze** - Brzo rastuća tumorska masa vremenom ima sve veće potrebe za nutrijentima i kiseonikom koje postojeća vaskulatura ne može da zadovolji. Da bi tumor nastavio da raste dolazi do neovaskularizacije, odnosno do remodeliranja vaskularne mreže i obezbeđivanja bolje prokrvljenosti. Ključnu ulogu u ovom procesu ima vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) koji oslobađaju kancerske ćelije, što ga čini dobrom metom za ciljanu terapiju inhibitorima.
8. **Reprogramiranje ćelijskog metabolizma** - Kancerske ćelije imaju izmenjen metabolizam, što se pre svega ogleda u izmenjenom načinu na koji metabolišu šećer. Kancerske ćelije odlikuje izuzetno velika potrošnja glukoze koja može biti i do 100 puta viša u odnosu na normalne ćelije. Uočeno je da tumorske ćelije intenzivno koriste glikolizu umesto oksidativne fosforilacije, čak i kada je kiseonik prisutan u dovoljnoj količini. Ova pojava naziva se Warburgov efekat (Liberti i Locasale, 2016). Oslanjanje kancerskih ćelija na glikolizu za produkciju ATP čini ih podložnim dejstvu klase terapeutika - inhibitora glikolize.

Savremene, ciljane terapije imaju i svoje mane zbog stvaranja rezistencije. Delovanjem na jedan od ključnih signalnih puteva koji dovode do uspostavljanja nekog od osobina tumorskih ćelija, dešava selektivni pritisak, koji favorizuje adaptirane progenitorske ćelije. Ćelije mogu početi da koriste neki drugi signalni put ili favorizovati neku drugu ključnu osobinu, što će im omogućiti dalji rast i/ili metastaziranje i dovesti do progresije tumora (Hanahan i Weinberg, 2011).



**Slika 4.** Dijagram bazičnih obeležja kancera (zaobljena polja) i karakteristika koje omogućavaju njihov razvoj (pravougaona polja) . Ilustrovani su i primeri mogućih pristupa u terapiji koji ciljaju ključne tačke koje leže u osnovi kancerogeneze. Preuzeto i modifikovano iz (Hanahan i Weinberg, 2011).

### 1.4.1. Ćelijski ciklus

Ćelijski ciklus obuhvata rast, udvostručavanje sadržaja i deobu ćelija. Ćelijski ciklus je visoko evolutivno konzervirani proces. (Alberts i sar., 2015).

Ćelijski ciklus se sastoji od četiri faze: presintetička G1 (engl. *gap 1*), sintetička S (engl. *synthesis*), postsintetička G2 (engl. *gap 2*) i mitoza M (engl. *mitosis*). G1, S i G2 faze se zajedno nazivaju interfazom (Slika 5). Trajanje ćelijskog ciklusa u različitim tipovima ćelija dosta varira. Na primer, interfaza ćelijskog ciklusa tipične humane ćelije koja proliferiše u kulturi zauzima 23 h u ciklusu koji traje 24 h, dok sama mitoza u ćelijskom ciklusu traje 1 h. Dužina trajanja ćelijskog ciklusa najviše zavisi od stepena diferenciranosti ćelija. Embrionalne ćelije se veoma brzo dele i kod njih ćelijski ciklus traje oko 30 min. Sa druge strane ćelije u adultnom organizmu u fiziološkom stanju se mogu podeliti na tri kategorije u odnosu na proliferativni status. To su ćelije koje se nakon embrionalnog stupnja diferenciraju i više ne ulaze u deobu, ćelije koje se dele kada za to postoji potreba (većina ćelija) i ćelije koje se stalno dele (npr., neke matične ćelije), (Anđelković i sar., 2002; Poleksić i sar., 2003). Kancerske ćelije u kulturi su imortalizovane i imaju sposobnost da se stalno dele. Umesto fiziološkog procesa kada ćelije nakon određenog broja deoba stare i umiru, ćelije kancera uz pomoć enzima telomeraze stiču replikativnu besmrtnost. Dodatno, neki od spoljašnjih činilaca koji mogu uticati na ćelijski ciklus ćelija koje imaju sposobnost deobe su dostupnost nutrijenata, pH, temperatura i drugi (Alberts i sar., 2015).



Kada govorimo o ćelijama koje se dele, G1 i G2 faza su faze ćelijskog ciklusa u kojima ćelija osim što raste proverava unutrašnje i spoljašnje uslove, pre nego što uđe u fazu replikacije DNK (S), odnosno mitozu. Sama mitozu se sastoji iz profaze, metafaze, anafaze, telofaze i citokineze. Ako su spoljašnji uslovi nepovoljni ili ako se radi o ćelijama koje se dele po potrebi, ćelije mogu ući u specijalno stanje „mirovanja“, u odnosu na deobu, koje se još naziva i G0 fazom, u kojoj može ostati danima pa i godinama (Anđelković i sar., 2002; Poleksić i sar., 2003).

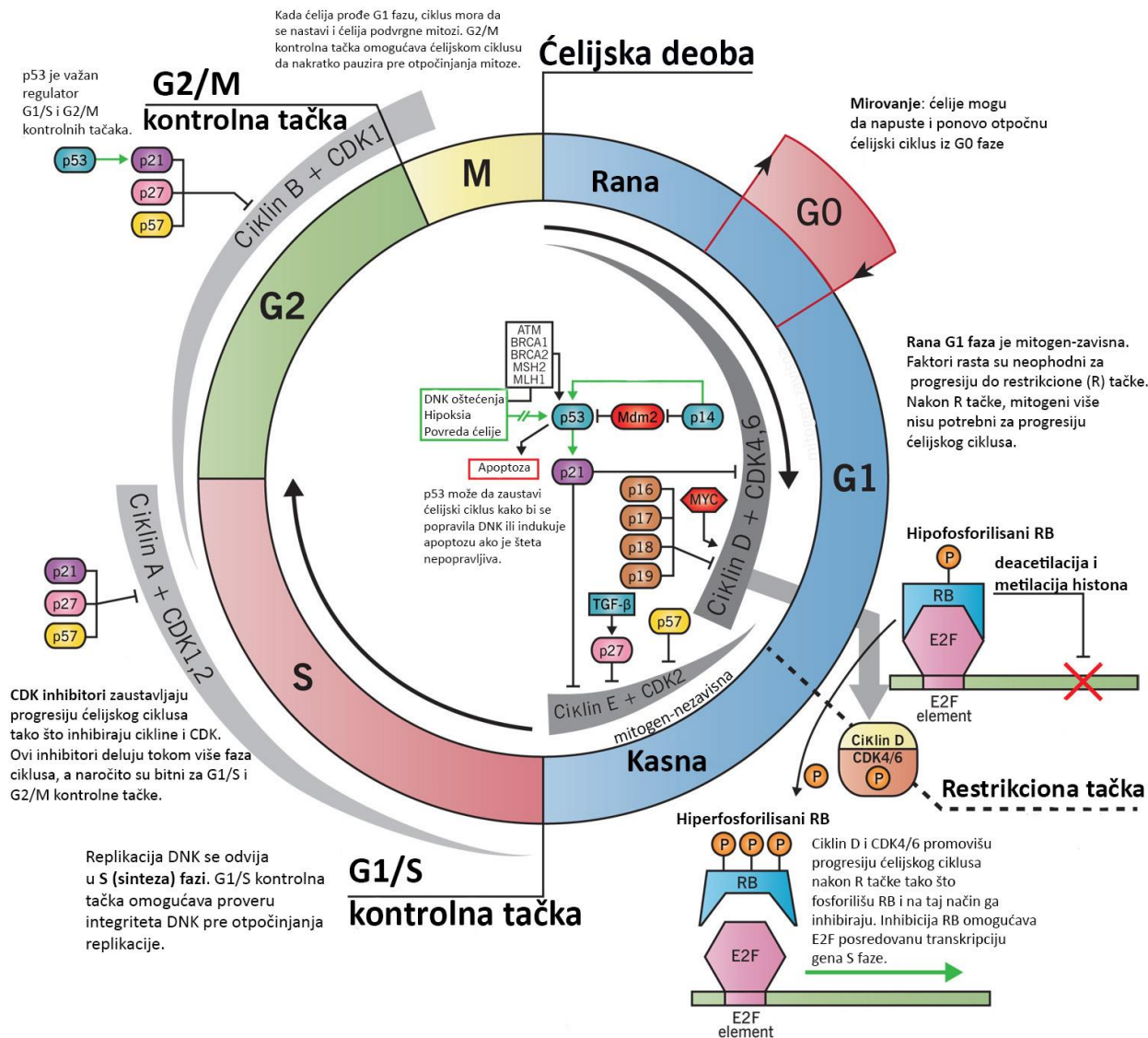
Ako ćelija primi signale za rast i deobu, ona prolazi kroz obavezujuću tačku pri kraju G1 faze poznatiju kao restrikciona tačka ili "tačka bez povratka". Nakon prolaska kroz ovu tačku ćelija ulazi u S fazu, bez obzira da li su spoljašnji signali prisutni ili ne. Druga velika kontrolna tačka se nalazi na prelasku iz G2 u M fazu (provera procesa DNK replikacije), dok je treća na prelasku između metafaze i anafaze (koja stimuliše odvajanje sestara hromatida). Kontrolni mehanizmi privremeno blokiraju progresiju ćelijskog ciklusa u naredne faze ukoliko je došlo do grešaka u predhodnim fazama ciklusa, kako bi reparacioni mehanizmi mogli da poprave greške. Ukoliko greške ne mogu da se repariraju zdrave ćelije mogu ući u stanje mirovanja ili u apoptozu (Alberts i sar., 2015).

Ćelijski ciklus je kontrolisan od strane unutrašnjih i spoljašnjih faktora. Glavne komponente unutrašnjeg kontrolnog mehanizma ćelijskog ciklusa predstavljene su proteinima koji pripadaju porodici ciklin zavisnih kinaza (engl. *cyclin-dependent kinases*, Cdk). Promene u aktivnosti Cdk su kontrolisane od strane niza enzima i drugih proteina, a najznačajniji regulatori među njima su proteini ciklini. Cdk moraju biti čvrsto vezane za cikline kako bi ispoljile svoju kinaznu aktivnost. Ciklične promene nivoa ciklina pokreću sastavljanje i aktivaciju ciklin-Cdk kompleksa na specifičnim stupnjevima ćelijskog ciklusa (Poleksić i sar., 2003). Postoje četiri klase ciklina koje su definisane na osnovu stupnja u ćelijskom ciklusu u kojima su aktivne. Kada G1/S ciklini aktiviraju Cdk u kasnoj G1 fazi omogućavaju ćeliji da prođu kroz restrikcionu tačku, nakon čega njihovi nivoi opadaju. S ciklini se vezuju za Cdk ubrzo nakon prolaska kroz restrikcionu tačku i stimulišu duplikaciju hromozoma, a njihov nivoi ostaju povišeni do mitoze. M-ciklini se vezuju za Cdk koje stimulišu ulazak u mitozu na G2/M kontrolnoj tački. Takođe postoje i G1 ciklini koji pomažu u kontroli aktivnosti G1/S ciklina. Aktivnost Cdk može biti suprimirana inhibitornom fosforilacijom ili Cdk inhibitornim proteinima. Kontrolni sistem ćelijskog ciklusa funkcioniše kao mreža biohemijskih prekidača, Slika 5 (Orford i Scadden, 2008; Alberts i sar., 2015).

U regulaciju ćelijskog ciklusa uključeni su i drugi faktori, između ostalih, hormoni, citokini i faktori rasta. Oni deluju kao signalne supstance koje se nakon vezivanja za receptore na ćelijskoj membrani pokreću kaskadu događaja u ćeliji koji rezultuju ekspresijom gena i regulacijom ćelijskog ciklusa. (Anđelković i sar., 2002).

Među glavne regulatore ćelijskog ciklusa ubrajaju se izoforme tumorskog proteina p53, kodiranog od strane *TP53* gena. Kada se p53 aktivira usled oštećenja DNK, dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi, dok se ne poprave DNK oštećenja. Ukoliko su ova oštećenja prevelika, p53 indukuje apoptozu, te je jedan od važnih tumor supresora. Gen *TP53* često nedostaje ili je mutiran u tumorskim ćelijama, te omogućava neometanu progresiju ćelija kroz ćelijski ciklus, bez popravki DNK oštećenja, što može dovesti do akumulacije mutacija i aktivaciju onkogeni ili inaktivaciju drugih tumor supresora (Alberts i sar., 2015; Kortlever i sar., 2017).

Mitogeni signalni put je u velikoj meri kodiran genima koji su označeni kao onkogeni, jer mutacije u ovim genima dovode do razvoja kancera. Tako, na primer, prekomerna ekspresija *RAS* i *MYC* onkogeni dovodi do prekomernog ćelijskog rasta i proliferacije i promovisanja razvoja kancera (Alberts i sar., 2015; Kortlever i sar., 2017).



**Slika 5.** Šematski prikaz ćelijskog ciklusa sa ključnim regulatornim tačkama. RB-retinoblastom tumor supresor protein. Preuzeto i modifikovano iz: <http://www.pathophys.org/wp-content/uploads/2012/10/Cell-cycle-copy.jpg>

### 1.4.2. Ćelijska smrt

Apoptoza i nekroza su osnovna tipa ćelijske smrti zavisno od toga da li je smrt ćelije fiziološka ili patološka (Poleksić i sar., 2003).

Apoptoza, programirana ćelijska smrt, se javlja kao normalan fiziološki proces u razviću ili kao mehanizam eliminacije oštećenih ili inficiranih ćelija. Ukoliko je oštećenje unutar ćelije preveliko, kao što je na primer oštećenje DNK, što za posledicu može imati malignu transformaciju ćelije, ćelija može ući u apoptozu (Anđelković i sar., 2002; Elmore, 2007).

Nekroza je pasivna ćelijska smrt izazvana nefiziološkim faktorima kao što su povrede, infekcije, toksini ili nedostatak kiseonika. Uglavnom se prve nekrotične promene dešavaju na membranama, usled čega dolazi do narušavanja unutarćelijske ravnoteže između natrijuma i kalijuma. Morfološki se u nekrozi uočava bubrenje ćelija, dilatacija oganela, dok se ribozomi mogu odvojiti od endoplazminog retikuluma. Dolazi do vezikulacije endoplazminog retikuluma i značajnog uvećanja mitohondrija i oštećenja kristi. Nukleus se dezintegriše kasno u ovom procesu, dok retko može doći do kondenzacije hromatina. U zavisnosti od morfologije i uključenosti lizozoma u procesu nekroze, mogu se razlikovati dva različita tipa: autofagija i nelizozomska

degradacija. Morfološki ćelije u autofagiji karakterišu brojne vakuole u citoplazmi ispunjene ćelijskim ostacima. Nelizozomska ćelijska smrt morfološki ima naglašene dilatirane organele i prazne prostore unutar citoplazme, bez detektovanog uključivanja lizozoma. Na kraju oba tipa nekroze dolazi do rupture ćelija i izlivanja sadržaja u okolno tkivo što izaziva inflamaciju (Ziegler i Groscurth, 2004). Nekroza u tumorima ima direktan uticaj na promociju kancera, kroz stimulaciju proliferacije živih malignih ćelija i na tumorsku mikrosredinu. Nekrotične ćelije mogu podsticati angiogenezu, proliferaciju endotelskih ćelija, povećavaju stopu ćelijske migracije, širenja i međućelijske interakcije (Karsch-Bluman i sar., 2019).

Apoptoza je u adultnom organizmu precizno regulisan proces koji uspostavlja ravnotežu između proliferacije i smrti ćelija. Jedno od važnih svojstava maligno transformisanih ćelija je izbegavanje apoptoze. Međutim, pod dejstvom određenih agenasa i maligne ćelije mogu ući u proces apoptoze. Ćelije u apoptozi karakterišu specifične morfološke promene na nivou nukleusa, ćelijske membrane i ćelijskih organela, uključujući i mitohondrije. Na početku apoptotskog procesa dešavaju se intenzivne promene u jedru: hromatin se kondenzuje (uočavaju se agregati na periferiji jedra), a zatim fragmentiše (pod dejstvom endonukleaza), dolazi do litičke degradacije nukleusne lamine, nukleusni ovoj stvara evaginacije i mehuriće. Ćelije se smanjuju i kondenzuju, citoskelet se dezorganizuje. U ranoj fazi apoptoze ćelije gube kontakt sa drugim ćelijama u okruženju, dok su organele i mitohondrije očuvane u ovoj ranoj fazi. Jedno od najranijih obeležja apoptoze je i eksternalizacija fosfatidilserina u membrani, koji šalje signale fagocitima. Mitohondrije, takođe imaju važnu ulogu u inicijaciji apoptoze tako što integrišu proapoptotske signale u apoptotsku signalnu kaskadu. Ćelijska membrana stvara evaginacije i mehuriće, a zatim se ćelija deli na fragmente okružene membranom čime se formiraju apoptotska tela. U poslednjem stadijumu apoptoze dolazi do progresivne degeneracije preostalog jedra i citoplazmatskih struktura, a ćelija poprima izgled ćelija u nekrozi, pa se ovaj stadijum naziva i sekundarna nekroza, što se zapaža u *in vitro* uslovima (Ziegler i Groscurth, 2004). Promene na membrani apoptotskih tela stimulišu makrofage da ih uklone, bez izlivanja sadržaja i bez izazivanja inflamacije (Elmore, 2007; Poleksić i sar., 2003).

Apoptoza zavisi od intracelularne proteolitičke kaskade koja je posredovana kaspazama. Kaspaze su familija intracelularnih proteaza, koje se sintetišu kao neaktivni prekursori i aktiviraju se samo u apoptozi. Postoje dva tipa kaspaza, inicijatorske i egzekutorske. Inicijatorske kaspaze započinju apoptotski proces i aktiviraju egzekutorske kaspaze, a rezultat je pojačavanje proteolitičke kaskade koja na kraju dovodi do sečenja proteina i ćelijske smrti. Kaspazna kaskada je ireverzibilan proces. Postoje dva puta kojim se može aktivirati kaspazna kaskada: unutrašnji (mitohondrijski) i spoljašnji (Slika 6), (Alberts i sar., 2015; Elmore, 2007).

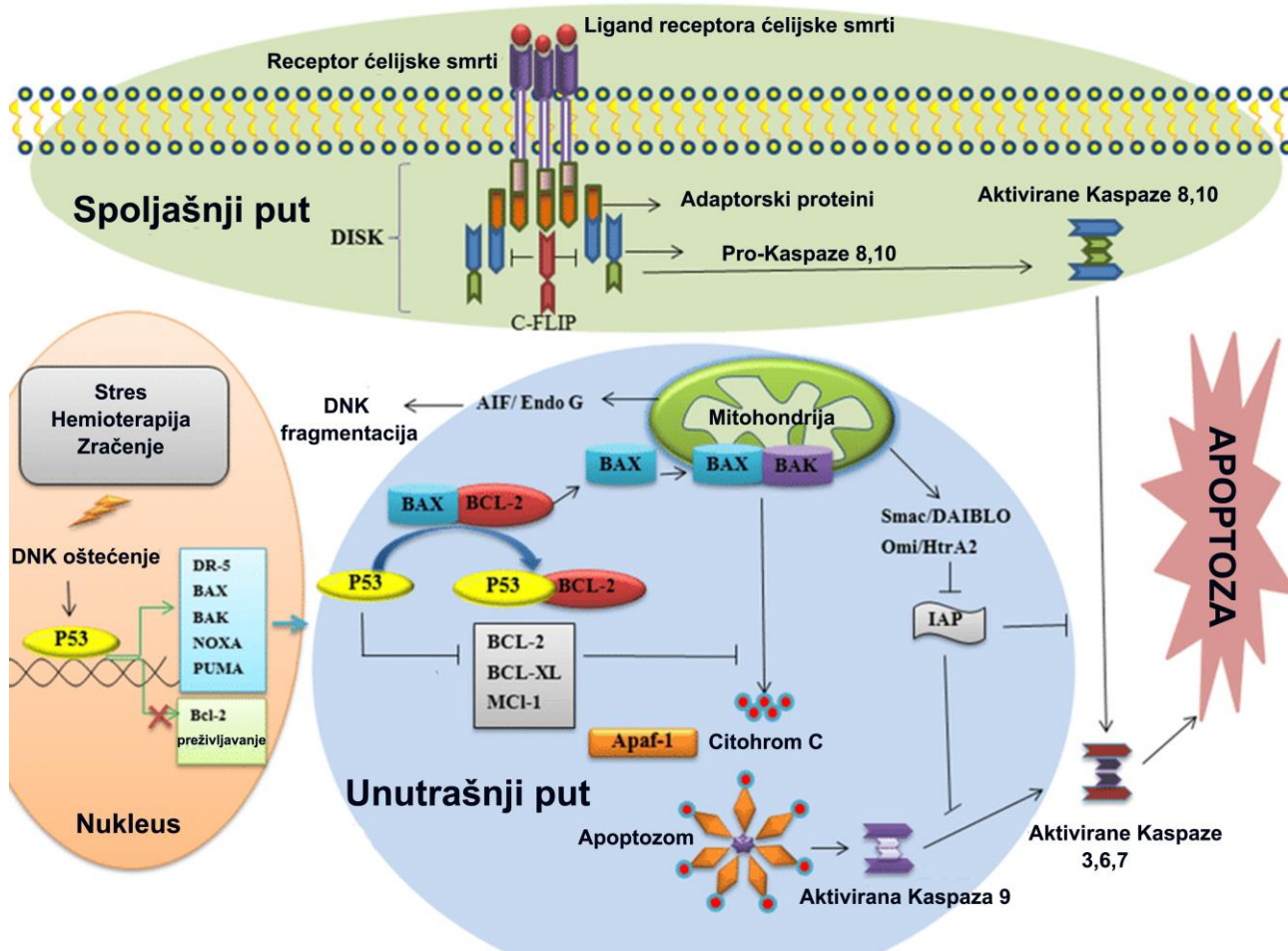
Receptori ćelijske smrti koji se nalaze na površini ćelija aktiviraju spoljašnji put apoptoze, tako što se za njih vezuju signalni proteini. Receptori ćelijske smrti se sastoje od vanćelijskog ligand-vezujućeg domena, transmembranskog domena i intracelularnog domena smrti koji pokreće apoptotski program. Receptori ćelijske smrti pripadaju familiji faktora nekroze tumora (TNF), a najbolje ispitani su TNFR1, TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) receptori DR4/5 i Fas receptor smrti. Vezivanje liganda dovodi do trimerizacije receptora smrti, stvaranja agregata na ćelijskoj membrani i pokretanja spoljašnjeg puta ćelijske smrti. Zatim se za receptor smrti u citosolu vezuje unutarćelijski adaptorski protein, poput Fas-asociranog proteina sa domenom smrti (engl. *Fas-associated protein with death domain*, FADD), koji dalje regrutuje inicijatorske kaspaze 8 i 10. Interakcija receptora smrti sa adaptorskim proteinom i inicijatorskim kaspazama dovodi do formiranja signalnog kompleksa koji izaziva ćelijsku smrt (engl. *death-inducing signaling complex*, DISC). Inicijatorske kaspaze se autokatalitički aktiviraju unutar DISC kompleksa, a zatim ga napuštajući dalje pokreću egzekutorsku kaspaznu kaskadu ili regrutuje unutrašnji apoptotski put. Ćelija se može i odbraniti od neprimerenih spoljašnjih stimulusa, proizvodnjom FLIP (engl. *FLICE-like inhibitory protein*) proteina koji blokira spoljašnji apoptotski put (Alberts i sar., 2015; Elmore, 2007; Green, 1998).

Unutrašnji apoptotski put se pokreće signalima koji nastaju, uglavnom, zbog stresa u pojedinim organelama (jedro, endoplazmin retikulum, Goldžijev kompleks) ili DNK oštećenja.

Usled ovih signala dolazi do permabilizacije spoljašnje membrane mitohondrija i oslobađanja proteina iz intermembranskog prostora u citosol koji zatim pokreću proteolitičku kaspaznu kaskadu. Glavni protein u ovom putu je citohrom c koji se vezuje za aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze (engl. *apoptotic protease activating factor 1*, Apaf1) koji zatim oligomeriše u heptamernu strukturu nalik kolskom točku. Ovako formirana struktura interaguje sa pro-kaspazom 9 formirajući apoptozom. U apoptozomu se pro-kaspaze 9 konvertuje u aktivnu formu koja dalje izaziva aktivaciju kaspaze 3 finalno rezultujući u pokretanju kaspazne kaskade i apoptozi (Bratton i Salvesen, 2010; Green, 1998). Unutrašnji apoptotski put je visoko evolutivno očuvan i kontrolisan. Bcl2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) familija proteina je velika klasa regulatornih proteina koja kontroliše otpuštanje citohroma c i drugih intramembranskih mitohondrijalnih proteina. Neki članovi ove familije su proapoptotski (stimulišu otpuštanje proteina) dok su drugi antiapoptotski (blokiraju otpuštanje). Oni se međusobno vezuju i inhibiraju funkcije jedni drugima. Od njihovog odnosa zavisi da li će ćelija preživeti ili ući u apoptozu. Antiapoptotsku familiju proteina čini sam Bcl2 protein kao i BclXL (engl. *B-cell lymphoma-extra large*), dok se proapoptotska familija Bcl2 proteina sastoji od dve potfamilije: efektorske Bcl2 koju čine Bax (engl. *Bcl-2-associated X protein*) i Bak (engl. *Bcl-2 homologous antagonist/killer*); i proteini koji sadrže samo domen BH3: Bad (engl. *BH3 interacting-domain death agonist*), Bim (engl. *Bcl-2-like protein 11*), Bid (engl. *BH3 interacting-domain death agonist*), Puma (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) i Noxa (engl. *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*). (Alberts i sar., 2015; Elmore, 2007; Green, 1998).

U ćelijama postoji još jedan mehanizam koji kontroliše aktivaciju kaspaza i čini ga familija proteina inhibitora apoptoze (engl. *inhibitor of apoptosis*, IAP). Oni se vezuju za kaspaze i inhibiraju ih, ili dovode kaspaze u stanje pogodno za degradaciju u proteozomima. IAP se mogu neutralisati anti-IAP proteinima koji se oslobađaju iz intermembranskog prostora mitohondrija u citosol. Najpoznatiji anti-IAP proteini su Smac/Diablo i Omi (Alberts i sar., 2015; Silke i Meier, 2013).

Smanjen nivo apoptoze doprinosi razvoju tumora. Na primer visok nivo Bcl2 potpomaže razvoj kancera inhibirajući apoptozu i smanjujući senzitivnost na antikancerske lekove, koji najčešće dovode do indukcije apoptoze. Takođe gen koji kodira tumor-supresorski protein p53 je mutiran u 50% humanih tumora, tako da više ne stimuliše apoptozu i zastoj u ćelijskom ciklusu kao odgovor na DNK oštećenja. Na ovaj način tumorske ćelije akumuliraju mutacije i postaju još malignije, kao i otpornije na hemioterapeutike. Jedna od strategija u lečenju kancera je indukcija apoptoze i zastoja u ćelijskom ciklusu određenim agensima blokirajući, na primer, anti-apoptotsku familiju proteina Bcl2 (Bcl2 i BclXL), na isti način kao što ih normalno blokiraju proteini koji sadrže samo domen BH3 (Alberts i sar., 2015; Elmore, 2007; Green, 1998).



**Slika 6.** Šematski prikaz unutrašnjeg i spoljašnjeg apoptotskog puta. Preuzeto i modifikovano iz (Goldar et al., 2015)

### 1.4.3. Invazivnost i metastaziranje malignih ćelija

Vodeći uzrok smrti kod obolelih od kancera je pojava i širenje metastaza. Metastaziranje tumorskih ćelija je izuzetno složen proces koji se odvija u više faza i obuhvata (van Zijl i sar., 2011):

- lokalnu invaziju u okolno tkivo,
- intravazaciju odnosno transendotelnu migraciju tumorskih ćelija u krvne ili limfne sudove,
- preživljavanje kancerskih ćelija dok se raznose krvotokom ili limfotokom,
- ekstravazaciju cirkulišućih tumorskih ćelija u prijemčivom udaljenom organu što je proces koji podrazumeva formiranje adhezivnih veza između tumorskih i endotelnih ćelija, a zatim i kretanje tumorskih ćelija kroz endotel i bazalnu membranu,
- uspešnu proliferaciju u novoj mikrosredini i kolonizaciju udaljenog organa što dovodi do pojave mikrometastaza, a finalno rezultira u formiranju sekundarnih tumora.

Veliki broj tumora je epitelnog porekla. Još značajniji je podatak da prvih deset malignih oboljenja po incidenci u celom svetu jesu karcinomi i oni čine gotovo 70% svih dijagnostikovanih tumora (WHO cancer report 2020). Mnogi karcinomi imaju izraženu invazivnost i sposobnost metastatske diseminacije što je osnovni razlog zašto se potraga za antimetastatskim agensima već decenijama nalazi u fokusu interesovanja molekularne onkologije. Jedna od glavnih karakteristika koja stvara povoljne uslove za rasejavanje tumorskih ćelija epitelnog porekla je pokretanje epitelno-

mezenhimske tranzicije (EMT). Ova tranzicija omogućava gubitak karakteristika epitelnih ćelija (prvenstveno adhezivnosti) i sticanje osobina mezenhimalnih ćelija (pokretljivost). Na kraju puta tumorskih ćelija, nakon izlaska iz vaskulature u udaljena tkiva, maligne ćelije se vraćaju u svoja neinvazivna stanja kako bi obrazovale novi tumor (Alberts i sar., 2015; Kalluri i Weinberg, 2009; Larue i Bellacosa, 2005).

#### 1.4.4. Angiogeneza

Da bi preživele, ćelije i tkivo tumora moraju da budu snabdeveni hranljivim materijama i kiseonikom, a produkti metabolizma treba da budu uklonjeni. To se kao i u normalnom tkivu postiže vaskularizacijom. Ćelije tumora sekretuju angiogene faktore koji podstiču rast, proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija i tako stimulišu stvaranje novih krvnih sudova kako bi se omogućio nesmetan protok nutrijenata. Proces uspostavljanja vaskularne mreže, vaskulogeneza, odvija se tokom embrionalnog razvića, dok se kasniji procesi remodeliranja postojeće vaskularne mreže označavaju kao angiogeneza. U tumorima je stalno prisutan signal koji podstiče angiogenezu (Alberts i sar., 2015; Lugano i sar., 2020).

Neke od glavnih odlika tumorske angiogeneze obuhvataju (Bergers i Benjamin, 2003):

- Početak angiogeneze ili angiogeni prekidač je diskretni proces koji se može desiti u bilo kom trenutku tumorske progresije a zavisi od vrste tumora i njegove mikrosredine.
- Heterogenost u tumorskoj vaskulaturi je posledica heterogenosti samih tumora.
- Tumorska angiogeneza se značajno razlikuje od procesa fiziološke angiogeneze. Neke od razlika su: postojanje aberantne vaskularne strukture, abnormalni tok krvi, izmenjene interakcije između endotelnih ćelija i pericita, povećana permeabilnost krvnih sudova, njihovo odloženo morfološko i funkcionalno uobličavanje.
- Smatra se da ove izmenjene odlike tumorske vaskulature potiču od poremećene ravnoteže u inhibiciji i stimulaciji angiogeneze.
- Hipoksija može imati značajnu ulogu u angiogenezi.

Faktori koji indukuju ili inhibiraju angiogenezu su najčešće vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i trombospondin-1 (TSP). Pojačana ekspresija nekih gena kao što su *VEGF*, hipoksija inducibilnog faktora 1 alfa (engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*, *HIF-1 $\alpha$* ), faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*, *FGF*), transformišućeg faktora rasta alfa i beta (engl. *transforming growth factor alpha*, *TGF- $\alpha/\beta$* ) deluje na uključivanje angiogenog prekidača, odnosno otpočinjanja procesa angiogeneze (Bergers i Benjamin, 2003; Hanahan i Weinberg, 2011). Kada je pojačana ekspresija gena koji stimulišu angiogenezu dolazi do istovremenog smanjenja ekspresije inhibitora angiogeneze poput trombospondina 1, endostatina, angiostatina, vazostatina, anastelina, interferona gama, interleukina: 12, 1beta i 18. Geni poput *c-MYC* ili *RAS* koji su potentni stimulatori proliferacije, kao i hronična inflamacija, mogu da stimulišu angiogenezu preko proangiogenih faktora (Hanahan i Weinberg, 2011; Lugano i sar., 2020).

#### 1.4.5. Antikancerski potencijal mrkih algi

Prirodni proizvodi u lečenju različitih bolesti se koriste još od antičkih vremena. Razvoj savremenih hemijskih metoda za izolaciju jedinjenja iz prirodnih izvora je omogućio otkrivanje velikog spektra bioaktivnih metabolita. Mnogi od njih su postali kandidati za nove lekove (Dias i sar., 2012).

Lečenje kancera najčešće podrazumeva kombinovanje različitih metoda među kojima hemioterapeutici imaju veoma važno mesto. Njihova primena je, nažalost, često povezana sa ozbiljnim neželjenim dejstvima, uključujući lošu selektivnost prema kancerskim ćelijama i pojavu rezistencije. Pogodne osobine dobrog antikancerskog agensa uključuju selektivno dejstvo, i manju mogućnost da dovedu do pojave rezistencije. Danas se neka prirodna jedinjenja koriste u lečenju



malighnih bolesti, kao hemioterapeutici ili kao sredstva koja pojačavaju dejstvo drugih hemioteraputika ili smanjuju njihova neželjena dejstva. Neki od savremenih hemioterapeutika koji su poreklom iz prirodnih izvora su prikazani u Tabeli 1 (Mann, 2002).

**Tabela 1.** Hemioterapeutici koji vode poreklo od prirodnih izvora

Naziv biljke	Naziv leka	Oblik korišćenja	Funkcija	Referenc e
<i>Camptotheca acuminata</i>	Topotekan	Sintetičko jedinjenje slično kampopecinu	Hemioterapeutik	(Yang i sar., 2001)
<i>Catharanthus</i>	Vinblastin i vinkristin	Prirodna jedinjenja: vinka alkaloidi	Hemioterapeutici	(Alam i sar., 2017)
<i>Podophyllum peltatum</i>	Etopozid i tenipozid	Sintetička jedinjenja slična podofilotoksinu	Hemioterapeutici	(Moraes i sar., 2002)
<i>Taxus brevifolia</i>	Paklitaksel i docetaksel	Sintetička jedinjenja slična taksolu	Hemioterapeutici	(Dias i sar., 2012)
<i>Euphorbia peplus</i>	Ingenol mebutat	Prirodno jedinjenje	Površinska primena u lečenju karcinoma kože	(Fidler i Goldberg, 2014)
<i>Maytenus ovatus</i>	Emtansin	Sintetičko jedinjenje konjugovano sa trastuzumabom	Ciljana terapija za karcinom dojke	(Peddi i Hurvitz, 2013)

Postoje brojne studije koje pokazuju da ekstrakti algi i aktivne supstance izolovane iz njih imaju antitumorska i imunomodulišuća svojstva (Andrade i sar., 2013a; Collins i sar., 2016; El Gamal, 2010; Kandale, 2011; Sithranga Boopathy i Kathiresan, 2011). Metaboliti izolovani iz algi pokazali su obećavajuće rezultate i u preventivi malignih bolesti. Naročito se ističu polifenoli koji, pored uklanjanja slobodnih radikala, imaju i sposobnost da utiču na protein-kinaze koje učestvuju u malignoj transformaciji i regulaciji ćelijskog ciklusa (Curti i sar., 2017; Lamoral-Theys i sar., 2010; Zenthoefer i sar., 2017). Pokazano je i da masne kiseline iz algi, a pogotovo polinezasićene masne kiseline imaju antikancerske efekte (Andrade i sar., 2013a; Huang i Freter, 2015; Khalid i sar., 2018; Wannous i sar., 2013).

Vrste roda *Fucus* pokazale su antikancerski potencijal, a naročito vrste *F. vesiculosus* (sa najaktivnijom komponentom fukoidanom) i *Fucus spiralis* (Kim i sar., 2010; Noda i sar., 1990). Aktivne komponente izolovane iz alge *Laminaria japonica* su ispolje visoku antikancersku aktivnost u vidu inhibiranja rasta i citotoksičnog efekta kod nazofarigelnog karcinoma, povećanje preživljavanja pacijenata sa karcinomom pluća uz oralnu primenu sa cisplatinom i inhibiciju proliferacije karcinoma pluća. Izolovana aktivna jedinjenja sa antikancerskom aktivnošću iz ove alge su: florotanini, fukoksantin i fukoidan (Hsu i sar., 2020; Mei i sar., 2017; Yang i sar., 2010). Smatra se da redovno konzumiranje *L. japonica* značajno smanjuje rizik od nastanka karcinoma dojke (Pal i sar., 2014). Neke od vrsta algi koje se koriste u ishrani su pokazale antikancersku aktivnost kao što su: *Palmaria palmate*, *Scytosiphon lomentaria*, *Lessonia nigrescens* i *Sargassum ringgoldianum* (Noda i sar., 1990).

U *in vitro* ispitivanjima, fukoidan iz *Ascophyllum nodosum* je pokazao antiproliferativan efekat prema nizu ćelijskih linija. Stipodiol izolovan iz *Stypodium sp.* ostvaruje svoj citotoksični efekat inhibiranjem formiranja deobnog vretena. (Sithranga Boopathy i Kathiresan, 2011). Iz alge *Eclonia cava* dobijen je sulfatisani polisaharid koji je inhibirao kancerske ćelije *in vitro*, kao što su ćelije humanog karcinoma kolona (CT-26), humane leukemije (U-937), humane promijelocitne leukemije (HL-60), mišijeg melanoma (B-16). Zabeležena je i akumulacija u subG-1 fazama ćelijskog ciklusa kao i fragmentacija DNK na U-937 ćelijskoj liniji tretiranoj ovim polisaharidom. Takođe, ostvaren je i jasan efekat inhibicije kaspaza 7 i 8 (Sithranga Boopathy i Kathiresan, 2011; Pal i sar., 2014). Pokazano je da fukoidani iz mrke alge *Costaria costalla* i *Sargassum hornery* sa južnokorejskog poluostrva inhibiraju formiranje kolonija ćelija *in vitro* humanog karcinoma kolona i melanoma (Pal i sar., 2014).

Trenutno je u toku klinička studija koja prati efekte kahalalida F iz *Bryopsis sp.* u lečenju karcinoma pluća, a ispituje se i njegovo antivirusno dejstvo (Dias i sar., 2012).

#### 1.4.6. Antioksidativna aktivnost mrkih algi

Slobodni radikali su molekuli ili molekularni fragmenti koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Slobodni radikali nastaju kao produkti esencijalnih metaboličkih procesa u humanom organizmu. Oni mogu nastati i kao posledica štetnih faktora kao što su izloženost X-zracima, ozonu, dimu od cigarete, industrijskim hemikalijama, aerozagađenju, teškim metalima (Lobo i sar., 2010). Oksidativni stres nastaje zbog narušavanja prooksidativne i antioksidativne homeostaze, u ćelijama i tkivima, koje najčešće vodi do stvaranja toksičnih reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl., *reactive oxygen species*, ROS) i reaktivnih vrsta azota (engl., *reactive nitrogen species*, RNS), ugljenik centriranih radikala i sumpor centriranih radikala, što dovodi do oštećenja ćelija i tkiva (Ahmad, 2018; Lobo i sar., 2010). ROS porodici pripadaju slobodni radikali (superoksidni anjon radikal ( $O_2^-$ )), kao i molekuli koji nisu slobodni radikali ali učestvuju u redoks signalizaciji ( $H_2O_2$ ) (Pinto i sar., 2003). Oksidativni stres ima značajnu ulogu u starenju i patogenezi mnogih bolesti kao što su: kancer, dijabetes, bolesti povezane sa inflamacijom, arterioskleroza i drugih (Lobo i sar., 2010; Vadlapudi i John, 2012). Međutim izazivanje oksidativnog stresa se može koristiti i u lečenju nekih oboljenja, na primer karcinoma, jer X-zraci i neki od hemioterapeutika izazivaju oksidativni stres (Ahmad, 2018).

Brojne studije su pokazale da ekstrakti algi i aktivna jedinjenja izolovana iz mrkih algi imaju antioksidativnu aktivnost. Mrke alge poseduju izraženu antioksidativnu aktivnost koja se ogleda u sposobnosti neutralizacije 2,2-difenil,1-pikril hidrazila (DPPH), azotnog oksida, hidroksila i superoksida (Andrade i sar., 2013). Vrste *Sargassum boveanum*, *Cystoseira myrica*, *Colpomenia sinuosa*, *Sargassum swartzii*, su samo neke od mrkih algi čiji ekstrakti su pokazali izraženu antioksidativnu aktivnost (Sithranga Boopathy i Kathiresan, 2011). Zabeleženo je da različiti polifenoli, flotanini, masne kiseline izolovani iz mrkih algi imaju snažne antioksidativne efekte (Gomez-Zavaglia i sar., 2019; Geiselman i McConnell, 1981; Zenthoefer i sar., 2017). Iz mrke alge *Eisenia bicyclis* su izolovani floroglucinol i njegovi polimeri ekol, florofukoekol i diekol sa izraženom antioksidativnom aktivnošću (Sithranga Boopathy i Kathiresan, 2011).

### 1.5. Dijabetes i enzim $\alpha$ -glukozidaza

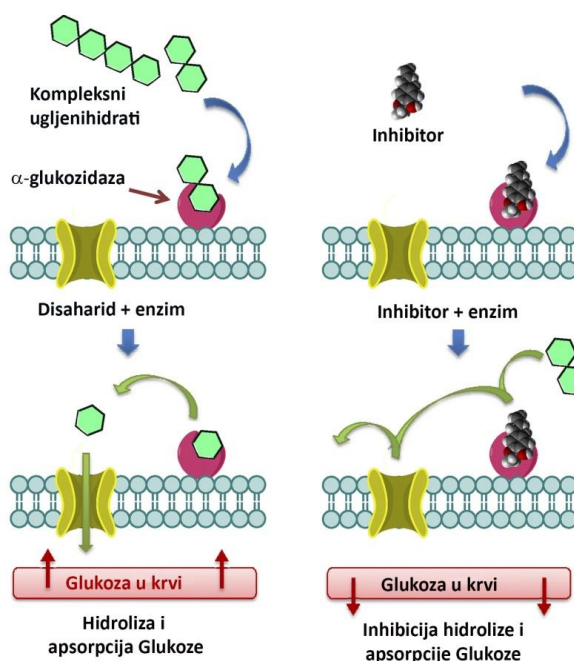
Dijabetes melitus je metabolički poremećaj nastao usled relativnog ili apsolutnog nedostatka insulina, koji za posledicu ima hroničnu hiperglikemiju. Postoje dva osnovna tipa dijabetesa: tip 1, koji je insulin zavisna i tip 2 koji nije insulin zavisna. Dijabetes tipa 1 je hronična bolest u kojoj pankreas ne luči insulin ili ga luči u vrlo maloj količini. Dijabetes tipa 2 je uslovljen relativnim nedostatkom insulina usled pojave insulinske rezistencije, najčešće uzrokovane nepravilnom ishranom, gojaznošću i odsustvom fizičke aktivnosti (Goyal i Jialal, 2020; (Kharroubi i Darwish, 2015). Kod dijabetesa tipa 2 dešavaju se promene i u metabolizmu lipida (Gunathilaka i sar., 2020). Dijabetes tipa 2 je najčešći oblik dijabetesa i čini oko 95% svih slučajeva obolelih. Dijabetes je



dvanaesti uzrok smrtnosti na svetu (WHO, Diabetes, 2016). Pristup lečenju dijabetesa obuhvata kako normalizaciju nivoa glukoze u krvi tako i sprečavanje dugoročnih posledica kao što su srčani udar, moždani udar, oštećenje krvnih sudova i bubrega, neuropatije, povećani rizik za infekcije i slepilo (Giovannucci i sar., 2010; Gunathilaka i sar., 2020).

Epidemiološke studije dovode u vezu incidence kancera i dijabetesa. Ljudi oboleli od dijabetesa imaju veću šansu da razviju neki oblik kancera, a sam dijabetes i njegovo lečenje mogu uticati na ishod lečenja i prognozu kod obolelih od kancera. Kada je organizam u stanju produžene hiperinsulinemije, hiperglikemije ili hronične inflamacije, stvaraju se povoljni uslovi za nastanak maligne transformacije ćelija i nastanak kancera (Giovannucci i sar., 2010).

Enzim  $\alpha$ -glukozidaza se nalazi na membrani enterocita u tankom crevu gde katalizuje razlaganje složenih ugljenih hidrata do glukoze (Bräunlich i sar., 2013; Wang i sar., 2013). Tako dobijena glukoza se može transportovati u enterocite tankog creva, a dalje, kroz bazalnu i lateralnu membranu i u krvotok, što dovodi do povećanja nivoa glukoze u krvi. Inhibiranjem  $\alpha$ -glukozidaze, dolazi do smanjenja hiperglikemije nakon obroka, što je važno za prevenciju i lečenje dijabetesa tipa 2 (Palanuvej i sar., 2009), (Slika 7).



**Slika 7.** Mehanizam dejstva i inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze inhibitorima poput akarboze. Preuzeto i modifikovano iz: (Singh et al., 2016).

### 1.5.1. Antidijabetička aktivnost mrkih algi

Farmakološki pristup lečenju dijabetesa tipa 2 čine lekovi koji mogu uticati na sekreciju insulina, povećati osetljivost ćelija na insulin, smanjiti oslobađanje glukoze iz jetre ili delovati na smanjenje inicijalne apsorpcije glukoze u taknom crevu. Naime, inhibiranjem enzima koji razlažu složene ugljene hidrate do glukoze može se onemogućiti unos glukoze u organizam. Važna klasa lekova kao što su akarboza, miglitol, vogliboza i drugi, ima ulogu u kontrolisanju dijabetesa putem inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze (Singh et al., 2016). Ovi lekovi kao i drugi savremeni načini lečenja dijabetesa imaju brojne nuspojave ili ograničeno dejstvo (Bischoff, 1995). Zato je potraga za novim antidijabeticima usmerena između ostalog i na izolaciju aktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora. Alge se inače koriste u ishrani te mogu biti dobar izvor aktivnih supstanci sa antidijabetičkim potencijalom.

Antidijabetički potencijal mrkih algi se ogleda u sposobnosti florotanina, fukoksantina i fukosterola, sulfatisanih polisaharida i masnih kiselina da direktno utiču na smanjenje nivoa

glukoze u krvi inhibitornim delovanjem na enzime  $\alpha$ -glukozidazu,  $\alpha$ -amilazu, protein-tirozin-fosatazu 1B, dipeptidil peptidazu-4 (Gunathilaka i sar., 2020). Indirektni efekat ovih jedinjenja iz algi potiče od njihove sposobnosti da inhibirajući određene enzime smanje komplikacije kod osoba koje su već obolele od dijabetesa. Tako, oni mogu inhibirati aldoznu reduktazu, angiotenzin konvertujućeg enzima (engl. *angiotensin-converting enzyme*, ACE) i stvaranje krajnjih produkata glikacije i tako doprineti u smanjenju kardiovaskularnih komplikacija, nefropatije, neuropatije i retinopatije (Ramasamy Ravichandran i Goldberg Ira J., 2010; Solski i Longyhore, 2008; Bischoff, 1995). Proučavane familije mrkih algi koje imaju antidijabetički potencijal su između ostalih i Lessoniaceae, Ishigeaceae, Sargassaceae, Fucaceae, Laminariaceae, Alariaceae i Dictyotaceae (Gunathilaka i sar., 2020).

## 1.6. Infekcije i patogeni mikroorganizmi

U savremenoj medicini sve je češća pojava rezistencije patogenih mikroorganizama na sve postojeće antibiotike i antimikotike. Usled česte primene antimikrobnih lekova, mikroorganizmi koji čine normalnu floru humanog organizma, mogu postati rezistentni na antimikrobne agense. Oni zatim mogu preneti rezistenciju i patogenim sojevima (Dunai i sar., 2019; McInnes i sar., 2020). Rezistentni patogeni mikroorganizmi predstavljaju naročito veliki problem u lečenju osetljivih imunokompromitovanih pacijenata kao što su oboleli od malignih bolesti, dijabetesa i AIDS-a (engl. *acquired immune deficiency syndrome*). Bakterije i gljivice su najčešći uzroci infekcija onkoloških pacijenata, posebno u bolničkim uslovima (Rolston, 2017).

Bakterije su prokariotski organizmi. One nemaju ćelijske organele i jedro. Na površini imaju ćelijski zid, a genetička informacija je najčešće zapisana u vidu jednog lanca cirkularne DNK. Bakterije najčešće obrazuju kolonije, a razmnožavaju se bespolno: prostom deobom, pupljenjem, egzosporama, fragmentacijom kao i posebnim načinima razmene genetičkog materijala koje doprinosi stvaranju rezistencije na antibiotike: konjugacijom, transformacijom i transdukcijom. U odnosu na građu i hemijski sastav ćelijskog zida, bakterije se različito boje po Gramu, te odatle potiče i njihova glavna podela na Gram pozitivne (G+) i Gram negativne (G-) bakterije. Ćelijski zid G+ bakterija se sastoji samo od debelog sloja peptidoglukana, dok se kod G- sastoji od tankog sloja peptidoglukana koji je okružen specifičnom asimetričnom spoljašnjom membranom. Ako su uslovi sredine nepovoljni bakterije mogu obrazovati spore, dok se deobe u povoljnim uslovima mogu dešavati i na 20 minuta (Madigan i sar., 2019).

Zbog nepovoljnog uticaja na imunski sistem, hemioterapeutici, naročito kada se primenjuju kod hematoonkoloških pacijenata povećavaju mogućnost razvoja infekcija patogenim bakterijama, posebno streptokokama, kao i vrstama *Listeria monocytogenes* i *Pneumocystis carinii* (Singh i Bonomo, 2016; Vento i Cainelli, 2003). Infekcije uzrokovane G- sojevima koje se javljaju kod onkoloških pacijenata su najčešće izazvane vrstama: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. i *Pseudomonas aeruginosa*. U porastu je incidenca bolničkih infekcija izazvanih G- bakterijama koje su sve češće otporne na sve vrste antibiotika. Najčešći uzročnici ovih infekcija potiču od sledećih G- vrsta: *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp. i *Pseudomonas* spp. (Rolston, 2017). Najčešće izolovane vrste G+ bakterija kod onkoloških pacijenata su: *Staphylococcus aureus*, koagulaza negativne stafilokoke, *Enterococcus* spp. i *Streptococcus viridans* (Vento i Cainelli, 2003).

Gljivice su eukariotski organizmi. Gljivični patogeni mogu biti kvasci i plesni. Kvasci su jednoćelijski organizmi, dok plesni formiraju razgranate filamente (hife) koji mogu biti podeljeni i septama. Hife se mogu međusobno preplitati i formirati micelijum. Mnoge gljivice su dimorfne, što znači da mogu formirati micelije, ali i postojati kao jednoćelijski oblici. Primer je *Histoplasma*, koja u laboratorijskoj kulturi formira hife i micelijum, dok, kada u organizmu izaziva histoplazmozu, postoji u jednoćelijskoj formi. U formi plesni formiraju se spore koje mogu biti polne i bespolne (konidije). Generlno gljivice se mogu razmnožavati aseksualno (sporama (konidijama), prostom ćelijskom deobom ili rastom i širenjem hifa) i seksualno sporama (Madigan i sar., 2019).

Gljivične infekcije mogu biti površinske ali i sistemske, koje godišnje u svetu odnose 1.5 miliona života. Antifungalni lekovi su često veoma toksični za sam organizam. Sistemske infekcije imaju stopu smrtnosti i do 50%. Rizici koji doprinose javljanju fungalnih infekcija kod onkoloških pacijenata su primena hemio i radio terapije, a zatim i postojanje prethodnih gljivičnih infekcija, izloženost gljivicama iz spoljašnje sredine, upotreba antibiotika širokog spektra, steroida i upotreba intravenskih katetera (Singh i Bonomo, 2016; Vento i Cainelli, 2003).

Najčešće gljivične infekcije kod ljudi, izazivaju vrste koje mogu živeti u samom čoveku, kao što su gljivice iz roda *Candida* ili koje se nalaze u spoljašnjoj sredini, kao što su gljivice iz rodova *Aspergillus*, *Cryptococcus* i *Pneumocystis* (Rolston, 2017; Singh i Bonomo, 2016; Vento i Cainelli, 2003). Kod pacijenata sa neutropenijom česte su i infekcije gljivicama iz roda *Aspergillus* i to *Aspergillus fumigatus* ili *A. flavus*. Gljivice koje ređe izazivaju sistemske infekcije pripadaju rodovima *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhizopus* i *Rhizomucor* (Vento i Cainelli, 2003).

### 1.6.1. Antimikrobna aktivnost mrkih algi

Ekstrakti algi mogu biti značajan izvor novih antibakterijskih agenasa. Antimikrobne supstance iz prirodnih izvora mogu doprineti prevazilaženju problema rezistencije na postojeća antimikrobna sredstva kao i manjoj toksičnosti za organizam. Ekstrakti algi i jedinjenja izolovana iz algi kao što su steroli, fenoli, masne kiseline i heterociklična jedinjenja, između ostalih, pokazuju antimikrobnu aktivnost (Daglia, 2012; Pérez i sar., 2016; Shannon i Abu-Ghannam, 2016). Mnoga od ovih jedinjenja imaju antiseptičko dejstvo. Lakton pod nazivom fimbrolid iz alge *Delisea pulchra* se pokazao efikasnim kod lečenja hronične infekcije pluća izazvane bakterijom *Pseudomonas aeruginosa* (Pal i sar., 2014).

Dihlormetanolni i etanolni ekstrakti algi *Cystoseira brachycarpa*, *C. compressa*, *Fucus vesiculosus*, i *Gelidium sesquipedale* sa atlanske obale Maroka su pokazali antibakterijsko dejstvo na G+ (*B. subtilis* i *S. aureus*) i G- (*E. coli* i *P. aeruginosa*) bakterije kao i antifungalno dejstvo na *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans* (Oumaskour i sar., 2012). Freile-Pelegriń i Morales su ispitali i aktivnost etanolnih i liposolubilnih ekstrakata algi sa obala Jukatana i zaključili da je 80% ispitivanih vrsta imalo antibakterijsko dejstvo na G+ bakterije (Freile-Pelegriń i Morales, 2004). Pokazano je i antifungalno dejstvo mrke alge *Spatoglossum asperum* prema *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* i *Candida tropicalis* (Freile-Pelegriń i Morales, 2004; Pal i sar., 2014).

## 2. Ciljevi istraživanja

Na osnovu podataka iz literature i rezultata naših preliminarnih ispitivanja dve vrste algi *F. spiralis* i *F. virsoides* utvrđeni su ciljevi ove doktorske disertacije koji su obuhvatili ispitivanje biološkog odgovora odabranih tipova ćelija na dejstvo ekstrakata i frakcija ove dve vrste algi, njihovog hemijskog sastava, kao i ispitivanje uticaja sezonskih varijacija na hemijski sastav i biološku aktivnost ekstrakata i frakcija vrste *F. virsoides*, kroz postavljenje sledećih specifičnih ciljeva:

- Određivanje sastava masnih kiselina ekstrakata.
- Određivanje sadržaj ukupnih fenola.
- Ispitivanje veze između sezonskih varijacija u hemijskom sastavu i intenziteta biološke aktivnosti ekstrakata i frakcija endemične vrste alge *F. virsoides*.
- Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata i frakcija.
- Određivanje intenziteta citotoksične aktivnosti dihlormetan-metanolnog ekstrakata algi *F. spiralis* i *F. virsoides* i tri dobijene frakcije, prema humanim malignim ćelijskim linijama, kao i njihove selektivnosti u odnosu na normalnu humanu ćelijsku liniju, *in vitro*.
- Ispitivanje mehanizama citotoksičnog dejstva analizom efekata ekstrakata i frakcija na nivou ćelijskog ciklusa.
- Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na tip ćelijske smrti.
- Ispitivanje *in vitro* dejstva ekstrakata i frakcija na migraciju ćelija i angiogenezu.
- Ispitivanje *in vitro* antiglukozidazne aktivnosti ekstrakata algi i frakcija.
- Ispitivanje *in vitro* antimikrobne aktivnosti (antibakterijske i antifungalne) ekstrakata i frakcija.

## 3. Materijal i metode

### 3.1. Prikupljanje materijala i priprema ekstrakata i frakcija

Uzorci alge *F. spiralis* prikupljeni su u periodu od marta do aprila 2014. godine, na lokaciji Sidi Buzid, na Atlantskoj obali Maroka. Uzorci su determinisani u Francuskoj (Laboratoire de Cryptogamie, MNHN, Pariz, Francuska). Alga *F. virsoides* je prikupljena u Bokokotorskom zalivu, Crna Gora krajem septembra 2014. (jesenji uzorak) i u julu 2015. godine (letnji uzorak). Uzorci su determinisani u Prirodnjačkom muzeju u Podgorici.

Pre ekstrakcije uzorci su isprani slatkom vodom i osušeni na sobnoj temperaturi. Samlevene alge su ekstrahovane mešavinom dihlormetan:metanol (1:1) mešanjem na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija je ponavljana sve dok se nije dobio bezbojan filtrat. Filtrati su pomešani i uparivani pod vakumom (Heidolph instruments GmbH&Co., KG, Nemačka) na temperaturi ispod 45 °C. Ekstrakti su zatim suspendovani u 100 mL destilovane vode i sukcesivno ekstrahovani petroletrom (3x100 mL), etilacetatom (3x100 mL) i n-butanolom (3x100 mL). Dobijeni ekstrakti i frakcije su čuvani na -20 °C.

### 3.2. Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina iz suvih petroletarskih frakcija je određen gasno-hromatografskom metodom. Izvešena je derivatizacija masnih kiselina u isparljive metil-estre, transesterifikacijom korišćenjem rastvora hlorovodonične kiseline u metanolu, po protokolu Ichihara i Fukubayashi, 2010. Metil-estri masnih kiselina (engl. *fatty acid methyl esters*, FAME) su dalje analizirani gasnim hromatografom (7890A GC System, Agilent Technologies, Santa Klara, SAD) sa plameno-jonizacionim detektorom. Razdvajanje FAME je obavljeno na kapilarnoj koloni dimenzija 100 m x 0.25 mm x 0.2 µm (CP-Sil 88, Agilent Technologies, Santa Klara, SAD) uz korišćenje helijuma kao nosača, brzinom od 1 mL/min. Uzorci su ubrizgani na početnoj temperaturi kolone od 80 °C, dok je temperatura injektora bila 250 °C, a detektora 270 °C. Temperatura kolone je povećavana od 80 °C do 220 °C tempom od 4 °C/min. Nakon inkubacije od 5 min na 220 °C, temperatura kolone je povišena do 240 °C (4 °C/min) uz inkubaciju 10 min. Masne kiseline su identifikovane na osnovu vremena retencije u poređenju sa referentim standardima masnih kiselina (Supelco FAME Mix, Supelco/Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, SAD). Efikasnost kolone je prikazana kroz broj teorijskih platoa četiri standardne masne kiseline (palmitinske, oleinske, stearinske i linolne) u rasponu od 362870 do 649372, a ponovljivost odgovora je određena kao procenat relativne standardne devijacije (RSD%) uzastopnih merenja istog referentnog rastvora. RSD je bila u rasponu od 0.3% do 4.6%. Rezultati su prikazani kao procenti pojedinačnih masnih kiselina u ukupnoj količini suvih petroletarskih frakcija.

### 3.3. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima i frakcijama je izvršeno uz pomoć modifikovane Folin-Ciocalteu metode (Waterman i Mole, 1994). Po 200 µL razblaženja ekstrakta je dodato u 1 mL 10 puta razblaženog Folin–Ciocalteu reagensa (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, SAD). Uzorci su potom vorteksovani i inkubirani 4 min na sobnoj temperaturi. Zatim je dodato 800 mL natrijum-karbonata (75 g/L). Apsorbance su očitane nakon 120 minuta inkubacije i filtracije kroz 0.45 mm filter na sobnoj temperaturi na 765 nm. Takođe izmerena je i apsorbance serijskih razblaženja galne kiseline (0 µg/mL - 100 µg/mL) i konstruisana standardna kriva. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (engl. *gallic acid equivalent*, GAE) po gramu ispitivanih ekstrakata i frakcija. Eksperimenti su ponovljeni 3 puta. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti

sa standardnom devijacijom. Statistička analiza je izvršena korišćenjem jednofaktorske analize varijanse sa Takijevim testom (engl. Tukey test).

### 3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost ekstrakata i frakcija ispitivana je 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (engl. *1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl*, DPPH) testom, po proceduri koja je opisana ranije (Silva i sar., 2005), sa manjim modifikacijama. Ova metoda se zasniva na razmeni elektrona ili atoma vodonika između molekula antioksidanta iz ekstrakata i frakcija i DPPH radikala u rastvoru. Pod uticajem redukujućih agenasa DPPH radikal menja boju od ljubičaste do žute. Antioksidativna aktivnost je ispitana korišćenjem serija razblaženja ekstrakata i frakcija. Razblaženja ekstrakata i frakcija u zapreminama od po 100  $\mu\text{L}$  pomešana su sa 1400  $\mu\text{L}$ , 80  $\mu\text{mol}$  metanalnog DPPH rastvora. Nakon inkubacije od 20 minuta u mraku, uzorci su filtrirani kroz 0.45 mm filter. Apsorbance, su zatim, očitavane na spektrofotometru, na talasnoj dužini od 517 nm. Procenat inhibicije (PIn) izračunat je po formuli  $\text{PIn} (\%) = [(A_0 - A_i) / A_0] \times 100$ , gde je  $A_0$  apsorbance kontrole, a  $A_i$  apsorbance uzorka. Eksperimenti su ponovljeni 3 puta. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom. Eksperimenti su ponovljeni 3 puta. Statistička analiza je izvršena korišćenjem jednofaktorske analize varijanse praćena Takijevim testom.

### 3.5. Čelijske kulture i ispitivanje citotoksične aktivnosti

Čelijske linije koje su korišćene u eksperimentima su: HeLa (adenokarcinom grlića materice), MDA-MB-453 (adenokarcinom dojke), LS174T (kolorektalni adenokarcinom), A549 (adenokarcinom pluća), K562 (hronična mijeleoidna leukemija) MRC-5 (fetalni fibroblasti pluća), EA.hy926 (humane transformisane endotelne ćelije umbilikalne vene). Čelijske linije su gajene u hranljivom medijumu, u inkubatoru, na temperaturi od 37 °C u uslovima vlažnog vazduha (95%) sa 5% ugljen dioksida (v/v). Hranljivi medijum pod nazivom RPMI 164 je obogaćen dodavanjem 100 g/L toplotom inaktivisanog fetalnog seruma govečeta (engl. *fetal bovine serum*, FBS) na 56 °C, L-glutaminom (3 mmol/L), penicilinom (100 IU/mL), streptomycinom (100 mg/L) i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonskom kiselinom (HEPES) (25 mmol/L). Medijum je bikarbonatnim rastvorom podešen na pH 7.2. Za održavanje EA.hy926 čelijske linije korišćen je DMEM hranljivi medijum koji sadrži visok nivo glukoze (4.5 g/L) i natrijum piruvat.

Čelijske linije su nabavljene od "American Type Culture Collection" (Manassas, VA, SAD). HeLa, MDA-MB-453, LS174T, A549 i EA.hy926 adherentne čelijske linije su održavane u kulturi u vidu monosloja u kompletnom hranljivom medijumu, dok je K562 čelijska linija održavana u kulturi u suspenziji.

Čelije su zasejane u ploče sa 96 bunarića i to: HeLa ćelije - 2000 ćelija po bunariću; LS174T - 7000 ćelija po bunariću; A549, MDA-MB-453, K562, EA.hy926 i MRC5 linije - 5000 ćelija po bunariću. Čelije su ostavljene preko noći u inkubatoru kako bi se zalepile za dno bunarića. K562 ćelije, koje nemaju sposobnost adhezije, sipane su u ploče sledećeg dana kada su i napravljene radne koncentracije za tretman ekstrakata i frakcija.

Početne koncentracije rastvora ekstrakata i frakcija napravljene su u dimetilsulfoksidu (DMSO) u koncentracijama 50 mg/mL. Radne koncentracije rastvora napravljene su od početnih koncentracija rastvorenih u DMSO i odgovarajuće podloge. Finalne koncentracije kojima su ćelije tretirane bile su 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  i 12.5  $\mu\text{g/mL}$ . U kontrolnim bunarićima, na ćelije je aplikovan samo hranljiv medijum. Kao kontrola pozadinske reakcije korišćen je medijum bez ćelija u koju su dodate iste finalne koncentracije ekstrakata i frakcija kao i za tretirane ćelije, u triplicatu.

Citotoksična aktivnost ekstrakata i frakcija na preživljavanje ćelija ispitivana je mikrotetrazolijum testom (MTT). Postupak je utvrdio (Mosmann, 1983), a modifikaciju koju smo koristili opisali su (Ohno i Abe, 1991). U svaki bunarić, nakon 72 sata tretmana ekstraktima i

frakcijama, dodato je 10  $\mu$ L MTT rastvora (5 mg/mL u fosfatom puferisanom fiziološkom rastvoru (PBS)). Nakon inkubacije od 4 sata u svaki bunarić je dodato po 100  $\mu$ L rastvora dodecil sulfata (100 g/L) kako bi se rastvorili kristali formazana. Apsorbanca (A) je očitana 24 h kasnije na enzimsko-imunskom test čitaču (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) na talasnoj dužini od 570 nm. Intenzitet očitane apsorbance proporcionalan je broju živih ćelija. Kako bi se utvrdio procenat preživljavanja ćelija, apsorbanca očitana sa bunarića u kojima su se nalazile ćelije pod tretmanom ekstrakata i frakcija podeljena je sa apsorbancom kontrolnih ćelija gajenih samo u podlozi i pomnožena sa 100. Apsorbanca slepe probe oduzeta je od apsorbance odgovarajućih uzoraka pod tretmanom. IC<sub>50</sub> je definisana kao koncentracija ekstrakata i frakcija koja je smanjila preživljavanje ćelija za 50% od ukupnog broja ćelija. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri puta ponovljenih eksperimenata. Koeficijent selektivnosti je određen po formuli: IC<sub>50</sub> (MRC5)/IC<sub>50</sub> (maligno transformisanih ćelijskih linija).

### 3.6. Analiza faza ćelijskog ciklusa

Ćelije humanog adenokarcinoma - HeLa, suspendovane su u kompletnoj RPMI podlozi i zasejane u pločama sa po 6 bunarića (200000 ćelija po bunariću). Ćelije su ostavljene da se zalepe za dno bunarića 24 h u inkubatoru na 37 °C. Nakon inkubacije ćelije su tretirane koncentracijama IC<sub>50</sub> i 2xIC<sub>50</sub> (određenih MTT testom) ekstrakata i frakcija i vraćene u inkubator da bi se inkubirale još 24 h i 48 h (kako bi se proverio dozno i vremenski zavisni efekat ekstrakata i frakcija). Nakon inkubacije ćelije su tripsinizirane, centrifugirane 10 min na 2000 obrtaja i isprane sa 2 mL PBS-a. Potom su ponovo centrifugirane 5 minuta na 2000 obrtaja, a zatim fiksirane na ledu 70% etanolom (200  $\mu$ L PBS i 2 mL 70% etanola), metodom kap po kap uz neprestano vorteksovanje. Pre analize, uzorci su čuvani najmanje nedelju dana u zamrzivaču na -20 °C. Uzorci su zatim isprani u 2 mL PBS i nakon centrifugiranja tretirani rastvorom ribonukleaze A (100  $\mu$ g/mL; Sigma Aldrich, Belefonte, PA, SAD) u PBS (500  $\mu$ L) i ostavljeni da se inkubiraju na 37 °C, pola sata. Uzorci su zatim obojeni propidijum-jodidom koji se vezuje za DNK (engl. *propidium iodide*, PI, Sigma Aldrich, Belefonte, PA, SAD) (40  $\mu$ g/mL) i nakon 10 minuta analizirani na protočnom citometru (Becton-Dickinson FACSCalibur, Becton Dickinson, San Hose, CA, SAD). Intenzitet fluorescencije je direktno proporcionalan količini DNK u svakoj ćeliji. Količina DNK je najniža u početnoj G1 fazi ćelijskog ciklusa. U S fazi, fazi replikacije, dolazi do povećanja količine DNK što rezultira dvostruko većom količinom DNK ćelija u G2 i M fazama u odnosu na ćelije u G1 fazi. Metodom protočne citometrije se može utvrditi i postojanje populacije ćelija koje su u apoptozi. Apoptotske ćelije poseduju znatno manju količinu DNK u odnosu na ćelije koje se nalaze u gore pomenutim fazama ćelijskog ciklusa. Fragmentisana DNK koja se nalazi u apoptotičnim ćelijama se gubi tokom procesa bojenja ili se distribuira u apoptotska tela, tako da samo mali deo DNK ostaje u apoptotskim ćelijama. Populacija ćelija u apoptozi je predstavljena kao Sub-G1 faza, koja se nalazi ispred G1 faze na DNK histogramu, nakon analize na protočnom citometru (Pozarowski i Darzynkiewicz 2004). Sadržaj DNK i raspored ćelija po fazama ćelijskog ciklusa analiziran je CellQuestR (Becton Dickinson, San Hose, CA, SAD) programom uzimajući za analizu 10000 ćelija po uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost dva puta ponovljenih eksperimenata.

### 3.7. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti

HeLa ćelije su zasejane u količini od 50000 ćelija po bunariću, u ploče sa po 6 bunarića, u kojima su prethodno postavljena mikroskopska pokrovna stakla u 2 mL kompletnog RPMI medijuma. Nakon 24 h athezije ćelija za pokrovna stakla, zamenjen je medijum u svim bunarićima i to sa: 2 mL kompletnog RPMI medijuma u kontrolnim bunarićima, odnosno sa 2 mL testiranih ekstrakata i frakcija u 2xIC<sub>50</sub> koncentracijama (razblaženih u kompletnom RPMI medijumu). Nakon inkubacije od 24 h uzorci su bojani mešavinim boja (po 20  $\mu$ L) akridin-oranž i etidijum-bromid (u koncentracijama 3  $\mu$ g/mL akridin-oranža i 10  $\mu$ g/mL etidijum-bromida u fosfatnom puferu (PBS)). Mikrografije su slikane upotrebom fluorescentnog mikroskopa Zeiss PALM

MicroBeam sa AxioObserver.Z1 uz korišćenje AxioCam MRm - filteri Alexa 488 i 568 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Nemačka).

### **3.8. *In vitro* ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju ćelijske migracije**

*In vitro* ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju ćelijske migracije je vršeno pomoću „scratch“ eseja (Damjanovic i sar., 2016). EA.hy926 ćelije su sadene u ploče sa po 24 bunarića (70000 ćelija po bunariću) u kompletnoj DMEM hranljivoj podlozi. Nakon 24 h ćelije su formirale monosloj na dnu svakog od bunarića, u kojem je zatim napravljen pravolinijski centralni kanal korišćenjem p200 vrha pipete. Nakon ispiranja hranljivim medijumom i fotografisanja uz pomoć invertnog mikroskopa, ćelije su tretirane subtoksičnim (IC<sub>20</sub>, 600 µL) koncentracijama ekstrakata i frakcija, dok je u kontroli dodato samo 600 µL podloge. Subtoksične koncentracije ekstrakata i frakcija, koje inhibiraju preživljavanje 20% ćelija nakon 24 h su određene preliminarnim MTT testom: vrsta *F. spiralis*: dihlormetan-metanolni ekstrakt 60.28 µg/mL, petroletarska 43.94 µg/mL, etilacetatna 33.94 µg/mL i n-butanolna frakcija 97.55 µg/mL; vrsta *F. virsoides* jesenji uzorak: dihlormetan-metanolni ekstrakt 87.99 µg/mL, petroletarska 94.29 µg/mL, etilacetatna 72.91 µg/mL i n-butanolna frakcija 122.13 µg/mL; letnji uzorak vrste *F. virsoides* dihlormetan-metanolni ekstrakt 147.24 µg/mL, petroletarska 156.61 µg/mL, etilacetatna 160.90 µg/mL i n-butanolna frakcija 161.84 µg/mL. Nakon inkubacije u CO<sub>2</sub> inkubatoru u trajanju od 24 h i 48 h ponovljeno je fotografisanje na istim mestima. U softveru otvorenog koda ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) izračunata je površina svakog kanala nakon 0 h, 24 h i 48 h, a zatim su preračunati procenti smanjenja centralnog kanala za svaki tretirani bunarić. Dakle, 0 h kontrolno vreme gde je širina kanala 100% i u odnosu na njega se određuje procenat smanjenja rastojanja između unutrašnjih ivica centralnog kanala. Dobijene vrednosti predstavljaju procenat smanjenja centralnog kanala i kvantitativno opisuju sposobnost ekstrakata ili frakcija da inhibiraju ćelijsku migraciju. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri puta ponovljenih eksperimenata.

### **3.9. Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju angiogeneze *in vitro***

Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju angiogeneze *in vitro* je vršeno po proceduri koju su opisali Aranda i Owen (2009). Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix je preko noći postepeno otapan na ledu, od temperature -20 °C, na kojem se čuva, do +4 °C. Na istu temperaturu (+4 °C) su ohlađeni i ploče sa 24 bunarića i nastavci za pipete. Ploče sa po 24 bunarića (koje su stajale na ledu) su obložene sa 200 µL hladne Corning® Matrigel® podloge. Ploče su potom inkubirane 2 h na 37 °C, u CO<sub>2</sub> inkubatoru, kako bi se formirao čvrst gel. Zatim su u bunariće zasađene EA.hy926 ćelije (40000 ćelija po bunariću, suspendovanih u 400 µL kompletne DMEM podloge). U kontrolne bunariće je dodavan samo hranljiv medijum dok su u ostale tretirane subtoksičnim (IC<sub>20</sub>) koncentracijama ekstrakata i frakcija, koje su navedene u metodi *in vitro* inhibicija ćelijske migracije (poglavlje 3.8). Nakon inkubacije od 20 h bunarići su fotografisani uz pomoć invertnog mikroskopa.

### **3.10. Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju α-glukozidaze**

Inhibicija α-glukozidaze je određena modifikovanom metodom koju su ranije opisali (Matsui i sar., 1996). α-glukozidaza (400 mU/mL, (Sigma-Aldrich, Belefonte, PA, SAD)) je rastvorena u 0.1 M fosfatnom puferu (pH = 6.7). U mikrotitarske ploče dodavano je po 50 µl



testiranih ekstrakata i frakcija (štok-rastvori 50 mg/mL u DMSO), razblaženih u fosfatnom puferu, tako da su finalne koncentracije u svakom bunariću bile 166.67 µg/mL, 83.33 µg/mL, 41.67 µg/mL, 20.83 µg/mL, 10.42 µg/mL i 5.21 µg/mL. Zatim je dodano po 50 µL rastvora enzima u svaki bunarić. Nakon inkubacije na 37 °C 15 min, dodano je 50 µL rastvora supstrata 1.5 mg/mL PNP-G (p-nitrofenil α-D-glukopiranozid, Sigma-Aldrich) u fosfatnom puferu. Očitane su apsorbance A1 na 405 nm. Nakon inkubacije od 15 min očitane su apsorbance A2, takođe na 405 nm. Akarboza (Sigma-Aldrich, Belefonte, PA, SAD ) je korišćena kao pozitivna kontrola. Procenat inhibicije enzima je izračunat po formuli  $100 \times (A2S - A1S) / (A2B - A1B)$ , gde A1B, A2B i A1S, A2S predstavljaju apsorbance slepih proba (fosfatni pufer, DMSO, rastvor enzima i supstrata PNP-G) i uzoraka. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri puta ponovljenih eksperimenata.

### 3.11. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i frakcija

#### 3.11.1. Mikroorganizmi i podloga

Bakterijske kulture koje su korišćene u eksperimentima su G+: *Bacillus cereus* (ATCC 10987), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); G- *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Proteus mirabilis* (ATCC 29906). Vrste gljivica koje su korišćene su: *Aspergillus niger* (ATCC 16888), *Mucor mucedo* (ATCC 20094), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533), *Candida albicans* (ATCC 10231) i *Penicillium italicum* (ATCC 10454). Svi sojevi bakterija i gljivica nabavljeni su od Američke kolekcije uzoraka kultura (ATCC). Mikroorganizmi su gajeni u Mikološkoj laboratoriji, Departmana za Biologiju Prirodno-matematičkog Fakulteta u Kragujevcu. Bakterijske kulture su održavane na Müller-Hinton agaroznom supstratu (Torlak, Beograd, Srbija). Kulture gljivica su gajene na krompirovom dekstroznom agaru (PD; Torlak, Beograd, Srbija) i Sabourad dekstroznom agaru (SD; Torlak, Beograd, Srbija). Kulture su čuvane na 4 °C i subkultivisane na svakih 15 dana.

Osetljivost mikroorganizama na ekstrakte i frakcije je ispitivana utvrđivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *minimum inhibitory concentration*, MIC). Inokulumi bakterija dobijeni su nakon 24 h inkubacije bakterija na Müller-Hinton agarском supstratu. Inokulumi su zatim i razblaženi sterilnom dejonizovanom vodom prema 0.5 McFarland standardu na 10<sup>8</sup> CFU/mL. Suspenzije spora gljiva su pripremljene od svežih, zrelih kultura starih 3 do 7 dana, koje su rasle na 30 °C na SD agaru. Spore su isprane sterilnom dejonizovanom vodom i razblažene do približno 10<sup>6</sup> CFU/ml po proceduri „*National Committee for Clinical Laboratory Standards*“, NCCLS (1998).

#### 3.11.2. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)

MIC je utvrđena mikrodilucionom metodom po Sarkeru, korišćenjem mikro-titarskih ploča sa po 96 bunarića (Sarker i sar., 2007). Mikroorganizmi su tretirani serijom razblaženja od 25 do 0.012 mg/mL testiranih ekstrakata i frakcija. U svaki bunarić je dodato po 100 µL bujona (Müller-Hinton ili SD), a zatim i serija dvostruko razblaženih ekstrakata i frakcija (100 µL). Potom je dodato po 10 µL resazurina (270 mg resazurina u 40 ml sterilne dejonizovane vode) kao i po 10 µL odgovarajućih inokuluma. Kako bi se utvrdio optimalni efekat dejstva ekstrakata i frakcija, nakon inkubacije od 24 h (bakterije) i od 48 h (gljivice) na 37 °C, određena je MIC vizualnom metodom. Resazurin je oksido-redukcioni indikator mikrobnog rasta. Kada se resazurin redukuje u resorufin, oksidoreduktazama u živim ćelijama, inicijalna plava boja se menja u fluorescentnu ljubičastu. Granično razblaženje bez promene boje resazurina je definisano kao MIC. Kao pozitivne kontrole korišćeni su antibiotik streptomycin za bakterije i ketokonazol za gljivice. DMSO je korišćen kao negativna kontrola, kako bi se isključio uticaj rastvarača. Svi eksperimenti su urađeni u triplikatu.

## 4. Rezultati

### 4.1. Sadržaj masnih kiselina u petroletarskim frakcijama

Sadržaj masnih kiselina određen je u petroletarskim frakcijama algi. Petroletar se zbog svoje nepolarosti koristi kao standardni rastvarač za ekstrakciju masnih kiselina, te se najveći sadržaj masnih kiselina očekuje upravo u ovoj frakciji. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 2. Najveći procenat zasićenih masnih kiselina (ZMK) je pronađen u uzorku vrste *F. spiralis* (46.58%), dok je najmanji procenat zabeležen u jesenjem uzorku vrste *F. virsoides* (31.26%). Detektovane ZMK u svim uzorcima su: palmitinska kiselina, miristinska kiselina, stearinska kiselina i pentadekanoinska kiselina, dok je laurinska kiselina detektovana samo u jesenjem uzorku vrste *F. virsoides*. Procenat mononezasićenih masnih kiselina (MNMK) bio je najveći u letnjem uzorku vrste *F. virsoides* (27.73%). Izmereni procenti MNMK u jesenjem uzorku vrste *F. virsoides* i u uzorku vrste *F. spiralis* su nešto manji, u odnosu na letnji uzorak vrste *F. virsoides*, ali međusobno slični (25.64% i 25.23% respektivno). Najveći udeo MNMK u svim uzorcima činila je oleinska kiselina, dok je u znatno manjem procentu bila zastupljena palmitoleinska kiselina. Jesenji uzorak vrste *F. virsoides* je imao najveći procenat polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) 37.24%, dok su uzorci vrsta *F. virsoides* (letnji) i *F. spiralis* imali znatno manje PNMK (26.00%, 23.26% respektivno). U svim uzorcima detektovane su sledeće PNMK: arahidonska kiselina,  $\alpha$ -linolenska kiselina, eikozapentaenska kiselina (EPA) i linolna kiselina, eikosadienoinska kiselina je pronađena u vrstama *F. spiralis* i jesenjem *F. virsoides*; dok je samo u jesenjem *F. virsoides* uzorku detektovana dihomogama-linolenska kiselina (DGLA). Najveći procenat n-9 masnih kiselina određen je u letnjem uzorku vrste *F. virsoides* (26.01%), dok je najveći procenat n-6 (22%) i n-3 (15.24%) masnih kiselina imao jesenji uzorak vrste *F. virsoides*. Najpovoljniji odnos PNMK/ZMK je zabeležen kod jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* (1.19).

Tabela 2. Sadržaj masnih kiselina u petroletarskim frakcijama vrsta *F. spiralis* i *F. virsoides*

Masne kiseline	Masne kiseline	PE-FVJ %	PE-FVL %	PE-FS %
Laurinska kiselina	C 12:0	0.52	/	/
Miristinska kiselina	C 14:0	11.22	13.62	16.24
Pentadekanoinska kiselina	C 15:0	1.18	0.57	0.7
Palmitinska kiselina	C 16:0	16.5	20.51	27.77
Stearinska kiselina	C 18:0	1.84	1.49	1.87
<b>∑ ZMK</b>	<b>∑ZMK</b>	<b>31.26</b>	<b>36.19</b>	<b>46.58</b>
Palmitoleinska kiselina	C 16:1	3.05	1.72	1.08
Oleinska kiselina	C 18:1 n-9	22.59	26.01	24.15
<b>∑ MNMK</b>	<b>∑ MNMK</b>	<b>25.64</b>	<b>27.73</b>	<b>25.23</b>
Linolna kiselina	C 18:2 n-6	5.38	5.45	3.27
$\alpha$ -linolenska kiselina	C 18:3 n-3	8.38	8.51	3.57
Eikosadienoinska kiselina	C 20:2 n-6	3.3	/	6.32
Arahidonska kiselina	C 20:4 n-6	12.61	8.38	6.15
Dihomo- $\gamma$ -linolenska kiselina	C 20:3 n-6	0.71	/	/
Eikozapentaenska kiselina	C 20:5 n-3	6.86	3.66	3.95
<b>∑ PNMK</b>	<b>∑ PNMK</b>	<b>37.24</b>	<b>26.00</b>	<b>23.26</b>
<b>PNMK/ZMK</b>	<b>PNMK/ZMK</b>	<b>1.19</b>	<b>0.72</b>	<b>0.50</b>
<b>∑ n-9</b>	<b>n-9</b>	<b>22.59</b>	<b>26.01</b>	<b>24.15</b>
<b>∑ n-6</b>	<b>n-6</b>	<b>22</b>	<b>13.83</b>	<b>15.74</b>
<b>∑ n-3</b>	<b>n-3</b>	<b>15.24</b>	<b>12.17</b>	<b>7.52</b>

U tabeli su istaknute povoljne vrednosti dobijenih procenata masnih kiselina; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; ZMK - zasićene masne kiseline; MNMK - mononezasićene masne kiseline; PNMK - polinezasićene masne kiseline

## 4.2. Određivanje ukupnih fenola

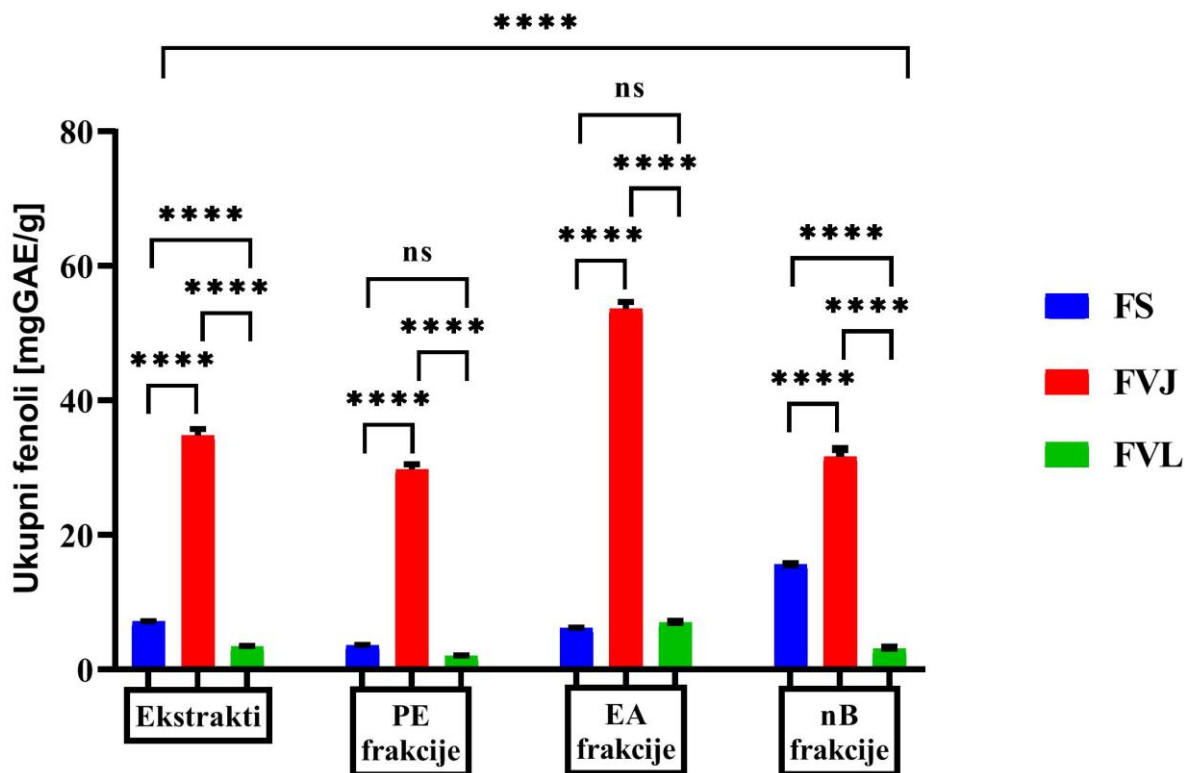
Rezultati analize sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima i frakcijama su prikazani u Tabeli 3 i na Slici 8. Najveći sadržaj ukupnih fenola u određen je u osnovnim ekstraktima vrste *F. virsoides*, a dosta manje u ekstraktu vrste *F. spiralis*, dok je najmanje ukupnih fenola bilo u letnjem ekstraktu vrste *F. virsoides*. Najviši sadržaj fenola od svih frakcija i ukupno (u odnosu na sve ispitivane ekstrakte i frakcije) je imala etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*, a zatim slede n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* i petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*. Frakcije sa znatno manjom količinom ukupnih fenola su redom: n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*, etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*, etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*, petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*, n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* i etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

**Tabela 3.** Sadržaj ukupnih fenola ekstrakata i frakcija vrsta *F. spiralis* i *F. virsoides*. Sadržaj ukupnih fenola je izražen kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE po gramu ispitivanih ekstrakata i frakcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom tri nezavisna eksperimenta. U tabeli je istaknuta najveća koncentracija ukupnih fenola.

Ekstrakti i frakcije	Ukupni fenoli mgGAE/g
<b>FS</b>	7.11±0.06
<b>PE-FS</b>	3.62±0.03
<b>EA-FS</b>	6.14±0.10
<b>nB-FS</b>	15.16±0.04
<b>FVJ</b>	34.78±0.96
<b>PE-FVJ</b>	29.73±0.78
<b>EA-FVJ</b>	<b>53.57±1.06</b>
<b>nB-FVJ</b>	31.59±1.17
<b>FVL</b>	3.41±0.09
<b>PE-FVL</b>	1.99±0.12
<b>EA-FVL</b>	7.00±0.06
<b>nB-FVL</b>	3.05±0.21

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS-etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ -ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*

## Ukupni fenoli



### Ekstrakti i frakcije

**Slika 8.** Sadržaj ukupnih fenola ekstrakta i frakcija algi.

Sadržaj ukupnih fenola je izražen kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE po gramu ispitivanih ekstrakata i frakcija). Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti sa standardnom devijacijom tri nezavisna eksperimenta. Statistička analiza je izvršena korišćenjem jednofaktorske analize varijanse sa Takijevim testom. (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns - nema značajnosti). FS - ekstrakt i frakcije vrste *F. spiralis*; FVJ - ekstrakt i frakcije jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt i frakcije letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE - petroletarske frakcije, EA - etilacetatne frakcije, nB - n-butanolne frakcije

### 4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Rezultati ispitivanja sposobnosti ekstrakata i frakcija da uklanjaju slobodne radikale (DPPH) prikazani su u Tabeli 4 i na Slici 9. Uzorak jesenjeg ekstrakta vrste *F. virsoides* je pokazao najjaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostale ekstrakte. Od svih testiranih uzoraka ekstrakata po aktivnosti zatim slede vrsta *F. spiralis*, pa letnji uzorak vrste *F. virsoides*. Jesenji uzorci frakcija *F. virsoides* su imali znatno jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na frakcije vrste *F. spiralis* i letnje uzorke vrste *F. virsoides*. Naime, najmanju  $IC_{50}$  vrednost DPPH aktivnosti pokazala je etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*, zatim n-butanolna i petroletarska frakcija. Po DPPH aktivnosti zatim slede frakcije vrste *F. spiralis*, etilacetatna frakcija, petroletarska frakcija i n-butanolna frakcija. Letnje frakcije *F. virsoides* su imale najslabiju DPPH aktivnost. Među letnjim ekstraktima koji su pokazali najslabiju antioksidativnu aktivnost, najjaču antioksidativnu aktivnost je imala etilacetatna frakcija.

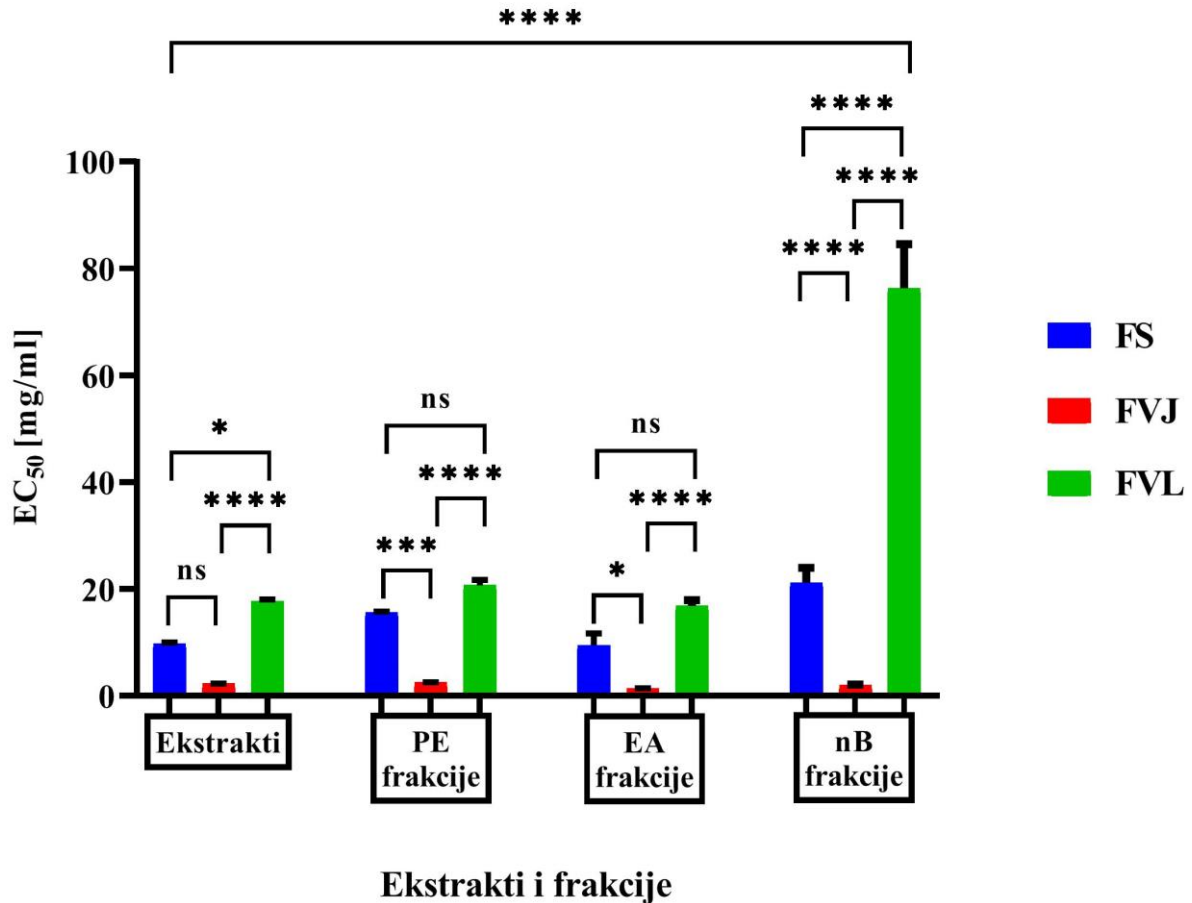
Sposobnost uklanjanja DPPH radikala predstavljena je kao EC<sub>50</sub> vrednost i izražena u mg/mL, Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. U tabeli je istaknuta najjača antioksidativna aktivnost.

**Tabela 4.** Antioksidativna aktivnost ekstrakata i frakcija.

Ekstrakti i frakcije	DPPH mg/mL
<b>FS</b>	9.78±0.20
<b>PE-FS</b>	15.67±0.11
<b>EA-FS</b>	9.48±2.17
<b>nB-FS</b>	21.16±2.77
<b>FVJ</b>	2.26±0.03
<b>PE-FVJ</b>	2.48±0.04
<b>EA-FVJ</b>	<b>1.38±0.05</b>
<b>nB-FVJ</b>	2.07±0.04
<b>FVL</b>	17.68 ± 0.4
<b>PE-FVL</b>	20.70±1.02
<b>EA-FVL</b>	16.86±1.08
<b>nB-FVL</b>	76.28±8.23

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS - etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ - ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*

## DPPH



**Slika 9.** Antioksidativna aktivnost ekstrakata i frakcija.

Sposobnost uklanjanja DPPH radikala predstavljena je kao EC<sub>50</sub> vrednost i izražena u mg/mL. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Statistička analiza je izvršena korišćenjem jednofaktorske analize varijanse sa Takijevim testom (\*\*\*\* p<0.0001, \*\*\*p < 0.001, \* p< 0.05, ns - nema značajnosti); FS - ekstrakt i frakcije vrste *F. spiralis*; FVJ - ekstrakt i frakcije jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt i frakcije letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE - petroletarske frakcije, EA - etilacetatne frakcije, nB - n-butanolne frakcije.

### 4.4. Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata i frakcija

Rezultati ispitivanja citotoksične aktivnosti su prikazani u Tabeli 5. HeLa ćelije su bile najosetljivije na dejstvo testiranih ekstrakata i frakcija. Najjači citotoksični efekat na HeLa ćelijama iskazali su ekstrakt i frakcije vrste *F. spiralis* i to petroletarska frakcija, etilacetatna frakcija i osnovni ekstrakt. Dobru citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama su pokazali i jesenji uzorci vrste *F. virsoides* i to petroletarska frakcija, osnovni ekstrakt i etilacetatna frakcija μg/mL. Letnji uzorci vrste *F. virsoides* su pokazali slabiju citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama u odnosu na vrstu *F. spiralis* i jesenje uzorke vrste *F. virsoides*. IC<sub>50</sub> vrednosti su bile u rasponu od 157.67±0.41 μg/mL za etilacetatnu frakciju do više od 200 μg/mL za n-butanolnu frakciju. Po osetljivosti na dejstvo ispitivanih ekstrakata i frakcija slede redom LS174T, K562, MDA-MB-453 i A549 maligne ćelijske linije. Ekstrakt i frakcije vrste *F. spiralis* su iskazale najjaču citotoksičnu aktivnost prema svim testiranim malignim ćelijskim linijama, odmah zatim slede osnovni ekstrakt i

frakcije jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* a najslabiju citotoksičnu aktivnost su iskazali osnovni ekstrakt i frakcije letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*. Etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis* je bila najaktivnija prema LS174T, K562, MDA-MB-453 i A549 ćelijama. Testirani ekstrakti i frakcije nisu pokazali citotoksični efekat prema normalnim MRC5 ćelijama u najvećoj testiranoj koncentraciji od 200 µg/mL.

Izračunavanje koeficijenta selektivnosti prikazanog u Tabeli 6, pokazalo je da je najveća selektivnost iskazana prema HeLa malignoj liniji u odnosu na normalnu MRC5 liniju i to od strane ekstrakta i frakcija vrste *F. spiralis* i jesenjih uzoraka vrste *F. virsoides*. Dobru selektivnost ostvarili su i osnovni ekstrakt, petroletarska i etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis* prema LS174T i K562 ćelijskim linijama, kao i etilacetatna frakcija prema MDA-MB-453 ćelijskoj liniji. U poređenju sa cisplatinom, skoro svi testirani ekstrakti i frakcije su pokazali veću selektivnost prema malignim ćelijskim linijama u odnosu na normalnu liniju.

**Tabela 5.** Citotoksična aktivnost ispitivanih ekstrakata i frakcija

U tabeli su predstavljene IC<sub>50</sub> vrednosti izražene u µg/mL, odnosno koncentracije ekstrakata i frakcija koje su inhibirale ćelijsko preživljavanje za 50%. Vrednosti IC<sub>50</sub> u tabeli su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija određene na osnovu tri nezavisna eksperimenta.

Ekstrakti i frakcije IC <sub>50</sub> , µg/mL	HeLa	LS174T	A549	MDA-MB-453	K562	MRC5
FS	52.18±3.21	81.75±4.60	147.41±1.25	105.90±2.32	78.27±0.67	>200
PE-FS	<b>43.74±7.85</b>	85.12±3.49	142.99±0.37	122.40±1.46	92.31±6.03	>200
EA-FS	47.25±1.32	<b>72.58±0.55</b>	<b>132.68±3.39</b>	<b>99.32±3.02</b>	<b>73.19±3.99</b>	>200
nB-FS	105.25 ±6.77	159.89±1.45	>200	121.51±2.59	102.31±7.07	>200
FVJ	53.91±1.48	138.68±4.99	183.40±2.86	133.83±5.98	114.05±1.28	>200
PE-FVJ	44.38±2.86	146.90±8.72	147.50±0.59	120.93±6.56	108.03±6.49	>200
EA-FVJ	55.85±9.91	120.33±4.55	143.40±0.98	107.78±8.89	112.12±1.14	>200
nB-FVJ	112±35.26	174±11.60	>200	151.09±4.27	141.35±3.37	>200
FVL	175.15±1.39	195.81±2.66	196.91±2.01	177.47±6.34	189.25±5.11	>200
PE-FVL	161.98±1.42	193.44±4.42	195.39±1.58	169.90±7.58	165.56±3.61	>200
EA-FVL	157.67±0.41	185.21±0.76	166.49±4.66	159.70±6.19	167.45±1.11	>200
nB-FVL	>200	>200	>200	192.85±0.53	193.29±2.56	>200
Cisplatina	19.26±0.22	30.94±2.73	26.08±0.47	29.92±0.45	25.18±1.60	18.53±0.13

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS - etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ - ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*;



EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

**Tabela 6.** Koeficijent selektivnosti u citotoksičnom dejstvu ispitivanih ekstrakata i frakcija.

Koeficijent selektivnosti predstavljen je kao IC<sub>50</sub> vrednost za MRC5 ćelijsku liniju/IC<sub>50</sub> vrednost za određenu malignu ćelijsku liniju. U tabeli su istaknute vrednosti najveće selektivnosti.

Ekstrakti i frakcije/ Koeficijent selektivnosti	HeLa	LS174T	A549	MDA-MB- 453	K562
<b>FS</b>	>3.83	>2.45	>1.36	>1.89	>2.56
<b>PE-FS</b>	> <b>4.57</b>	>2.35	>1.40	>1.63	>2.17
<b>EA-FS</b>	>4.23	> <b>2.76</b>	> <b>1.51</b>	> <b>2.01</b>	> <b>2.73</b>
<b>nB-FS</b>	>1.90	>1.25	/	>1.65	>1.95
<b>FVJ</b>	>3.71	>1.44	>1.09	>1.49	>1.75
<b>PE-FVJ</b>	>4.51	>1.36	>1.36	>1.65	>1.85
<b>EA-FVJ</b>	>3.58	>1.66	>1.39	>1.86	>1.78
<b>nB-FVJ</b>	>1.78	>1.14	/	>1.32	>1.41
<b>FVL</b>	>1.14	>1.02	>1.02	>1.13	>1.06
<b>PE-FVL</b>	>1.23	>1.03	>1.02	>1.18	>1.21
<b>EA-FVL</b>	>1.27	>1.08	>1.20	>1.25	>1.19
<b>nB-FVL</b>	/	/	/	>1.04	>1.03
<b>Cisplatina</b>	0.96	0.60	0.71	0.62	0.74

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS-etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ -ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

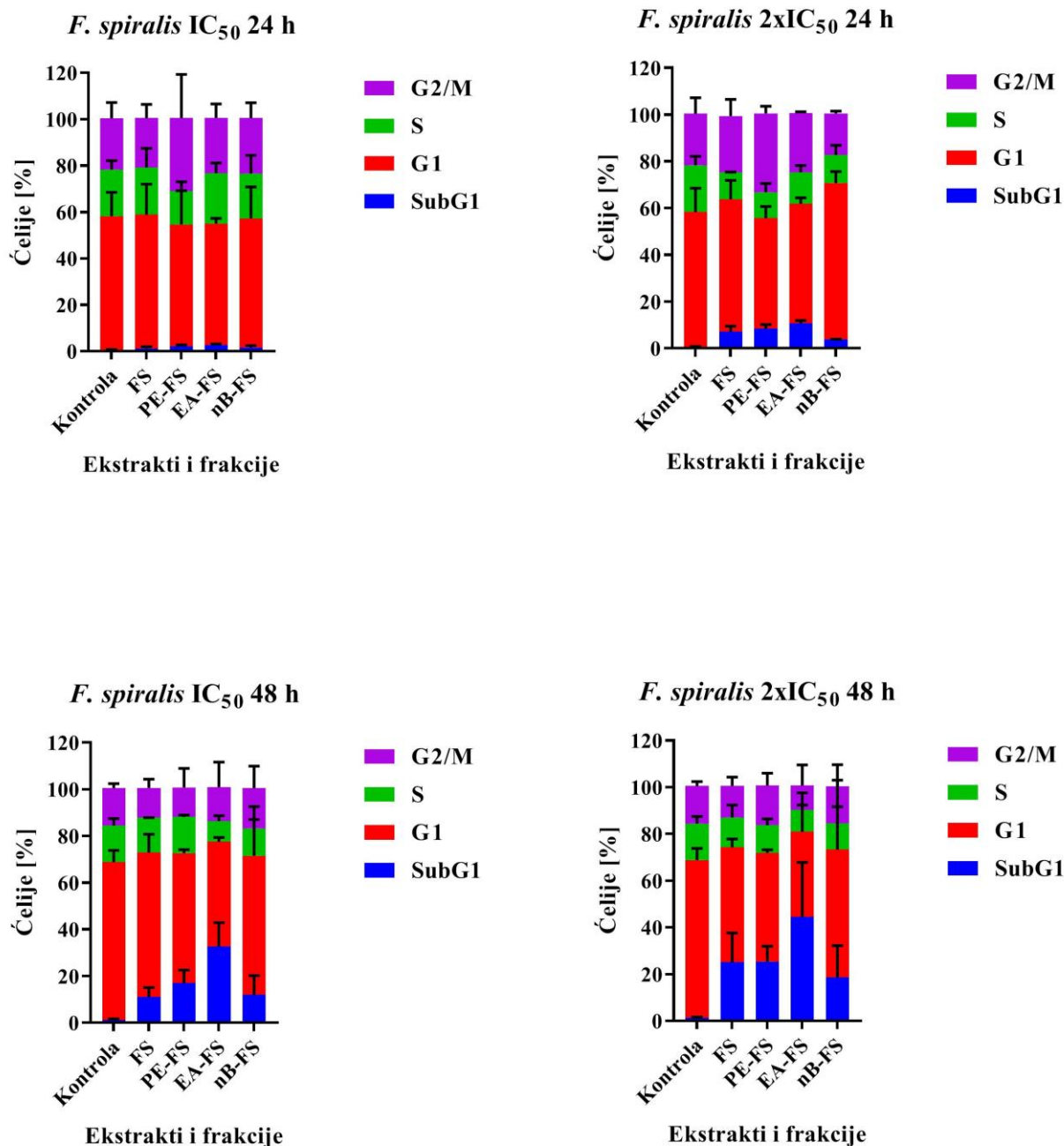
## 4.5. Analiza faza ćelijskog ciklusa

Analiza faza ćelijskog ciklusa HeLa ćelija tretiranih sa IC<sub>50</sub> koncentracijama ekstrakata i frakcija vrste *F. spiralis* nakon 24 h (Slika 10 i Tabela 7) je pokazala da je etilacetatna frakcija indukovala najveću akumulaciju HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa u poređenju sa netretiranom kontrolom. Ova frakcija je, takođe, izazvala akumulaciju ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim ćelijama. HeLa ćelije tretirane petroletarskom frakcijom su pokazale najveću akumulaciju u G2/M fazi. Pored toga, ova frakcija je indukovala i akumulaciju ćelija u subG1 fazi. Utvrđeno je i da izlaganje HeLa ćelija osnovnom ekstraktu i n-butanolnoj frakciji vrste *F. spiralis* dovodi do povećanja populacije u subG1 fazi. Nakon tretmana sa 2xIC<sub>50</sub> koncentracijama, najveću akumulaciju u subG1 fazi su pokazale ćelije tretirane etilacetatnim i petroletarskim frakcijama vrste *F. spiralis*. Osnovni ekstrakt i n-butanolna frakcija su, takođe, izazvale akumulaciju ćelija u subG1 fazi. Uočena je i akumulacija ćelija u G2/M fazi u prisustvu petroletarske, etilacetatne frakcije kao i osnovnog ekstrakta vrste *F. spiralis*.

Analiza ćelijskog ciklusa nakon 48 h (Slika 10 i Tabela 8) je pokazala doznu i vremensku akumulaciju ćelija u SubG1 fazi ćelijskog ciklusa i to najviše pod dejstvom etilacetatne frakcije vrste *F. spiralis*, a zatim i petroletarske, kao i osnovnog ekstrakta i n-butanolne frakcije.

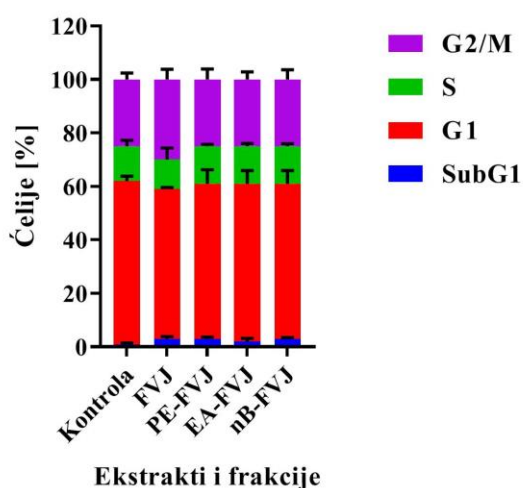
Distribucija ćelijskog ciklusa nakon tretmana ekstraktima i frakcijama vrste *F. virsoides* je prikazana na Slikama 11, 12 i Tabeli 7. Nakon 24 h tretmana HeLa ćelija jesenjim ekstraktom vrste *F. virsoides* zabeležen je povećani procenat ćelija u G2/M fazi, u poređenju sa kontrolom. Jesenji ekstrakt i petroletarska frakcija primenjeni u koncentracijama od 2xIC<sub>50</sub> su indukovali najveću akumulaciju ćelija u G2/M fazi, u poređenju sa kontrolom. Letnji ekstrakt i frakcije vrste *F. virsoides* su indukovali izraženiju akumulaciju u subG1 fazi ćelijskog ciklusa u poređenju sa jesenjim ekstraktima i frakcijama, pogotovo u 2xIC<sub>50</sub> koncentracijama. Od svih testiranih ekstrakata i frakcija vrste *F. virsoides* nakon 24 h etilacetatna i petroletarska letnja frakcija su indukovale najveću akumulaciju ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa.

Nakon 48 h (Slike 11, 12 i Tabela 8) zabeležena je, kao i u slučaju ekstrakata i frakcija vrste *F. spiralis*, dozna i vremenski zavisna akumulacija HeLa ćelija u SubG1 fazi ćelijskog ciklusa, tretiranih sa ekstraktima i frakcijama jesenjeg i letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*. Posmatrajući samo jesenji uzorak vrste *F. virsoides*, najveću akumulaciju u SubG1 fazi ćelijskog ciklusa indukovao je jesenji ekstrakt, zatim petroletarska frakcija, pa etilacetatna i n-butanolna. Letnji ekstrakt i frakcije su pokazali izraženiju akumulaciju u SubG1 fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na jesenje uzorke. Najveću akumulaciju ćelija u SubG1 fazi indukovala je etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*, a zatim i petroletarska frakcija.

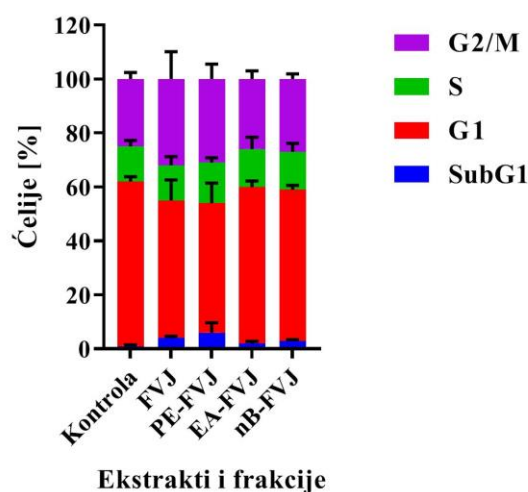


**Slika 10.** Uticaj ekstrakata i frakcija vrste *F. spiralis* na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h i 48 h pri koncentracijama IC<sub>50</sub> i 2xIC<sub>50</sub>. Na grafiku je predstavljen procenat ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa. Rezultati eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost ± standardna devijacija dva nezavisna eksperimenta. FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS-etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*.

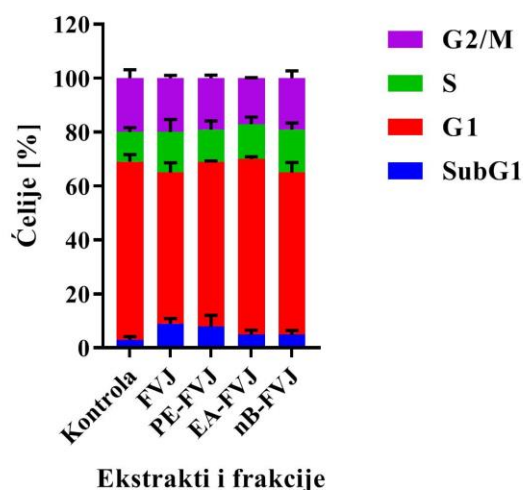
*F. virsoides* jesenji IC<sub>50</sub> 24 h



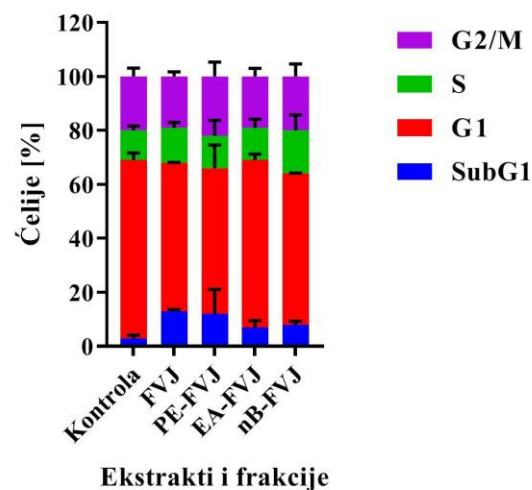
*F. virsoides* jesenji 2xIC<sub>50</sub> 24 h



*F. virsoides* jesenji IC<sub>50</sub> 48 h

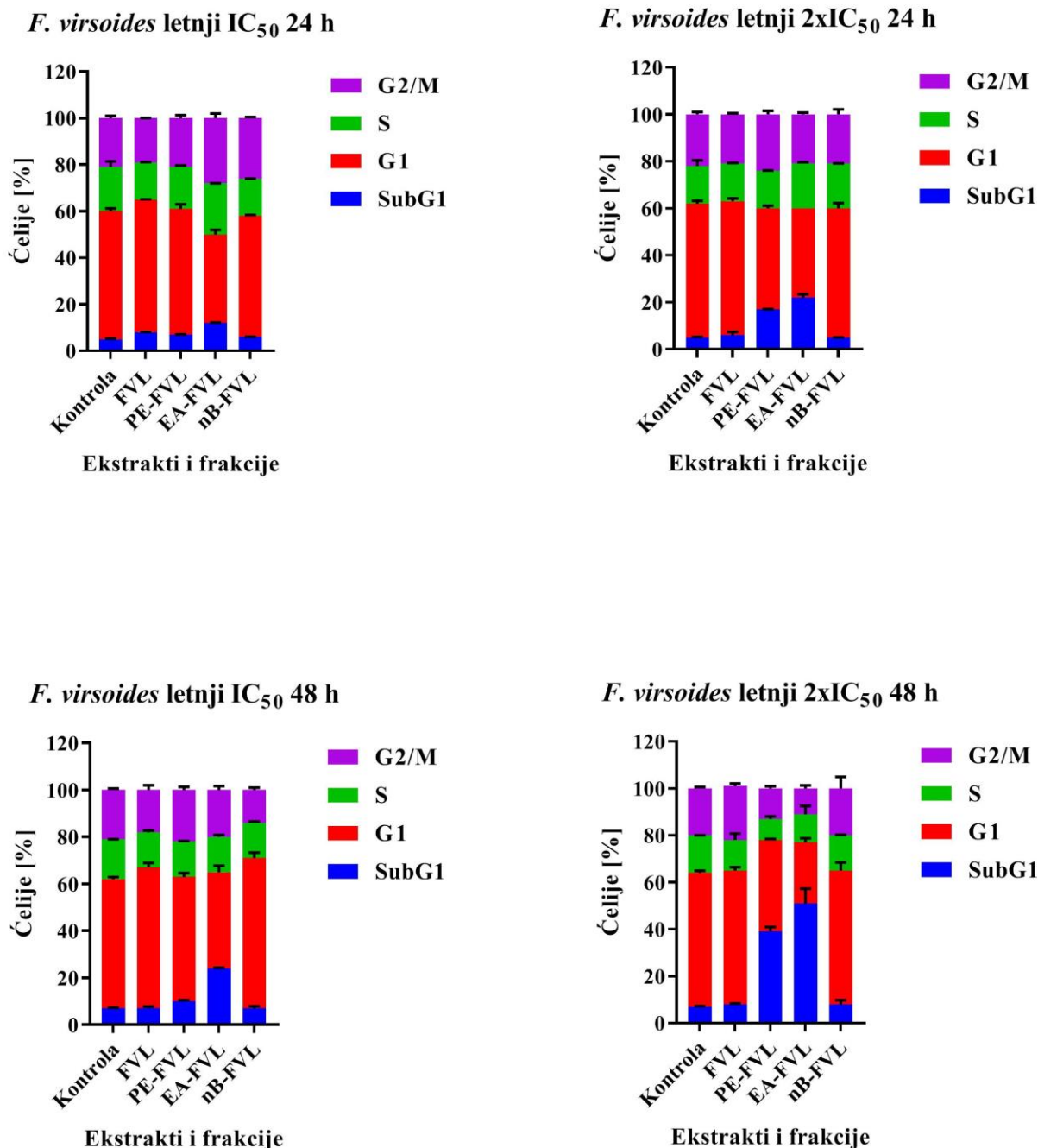


*F. virsoides* jesenji 2xIC<sub>50</sub> 48 h



**Slika 11.** Uticaj ekstrakata i frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h i 48 h pri koncentracijama IC<sub>50</sub> i 2xIC<sub>50</sub>.

Na grafiku je predstavljen procenat ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa. Rezultati eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost ± standardna devijacija dva nezavisna eksperimenta. FVJ -ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*.



**Slika 12.** Uticaj ekstrakata i frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h i 48 h pri koncentracijama IC<sub>50</sub> i 2xIC<sub>50</sub>.

Na grafiku je predstavljen procenat ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa. Rezultati eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost ± standardna devijacija dva nezavisna eksperimenta. FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

**Tabela 7.** Uticaj ekstrakata i frakcija na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h pri koncentracijama IC<sub>50</sub> i 2xIC<sub>50</sub>.

U tabeli su predstavljeni procenti ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija dva nezavisna eksperimenta.

24 h	Ekstrakti i frakcije	SubG1 %	G1 %	S %	G2/M %
IC <sub>50</sub>	Kontrola	0.38±0.33	57.94±10.19	20.03±3.83	22.08±6.79
	FS	1.21±0.72	57.67±13.12	20.40±8.15	21.23±5.92
	PE-FS	2.16±0.61%	52.53±14.52	14.37±3.96	31.42±18.88
	EA-FS	2.73±0.42	52.36±2.23	21.61±4.45	23.89±6.05
	nB-FS	1.66±0.79	55.64±19.36	19.36±7.85	23.83±6.60
	Kontrola	1.16±0.48	60.94±1.79	12.55±2.24	24.73±2.38
	FVJ	3.14±0.84	56.93±0.57	10.87±4.33	29.95±3.82
	PE-FVJ	2.73±0.69	59.02±5.22	13.86±0.72	24.78±3.89
	EA-FVJ	2.32±1.19	59.46±4.94	14.28±1.05	24.37±2.83
	nB-FVJ	2.86±0.45	58.33±4.88	14.38±0.93	24.92±3.62
	Kontrola	5.02±0.30	56.03±1.24	17.49±2.41	22.07±1.05
	FVL	8.42±0.07	57.09±0.16	15.82±0.12	19.30±0.11
	PE-FVL	7.01±0.11	54.06±2.02	18.19±0.65	21.37±1.35
	EA-FVL	11.88±0.18	39.09±1.99	22.01±0.08	27.85±2.04
nB-FVL	6.44±0.07	51.57±0.38	16.14±0.02	26.42±0.47	
2xIC <sub>50</sub>	Kontrola	0.38±0.33	57.94±10.19	20.03±3.83	22.08±6.79
	FS	7.72±2.31	56.60±7.97	11.49±0.18	24.08 ±7.14
	PE-FS	8.50±1.72	47.15±5.10	11.13±3.78	33.77±3.10
	EA-FS	10.69±1.16	51.17±2.52	13.51±2.89	25.28±0.54
	nB-FS	3.83±0.11	66.92±4.84	11.99±4.17	17.73±1.07
	Kontrola	1.16±0.48	60.94±1.79	12.55±2.24	24.73±2.38
	FVJ	3.79±0.69	52.04±7.64	12.79±3.23	31.82±10.14
	PE-FVJ	5.72±3.71	48.37±7.40	15.24±1.83	31.23±5.48
	EA-FVJ	2.46±0.79	57.88±2.18	14.42±4.41	25.65±3.01
	nB-FVJ	2.67±0.32	57.10±1.63	13.62±3.12	27.10±1.87
	Kontrola	5.02±0.30	56.03±1.24	17.49±2.41	22.07±1.05
	FVL	6.48±1.38	56.94±1.19	16.31±0.30	20.83±0.52
	PE-FVL	17.25±0.12	43.23±1.11	16.45±0.18	23.85±1.48
	EA-FVL	21.56±1.44	38.85±0.04	19.30±0.64	21.11±0.70
nB-FVL	4.71±0.01	55.37±2.20	18.96±0.15	21.42±2.11	

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS-etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ -ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

**Tabela 8.** Uticaj ekstrakata i frakcija na distribuciju HeLa ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa nakon 48 h pri koncentracijama IC<sub>50</sub> i 2xIC<sub>50</sub>.

U tabeli su predstavljeni procenti ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija dva nezavisna eksperimenta.

48 h	Ekstrakti i frakcije	SubG1 %	G1 %	S %	G2/M %
IC <sub>50</sub>	Kontrola	1.24±0.39	67.55±5.07	15.67±2.98	16.06±1.92
	FS	11.06±4.05	61.88±7.80	14.88±0.06	12.78±3.68
	PE-FS	16.95±5.69	55.64±1.58	15.46±0.86	12.68±8.05
	EA-FS	32.69±10.18	44.82±1.84	8.90±2.24	14.49±10.69
	nB-FS	12.02±8.20	59.48±21.04	11.75±3.77	17.24±9.45
	Kontrola	2.52±1.13	67.14±2.61	10.95±1.66	19.74±3.14
	FVJ	8.85±1.92	56.42±3.65	14.89±4.63	20.34±1.02
	PE-FVJ	7.60±4.09	61.47±0.29	11.96±3.15	19.44±1.08
	EA-FVJ	4.59±1.61	65.77±0.88	13.01±2.53	17.07±0.18
	nB-FVJ	4.70±1.48	61.17±3.77	15.51±2.40	19.15±2.67
	Kontrola	7.19±0.25	56.02±0.92	16.50±0.05	20.90±0.58
	FVL	7.03±0.72	61.31±1.94	14.73±0.74	17.52±1.98
	PE-FVL	9.96±0.44	54.15±1.58	15.01±0.26	21.57±1.32
	EA-FVL	23.66±0.29	41.47±2.76	14.99±0.83	20.50±1.73
nB-FVL	7.20±0.84	64.06±2.31	14.79±0.55	14.43±0.98	
2xIC <sub>50</sub>	Kontrola	1.24±0.39	67.55±5.07	15.67±2.98	16.06±1.92
	FS	25.08±12.54	49.28±3.52	12.72±5.35	13.56±3.68
	PE-FS	25.44±6.51	46.46±1.34	11.82±2.77	16.97±5.32
	EA-FS	44.44±23.38	36.49±16.67	9.48±2.01	10.31±8.77
	nB-FS	18.74±13.54	54.64±29.63	11.18±7.09	15.83±9.25
	Kontrola	2.52±1.13	67.14±2.61	10.95±1.66	19.74±3.14
	FVJ	13.30±0.56	56.16±0.17	12.51±1.97	18.54±1.65
	PE-FVJ	11.65±9.01	54.51±8.50	12.00±5.74	22.44±5.27
	EA-FVJ	7.03±2.48	62.65±2.23	11.65±3.12	19.14±2.99
	nB-FVJ	8.39±1.27	56.04±0.19	15.73±5.75	20.49±4.58
	Kontrola	7.19±0.25	56.02±0.92	16.50±0.05	20.90±0.58
	FVL	8.45±0.39	55.37±1.46	13.42±2.74	22.94±1.15
	PE-FVL	39.50±1.93	39.08±0.43	9.16±1.05	13.25±0.93
	EA-FVL	50.85±6.30	26.90±1.72	11.58±3.45	11.47±1.27
nB-FVL	7.53±1.82	58.00±3.39	14.93±0.21	20.10±4.95	

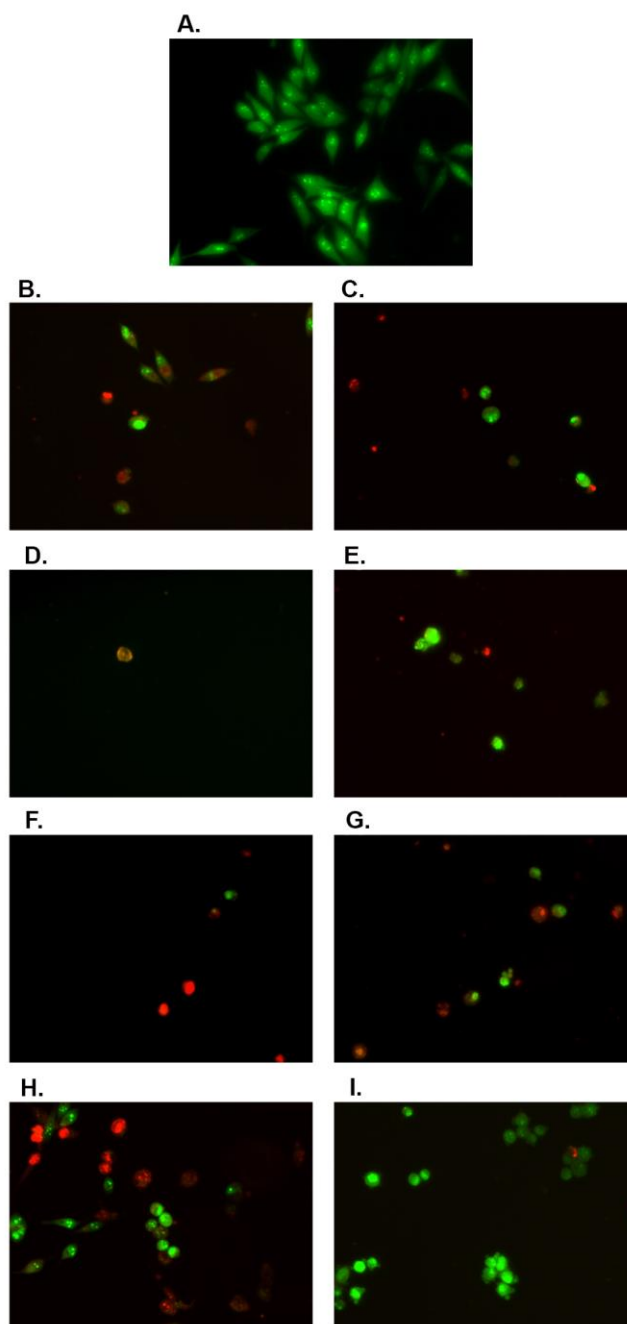
FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS-etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ -ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.



## 4.6. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti

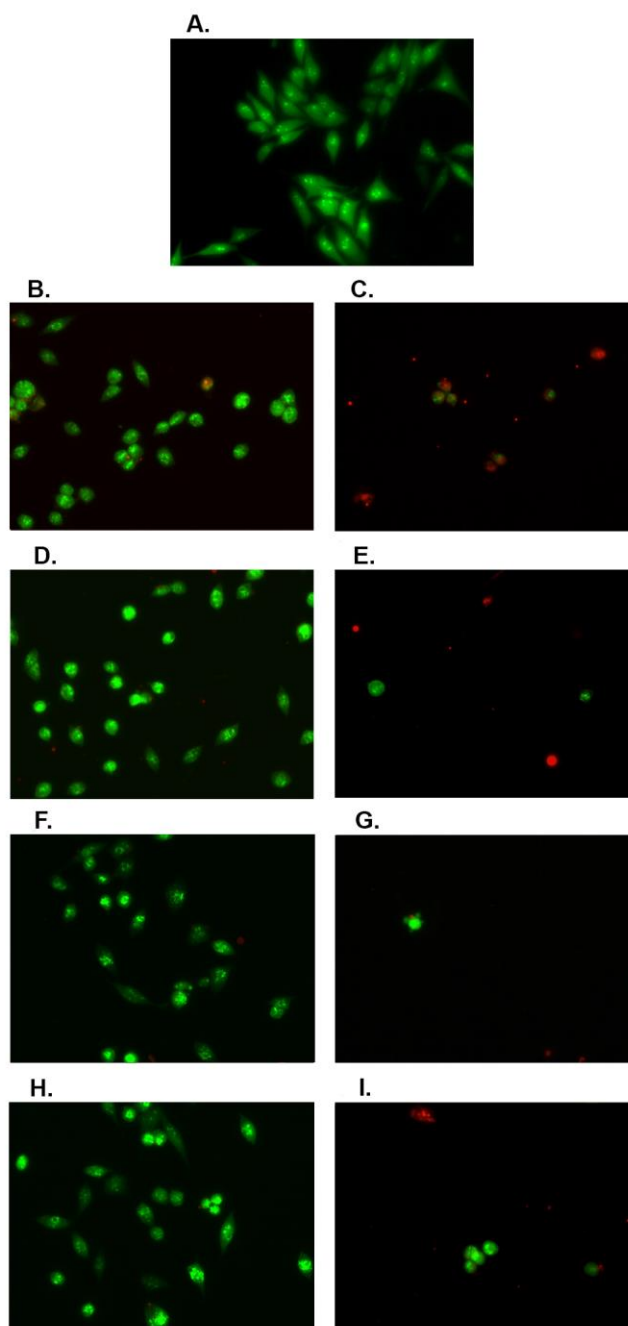
Morfološka analiza fluorescentnom mikroskopijom je pokazala da je većina HeLa ćelija nakon 24 h tretmana ekstraktima i frakcijama vrste *F. spiralis* izgubila atheziju za pokrovna stakala i zbog toga su analizirani supernatanti (Slika 13). U kontrolnim uzorcima, HeLa ćelije su bile zalepljene na pokrovnim staklima i nepromenjene morfologije (Slika 13 A). HeLa ćelije tretirane  $2 \times IC_{50}$  koncentracijama ekstraktima i frakcijama vrste *F. spiralis* su pokazale tipične znake apoptoze: ćelije su bile okrugle, došlo je do mehuranja ćelijske membrane, nukleusi su bili kondenzovani i fragmentisani. Takođe uočene su ćelije obojene narandžasto-crveno koje su pokazivale tipične znake kasne apoptoze (apoptotska tela) i sekundarne nekroze. Etilacetatna frakcija je pokazala najjači proapoptotski efekat (Slika 13 D i E).

Ćelije tretirane ekstraktima i frakcijama vrste *F. virsoides* (Slika 14) su pokazale tipične znake rane apoptoze (ćelije koje su ostale zalepljene na pokrovnim staklima, Slika 14, B, D F i H) kao i kasne apoptoze i sekundarne nekroze (odlepljene ćelije u supernatantima, Slika 14, C, E, G i I). Jesenji ekstrakt i petroletarska frakcija su pokazali najjači efekat od jesenjih uzoraka (Slika 14, B i C). Etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* je iskazala najjači proapoptotski efekat u odnosu na ostale letnje uzorke (Slika 15 D i E).



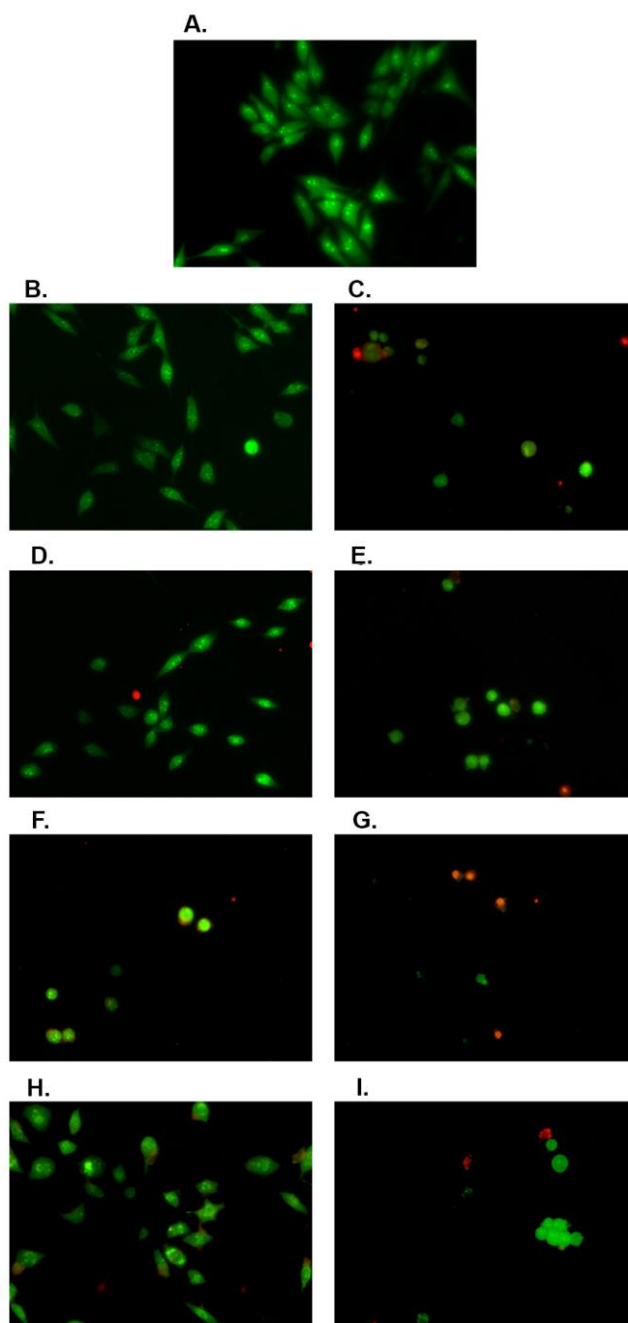
**Slika 13.** Analiza morfoloških karakteristika ćelijske smrti HeLa ćelija obojenih akridin oranž/etidijum bromidom nakon 24 h tretmana ekstraktom i frakcijama vrste *F. spiralis* dvostruko inhibitornim koncentracijama.

A) kontrola, B) *F. spiralis*, C) *F. spiralis* supernatant, D) petroletarska frakcija *F. spiralis*, E) petroletarska frakcija *F. spiralis*, supernatant, F) etilacetatna frakcija *F. spiralis*, G) etilacetatna frakcija *F. spiralis*, supernatant, H) n-butanolna frakcija *F. spiralis*, I) n-butanolna frakcija *F. spiralis* supernatant. Ćelije u kontroli su normalne morfologije, adherirane na pokrovnim ljusticama. Nakon tretmana HeLa ćelija sa dvostrukim  $IC_{50}$  koncentracijama ekstrakata i frakcija *F. spiralis* većina ćelija se odvojila od pokrovnih ljustica. Ćelije koje su se obojile zeleno, predstavljaju ćelije koje imaju intaktnu ćelijsku membranu. Apoptotska tela i sekundarno nekrotične ćelije se prikazuju narandžasto-crvenom bojom. Uveličanje 20x.



**Slika 14.** Analiza morfoloških karakteristika ćelijske smrti HeLa ćelija obojenih akridin oranž/etidijum bromidom nakon 24 h tretmana jesenjim ekstraktom i frakcijama vrste *F. virsoides* dvostruko inhibitornim koncentracijama.

A) kontrola, B) *F. virsoides*, C) *F. virsoides* supernatant, D) petroletarska frakcija *F. virsoides*, E) petroletarska frakcija *F. virsoides*, supernatant, F) etilacetatna frakcija *F. virsoides*, G) etilacetatna frakcija *F. virsoides*, supernatant, H) n-butanolna frakcija *F. virsoides*, I) n-butanolna frakcija *F. virsoides* supernatant. Ćelije u kontroli su normalne morfologije, adherirane na pokrovnim ljupticama. Nakon tretmana HeLa ćelija sa dvostrukim IC<sub>50</sub> koncentracijama jesenjeg ekstrakata i frakcija *F. virsoides* većina ćelija je i dalje adherirana na pokrovnim ljupticama ali izmenjenih morfoloških karakteristika, tipičnih za apoptozu. Ćelije koje su se obojile zeleno, predstavljaju ćelije koje imaju intaktnu ćelijsku membranu. Apoptotska tela i sekundarno nekrotične ćelije se prikazuju narandžasto-crvenom bojom. Uveličanje 20x.



**Slika 15.** Analiza morfoloških karakteristika ćelijske smrti HeLa ćelija obojenih akridin oranž/etidijum bromidom nakon 24 h tretmana letnjim ekstraktom i frakcijama vrste *F. virsoides* dvostruko inhibitornim koncentracijama.

A) kontrola, B) *F. virsoides*, C) *F. virsoides* supernatant, D) petroletarska frakcija *F. virsoides*, E) petroletarska frakcija *F. virsoides* supernatant, F) etilacetatna frakcija *F. virsoides*, G) etilacetatna frakcija *F. virsoides* supernatant, H) n-butanolna frakcija *F. virsoides*, I) n-butanolna frakcija *F. virsoides* supernatant. Ćelije u kontroli su normalne morfologije, adherirane na pokrovnim ljupticama. Nakon tretmana HeLa ćelija sa dvostrukim  $IC_{50}$  koncentracijama letnjeg ekstrakata i frakcija *F. virsoides* većina ćelija je i dalje adherirana na pokrovnim ljupticama ali izmenjenih morfoloških karakteristika, tipičnih za ranu apoptozu. Ćelije koje su se obojile zeleno, predstavljaju ćelije koje imaju intaktnu ćelijsku membranu. Apoptotska tela i sekundarno nekrotične ćelije se prikazuju narandžasto-crvenom bojom. Uveličanje 20x.

## 4.7. *In vitro* ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju ćelijske migracije

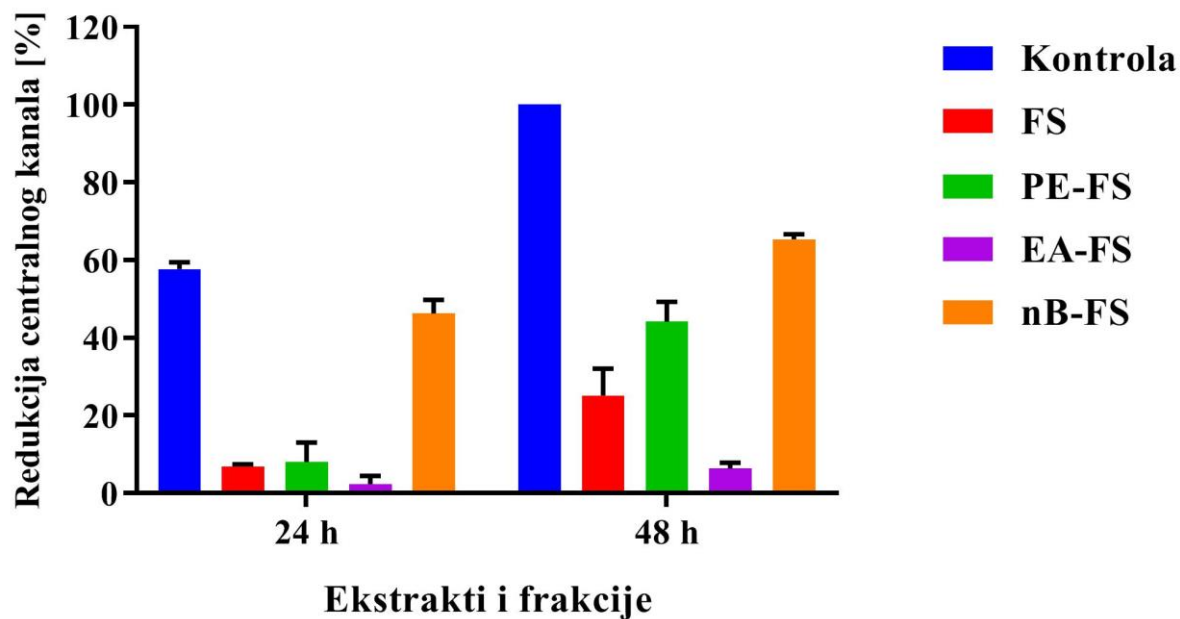
Uticaj ekstrakata i frakcija na pokretljivost ćelija *in vitro* u trajanju od 24 h i 48 h ispitivan je praćenjem njihove migracije u monosloju i izračunavanjem smanjenja širine kanala izraženog u procentima (%) u odnosu na početnu širinu kanala za koju je uzeta vrednost 100%. Rezultati (prikazani u Tabeli 9 i na Slikama 16, 17, 18) su pokazali da su najbolji efekat u sprečavanju migracije EA.hy926 ćelija imali ekstrakt i frakcije vrste *F. spiralis* i to: etilacetatna frakcija, gde se rastojanje između unutrašnih ivica centralnog kanala smanjilo za  $2.34 \pm 2.11\%$  nakon 24 h i za  $6.35 \pm 1.49\%$  nakon 48 h, a zatim i osnovni ekstrakt pa petroletarska frakcija (Slika 16). Na inhibiciju migracije su, potom, najveći efekat imali ekstrakt i pojedine frakcije jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* i to: etilacetatna, pa petroletarska frakcija i osnovni ekstrakt (Slika 17). Znatno slabiji efekat na inhibiciju migracije i značajnu sezonsku varijaciju u antimigratornoj aktivnosti su imali ekstrakti i frakcije letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*: osnovni ekstrakt, petroletarska frakcija, a zatim i etilacetatna frakcija. n-butanolne frakcije sva tri ekstrakta su imale najslabiji efekat, a letnji *F. virsoides* gotovo da nije imao efekta (Slika 18).

**Tabela 9.** Procenat smanjenja centralnog kanala nakon delovanja ekstrakata i frakcija. Rezultati su izraženi u procentima redukcije centralnog kanala i predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. U tabeli su istaknuti procenti najizraženije inhibicije migracije EA.hy926 ćelija.

Ekstrakti i frakcije	24 h %	48 h %
FS	6.85 $\pm$ 0.64	25.14 $\pm$ 6.92
PE-FS	8.00 $\pm$ 5.07	44.18 $\pm$ 5.03
EA-FS	<b>2.34<math>\pm</math>2.11</b>	<b>6.35<math>\pm</math>1.49</b>
nB-FS	46.20 $\pm$ 3.56	65.39 $\pm$ 1.28
FVJ	19.55 $\pm$ 3.93	40.28 $\pm$ 6.16
PE-FVJ	15.17 $\pm$ 2.16	26.62 $\pm$ 1.84
EA-FVJ	9.80 $\pm$ 0.49	23.61 $\pm$ 2.39
nB-FVJ	45.65 $\pm$ 8.89	72.66 $\pm$ 13.28
FVL	38.68 $\pm$ 2.55	54.37 $\pm$ 2.31
PE-FVL	41.36 $\pm$ 9.56	45.60 $\pm$ 6.34
EA-FVL	49.84 $\pm$ 8.78	87.65 $\pm$ 1.37
nB-FVL	85.37 $\pm$ 7.65	99.98 $\pm$ 0.02

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS - etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ - ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

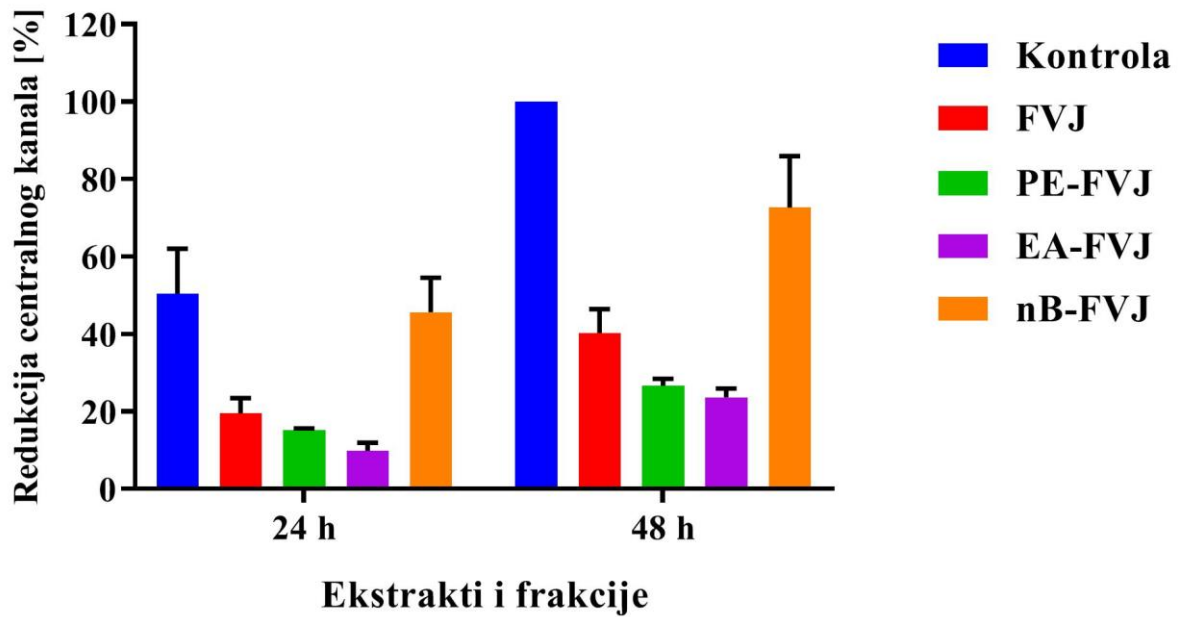
## *F. spiralis*



**Slika 16.** Rezultati analize migracije ćelija - *in vitro* “scratch” eseja predstavljeni kao procenti smanjenja rastojanja između ćelija u monosloju u prisustvu ili odsustvu ekstrakta i frakcija vrste *F. spiralis* nakon 24 h i 48 h.

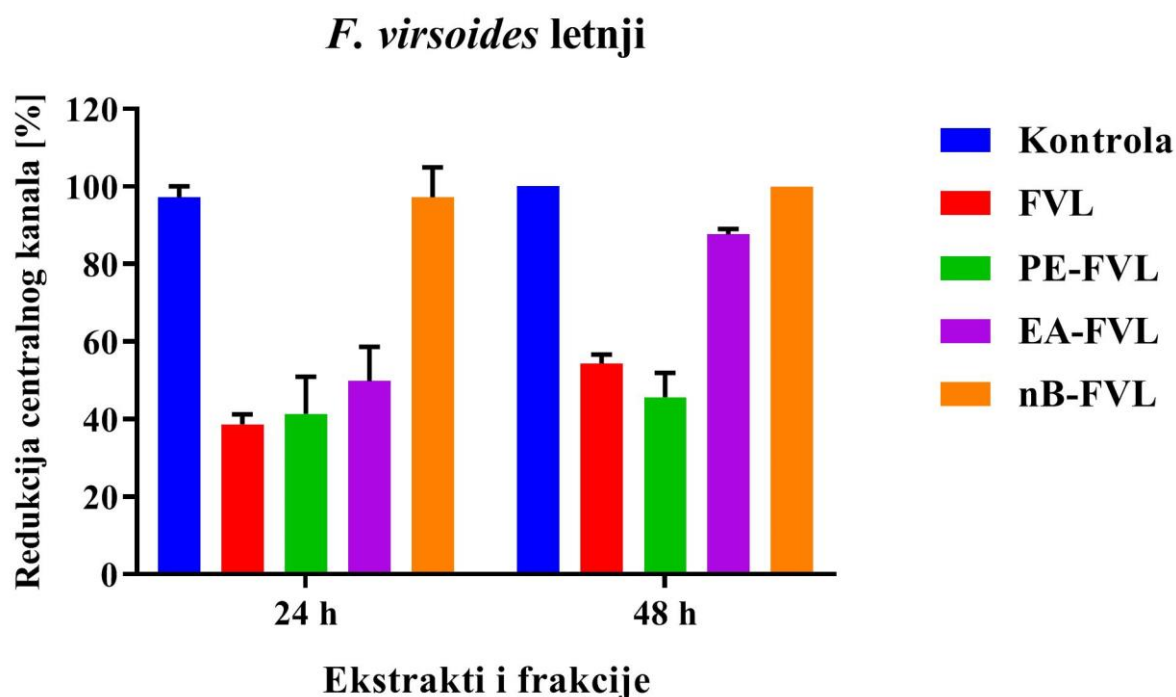
Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta; FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS - etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*.

### *F. virsoides* jesenji



**Slika 17.** Rezultati analize migracije ćelija - *in vitro* “Scratch” eseja predstavljeni kao procenti smanjenja rastojanja između ćelija u monosloju u prisustvu ili odsustvu ekstrakta i frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* nakon 24 h i 48 h.

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. FVJ - ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*.



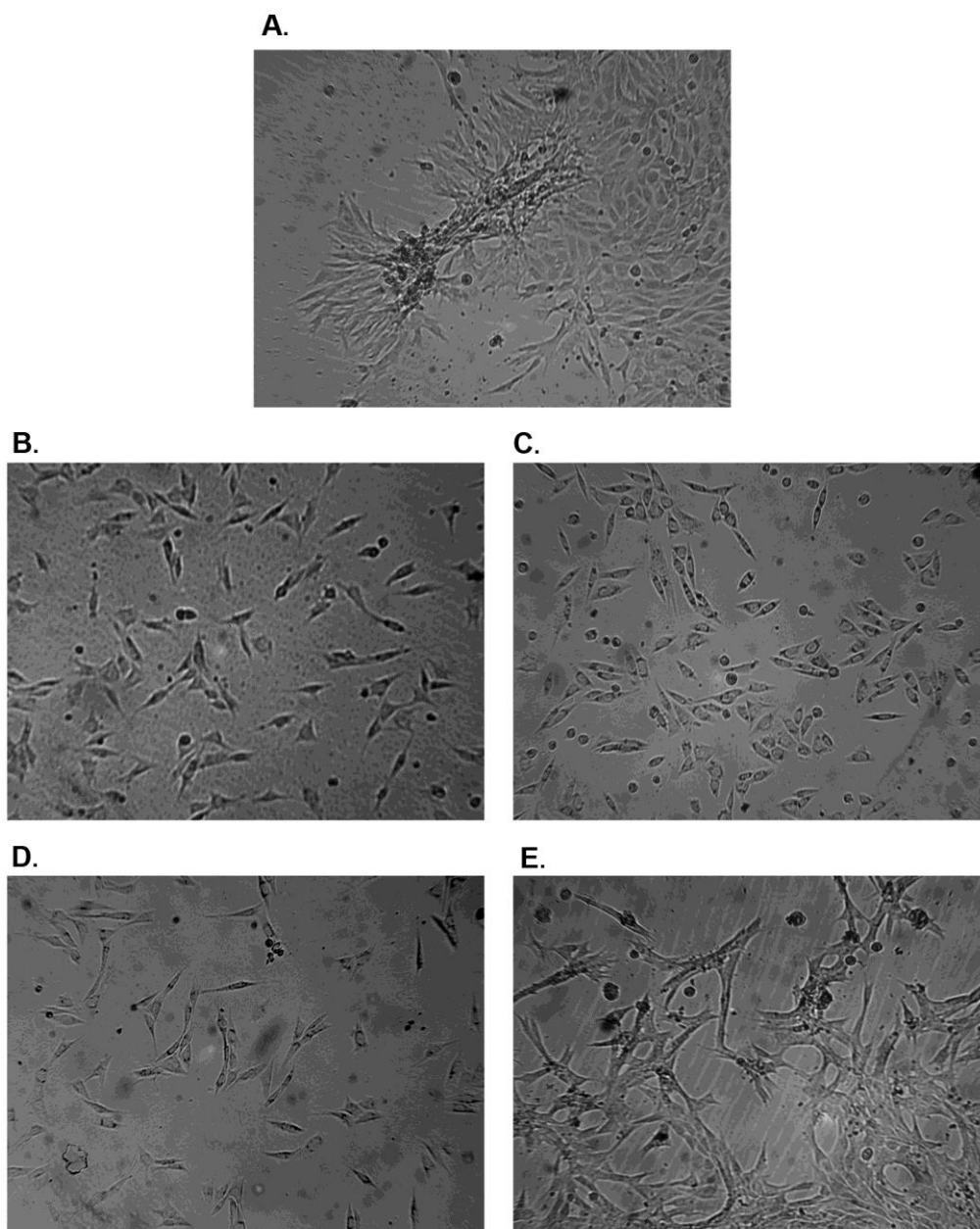
**Slika 18.** Rezultati analize migracije ćelija – *in vitro* “Scratch” eseja predstavljeni kao procenti smanjenja rastojanja između ćelija u monosloju u prisustvu ili odsustvu ekstrakta i frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* nakon 24 h i 48 h.

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

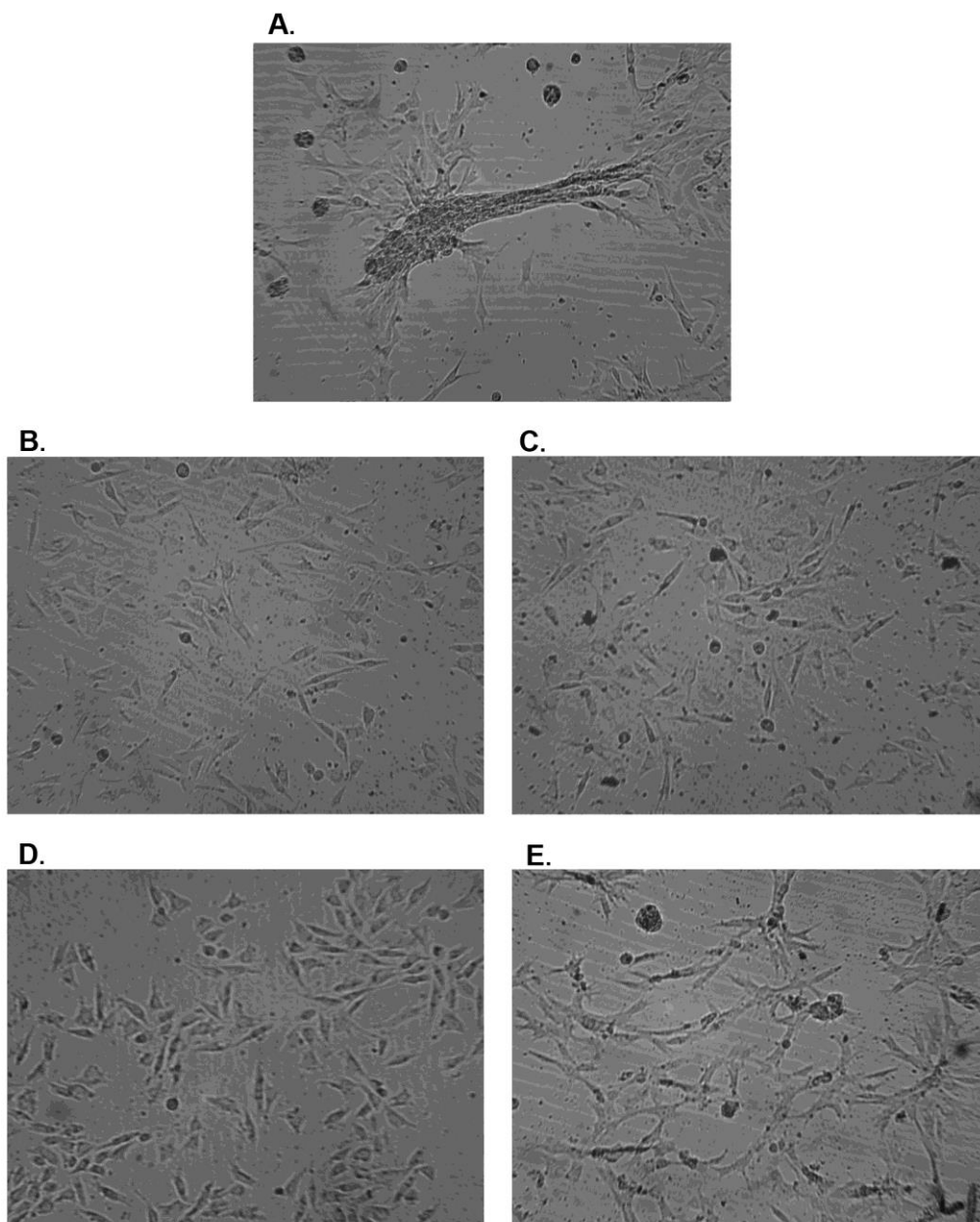
#### **4.8. Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju angiogeneze *in vitro***

Test formiranja tuba od endotelskih ćelija (engl. *tube formation assay*) je korišćen kako bi se ispitao *in vitro* antiangiogeni potencijal ekstrakata i frakcija. Rezultati su prikazani na Slikama 19, 20 i 21. U kontrolnim uzorcima EA.hy926 ćelija posađenih u „Matrigel“, gde je aplikovana samo podloga, uočavaju se složene tubularne strukture, koje formiraju ove ćelije u fiziološkim uslovima (Slike 19 A, 20 A i 21 A). Pojedini ekstrakti i frakcije uspešno su inhibirali angiogenezu *in vitro*. Nakon delovanja ekstrakata i frakcija vrste *F. spiralis*, uočavaju se pojedinačne EA.hy926 (Slika 19 B, C i D), što znaci da su ekstrakt, petroletarska frakcija, kao i etilacetatna frakcija uspešno inhibirali elongaciju i ćelijske interakcije *in vitro*. Isti efekat inhibicije elongacije i ćelijskih interakcija ostvarili su jesenja i letnja etilacetatna frakcija vrste *F. virsoides* (Slike 20 D i 21 D). Petroletarska frakcija i ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* su iskazali nešto slabiji efekat, ali su sprečili pojavu složenih tubularnih struktura EA.hy926 ćelija (Slika 20 B i C). n-butanolne frakcije svih ispitivanih uzoraka kao ni ekstrakt petoletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* nisu imale inhibitorni efekat na elongaciju, formiranje mreže i složenih tubularnih struktura od EA.hy926 ćelija (Slike 19 E, 20 E, 21 E).

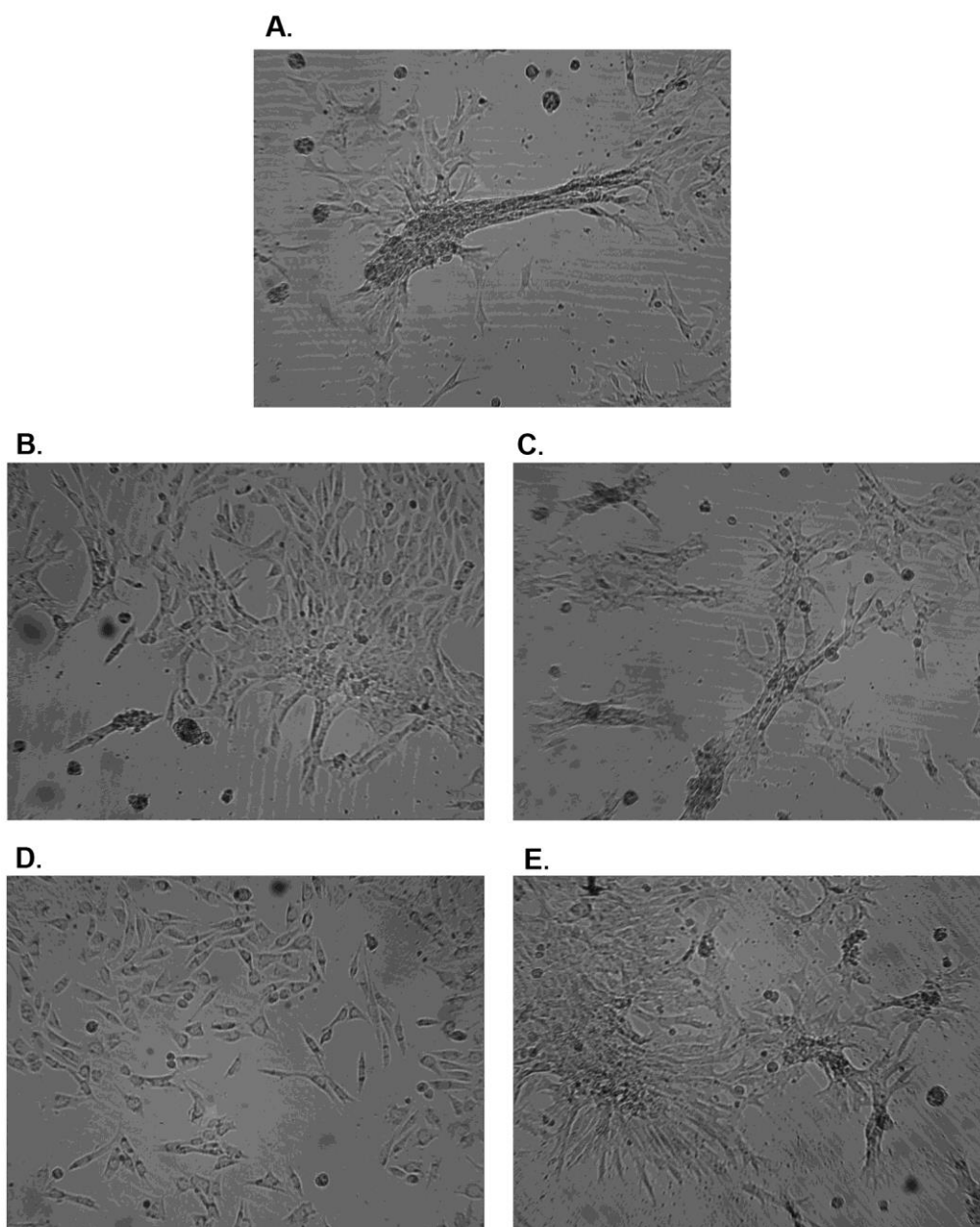




**Slika 19.** Efekat ekstrakata i frakcija vrste *F. spiralis* na proces *in vitro* angiogeneze EA.hy926 ćelija.  
 Fotomikrografije kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih subtoksičnim IC<sub>20</sub> koncentracijama u trajanju od 20 h; A) kontrola, B) ekstrakt, C) petroleterarska frakcija, D) etilacetatna frakcija, E) n-butanolna frakcija. Uveličanje 40x.



**Slika 20.** Efekat jesenjega ekstrakta i frakcija vrste *F. virsoides* na proces *in vitro* angiogeneze EA.hy926 ćelija. Fotomikrografije kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih subtoksičnim IC<sub>20</sub> koncentracijama u trajanju od 20 h; A) kontrola, B) ekstrakt, C) petrolearska frakcija, D) etilacetatna frakcija, E) n-butanolna frakcija. Uveličanje 40x.



**Slika 21.** Efekat letnjeg ekstrakta i frakcija vrste *F. virsoides* na proces *in vitro* angiogeneze EA.hy926 ćelija. Fotomikrografije kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih subtoksičnim IC<sub>20</sub> koncentracijama u trajanju od 20 h; A) kontrola, B) ekstrakt, C) petroletharska frakcija, D) etilacetatna frakcija, E) n-butanolna frakcija. Uveličanje 40x.

#### 4.9. Ispitivanje uticaja ekstrakata i frakcija na inhibiciju $\alpha$ -glukozidaze

Vrednosti IC<sub>50</sub> ekstrakata i frakcija koje su inhibirale aktivnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze su prikazane u Tabeli 10. Ekstrakti i frakcije vrste *F. spiralis* su pokazali najjaču inhibiciju enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis* je ispoljila naj snažniji efekat inhibicije i imala najmanju IC<sub>50</sub> vrednost  $10.37 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ . Po stepenu aktivnosti zatim slede petroletharska, osnovni ekstrakt i n-butanolna frakcija.

Jesenji ekstrakti i frakcije vrste *F. virsoides* su, takođe, ispoljili izraženo dejstvo na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze, znatno jače od letnjih ekstrakata i frakcija. Etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* je ispoljila najjače inhibitorno dejstvo u odnosu na sve testirane uzorke vrste *F. virsoides* ( $14.98 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ ). Sličan efekat imala je i petroletarska frakcija, za njom slede jesenji ekstrakt vrste *F. virsoides* i n-butanolnom frakcija.

Letnji uzorci vrste *F. virsoides* su ispoljili slabije dejstvo na inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze u odnosu na sve uzorke vrsta *F. spiralis* i jesenjeg *F. virsoides*, ali su ipak pokazali jaču inhibiciju  $\alpha$ -glukozidaze u odnosu na standard, akarbozu. Od letnjih uzoraka vrste *F. virsoides*, petroletarska frakcija je ispoljila najjače inhibitorno dejstvo ( $45.85 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$ ), a zatim etilacetatna frakcija, pa letnji ekstrakt vrste *F. virsoides* i n-butanolna frakcija.

**Tabela 10.**  $\text{IC}_{50}$  vrednosti ekstrakata i frakcija koje su inhibirale aktivnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze. U tabeli su prikazane inhibitorne koncentracije ekstrakata i frakcija enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Rezultati su iskazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. U tabeli je naglašene vrednost sa najintenzivnijom inhibicijom enzima.

Ekstrakti i frakcije	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>FS</b>	14.18 $\pm$ 0.25
<b>PE-FS</b>	12.05 $\pm$ 0.01
<b>EA-FS</b>	<b>10.37<math>\pm</math>0.27</b>
<b>nB-FS</b>	16.42 $\pm$ 0.45
<b>FVJ</b>	20.05 $\pm$ 0.33
<b>PE-FVJ</b>	15.90 $\pm$ 0.12
<b>EA-FVJ</b>	14.98 $\pm$ 0.07
<b>nB-FVJ</b>	24.42 $\pm$ 0.78
<b>FVL</b>	90.75 $\pm$ 0.81
<b>PE-FVL</b>	45.85 $\pm$ 1.28
<b>EA-FVL</b>	72.57 $\pm$ 3.40
<b>nB-FVL</b>	132.60 $\pm$ 19.20
<b>Akarboza</b>	229.35 $\pm$ 3.24

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS-etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ -ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

## 4.10. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata i frakcija

Rezultati antibakterijske aktivnosti ekstrakata i frakcija su prikazani u Tabeli 11 izraženi kao MIC, koja predstavlja najnižu koncentracija ekstrakata i frakcija koja je inhibirala porast bakterija. Najbolju antibakterijsku aktivnost ispoljila je n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis* prema G+ pozitivnim bakterijskim sojevima *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* (0.04 mg/mL), a zatim i etilacetatna frakcija prema *B. cereus* (0.06 mg/mL). Antibakterijska aktivnost petroletarske frakcije vrste *F. spiralis* varirala je od 0.15 mg/mL prema *B. cereus* do 1.33 mg/mL prema G- *Escherichia coli*, a za vrstu *F. spiralis* osnovni ekstrakt, od 0.24 mg/mL prema *B. subtilis* do 0.96 mg/mL prema *E. coli*.

Etilacetatne frakcije kako letnjih tako i jesenjih uzoraka vrste *F. virsoides* su pokazale najjaču antibakterijsku aktivnost od svih testiranih uzoraka vrste *F. virsoides* i to letnja od 0.31 mg/mL prema *B. subtilis* i *B. cereus* do 1.25 mg/mL prema *E. coli*; dok je jesenja varirala od 0.31 mg/mL prema *B. cereus* do 1.25 mg/mL prema *Staphylococcus aureus*, *E. coli* i *Proteus mirabilis*. Po antibakterijskoj aktivnosti zatim slede n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka (od 1.25 mg/mL prema *B. subtilis* i *B. cereus*, do 2.50 mg/mL prema *S. aureus*, *E. coli* i *P. mirabilis*), petroletarska frakcija zimskog uzorka, kao i osnovni ekstrakt letnjeg uzorka i n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

**Tabela 11.** Antibakterijska aktivnost ekstrakata i frakcija.

Rezultati su prikazani kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC (mg/mL)). U tabeli su istaknute najniže koncentracije ekstrakata i frakcija koje su ostvarile antibakterijsko dejstvo.

Mikroorganizmi	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
<b>Ekstrakti</b>	MIC (mg/mL)				
<b>FS</b>	0.47	0.24	0.12	0.96	0.47
<b>PE-FS</b>	0.33	0.17	0.15	1.33	0.67
<b>EA-FS</b>	0.23	0.12	0.06	0.47	0.23
<b>nB-FS</b>	0.07	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	0.14	0.14
<b>FVJ</b>	5.86	5.86	2.93	11.72	11.72
<b>PE-FVJ</b>	3.50	3.50	1.75	7.00	3.50
<b>EA-FVJ</b>	1.25	0.63	0.31	1.25	1.25
<b>nB-FVJ</b>	2.50	1.25	1.25	2.50	2.50
<b>FVL</b>	5.31	2.65	2.65	10.62	10.62
<b>PE-FVL</b>	11.30	5.65	5.65	11.30	11.30
<b>EA-FVL</b>	0.62	0.31	0.31	1.25	0.62
<b>nB-FVL</b>	6.90	3.45	3.45	/	6.90
<b>Streptomycin</b>	0.03	0.02	0.02	0.06	0.06

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS - etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ - ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*

## 4.11. Ispitivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata i frakcija

Antifungalna aktivnost ekstrakata i frakcija je prikazana u Tabeli 12. Vrednosti su izražene kao MIC, odnosno najnižu koncentracija ekstrakata i frakcija koja je inhibirala porast gljivica.. Najefikasnija u antifungalnoj aktivnosti je bila n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis* i to od 0.14 mg/mL prema sojevima gljivica *Trichophyton mentagrophytes* i *Candida albicans* do 0.56 mg/mL prema *Mucor mucedo* i *Aspergillus niger*. Zatim sledi etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis* (od 0.19 mg/mL prema *C. albicans* do 1.56 mg/mL prema *M. mucedo* i *Penicillium italicum*), etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* (od 0.31 mg/mL prema *C. albicans* do 1.25 mg/mL prema *M. mucedo*, *A. niger* i *P. italicum*, kao i etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* (od 0.31 mg/mL prema *C. albicans* do 2.50 mg/mL prema *A. niger* i *P. italicum*). Izražena antifungalna aktivnost je pokazana i od strane petroletarske frakcije vrste *F. spiralis* (od 0.33 mg/mL prema *C. albicans* do 2.67 mg/mL prema *M. mucedo* i *A. niger*) kao i od celog ekstrakta vrste *F. spiralis* (od 0.47 mg/mL prema *C. albicans* do 3.78 mg/mL prema *M. mucedo*). Po antifungalnoj aktivnosti zatim slede n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka, osnovni ekstrakt letnjeg i jesenjeg uzorka, n-butanolna frakcija jesenjeg i kao najslabija, petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

**Tabela 12.** Antifungalna aktivnost ekstrakata i frakcija

Rezultati su prikazani kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC (mg/mL)). U tabeli su istaknute najniže koncentracije ekstrakata i frakcija koje su ostvarile antifungalno dejstvo.

Mikroorganizmi	<i>M.mucedo</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P.italicum</i>
<b>Ekstrakti</b>	MIC (mg/mL)				
<b>FS</b>	3.78	0.96	3.78	0.47	1.89
<b>PE-FS</b>	2.67	0.67	2.67	0.33	1.33
<b>EA-FS</b>	1.56	0.38	0.76	0.19	1.56
<b>nB-FS</b>	0.56	<b>0.14</b>	0.56	<b>0.14</b>	0.28
<b>FVJ</b>	11.72	5.86	11.72	2.93	11.72
<b>PE-FVJ</b>	7.00	7.00	/	3.5	/
<b>EA-FVJ</b>	1.25	1.25	2.50	0.31	2.50
<b>nB-FVJ</b>	2.50	2.50	2.50	1.25	2.50
<b>FVL</b>	10.62	5.31	10.62	2.65	10.62
<b>PE-FVL</b>	11.3	11.3	/	5.65	/
<b>EA-FVL</b>	1.25	0.62	1.25	0.31	1.25
<b>nB-FVL</b>	/	6.90	6.90	3.45	/
<b>Ketokonazol</b>	0.16	0.08	0.08	0.04	0.16

FS - ekstrakt vrste *F. spiralis*; PE-FS - petroletarska frakcija vrste *F. spiralis*; EA-FS - etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*; nB-FS - n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*; FVJ - ekstrakt jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVJ - petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVJ - etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVJ - n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*; FVL - ekstrakt letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; PE-FVL - petroletarska frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; EA-FVL - etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*; nB-FVL - n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

## 5. Diskusija

Vrste *Fucus* spp. poseduju veliku nutritivnu vrednost zbog visokog sadržaja složenih polisaharida, masnih kiselina i polifenola. Alge roda *Fucus* predstavljaju i izvor bioaktivnih jedinjenja koja imaju potencijala da se koriste u lečenju ljudi (Catarino i sar., 2018). Podaci iz literature pokazuju da ove makroalge imaju antioksidativnu, antiinflamatornu i antitumorsku (proapoptotsku, antimetastatsku, antiangiogenu) aktivnost, kao i da mogu doprineti lečenju oboljenja koja zahtevaju regulaciju glikemije ili koagulacije krvi i smanjiti mogućnost za nastanak tromboze (Kandale, 2011; Paiva i sar., 2014). Na osnovu pregleda literature utvrđeno je da su ekstrakti vrste *F. spiralis* prikupljeni sa Sidi Bouzid lokacije, na Atlanskoj obali Maroka imali najveću biološku aktivnost, kada su sakupljeni u periodu mart - april (Chiheb i sar., 2009; Etahiri i sar., 2002, 2003; Farid i sar., 2016; Younes i sar., 2009). Zato su ispitivani ekstrakt i frakcije algi sakupljenih u tom periodu. Endemična vrsta *F. virsoides* iz Jadranskog mora nije do sada intenzivno proučavana u svetlu hemijskog sastava i biološke aktivnosti, te se ovim radom želelo utvrditi da li postoje razlike u aktivnosti i hemijskom sastavu ove vrste, sakupljenoj u dve različite sezone. Na odabir sezona u kojima su uzorkovane alge uticali su literaturni podaci o faktorima sredine kao što je na primer temperatura Jadranskog mora, kao i tehničke mogućnosti za samo uzorkovanje materijala (Campanelli i sar., 2009; Linardić, 1949; Munda 1979).

### 5.1. Hemijska karakterizacija i antioksidativna aktivnost ekstrakata i frakcija

Prvi deo naših istraživanja obuhvatio je hemijsku karakterizaciju dihlormetan-metanolnih ekstrakata dve vrste algi *F. spiralis* i *F. virsoides* kao i njihovih frakcija (petroletarske, etilacetatne i n-butanolne). Ispitivan je sadžaj masnih kiselina i ukupnih fenola.

Masne kiseline su izolovane iz petroletarskih frakcija. Petroletar je korišćen kao rastvarač jer njegova priroda omogućava najbolji prinos masnih kiselina prilikom izolacije. Dobijeni rezultati pokazali su da je frakcija jesenjeg uzorka alge *F. virsoides* sadržala najveću količinu polinezasićenih masnih kiselina, kao i da je imala najpovoljniji odnos polinezasićenih prema zasićenim masnim kiselinama. Takođe, jesenji uzorak vrste *F. virsoides* je imao i najviše n-3 masnih kiselina, koje spadaju u grupu nezasićenih masnih kiselina. Naši rezultati su pokazali da su tipovi masnih kiselina i njihova količina zavisili kako od vrste algi tako i od sezone u kojoj su alge *F. virsoides* uzorkovane. Dosadašnji literaturni podaci su ukazivali na sezonske promene u produkciji masnih kiselina u makroalgama (Kumari i sar., 2013), a naši eksperimenti su to i dokazali po prvi put na vrsti *F. virsoides*. Ranija istraživanja su pokazala da makroalge imaju sposobnost da se adaptiraju na hladnije životne uslove tako što povećavaju količinu polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina kao i drugih bioaktivnih molekula (Biancarosa i sar., 2018; Pacheco i sar., 2018; Silva i sar., 2013). Pokazano je i da alge vrste *F. spiralis* mogu imati različit odnos polinezasićenih masnih kiselina i zasićenih masnih kiselina u svom sastavu u zavisnosti od sezone uzorkovanja i lokaliteta na kojima alge rastu. Alge u toplijim vodama imaju više zasićenih masnih kiselina, a godišnja doba utiču na različit profil izolovanih masnih kiselina (Taskin i sar., 2010; Yuan i Walsh, 2006).

Utvrđeno je da polinezasićene masne kiseline, naročito n-3 masne kiseline, ispoljavaju citotoksični efekat na imortalizovanim tumorskim ćelijskim linijama karcinoma dojke, prostate i kolorektalnog karcinoma (Gu i sar., 2013; Pacheco i sar., 2018; Song i sar., 2014)). Rezultati istraživanja su pokazali i da n-3 masne kiseline deluju inhibitory na rast tumora i njegov metastatski potencijal. Smatra se da su ovi efekti posledica uticaja n-3 masnih kiselina na gensku ekspresiju, transkripcione faktore i supresiju neoplastičnih stimulusa (Massaro i sar., 2008; Pacheco i sar., 2018). Ne treba zanemariti ni sposobnost n-3 masnih kiselina da utiču na produkciju ROS-a, ćelijski metabolizam i indukovanje procesa apoptoze (Larsson i sar., 2004; Liu i sar., 2018; Wannous i sar., 2013). Masne kiseline mogu imati dvostruku ulogu, jedna je podsticanje produkcije ROS ali i stimulacija hvatanja ROS (Pacheco i sar., 2018).



Dosadašnja istraživanja su pokazala da je odnos polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina u algama bitan faktor u proceni potencijalnog antitumorskog efekta (Pacheco i sar., 2018). Takođe, pojedine masne kiseline mogu poboljšati efekat standardnih hemioterapeutika i radioterapije (Hardman, 2004; Manni i sar., 2014). Dokazano je i da konzumiranje masnih kiselina kroz ishranu može smanjiti pojavu i/ili incidencu određenih hroničnih bolesti (dijabetes tipa 2, maligna i kardiovaskularna oboljenja), kao i bitno uticati na smanjenje problema gojaznosti (Paiva i sar., 2014).

Sastav, količina, kao i povoljan odnos polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina u ispitivanim, petroletarskim frakcijama, ukazuju da vrste *F. spiralis* i *F. virsoides* imaju antioksidativni, antitumorski, antimikrobni potencijal kao i inhibirajući efekat na  $\alpha$ -glukozidazu. U skladu sa tim ove alge u formi potencijalnih lekovitih preparata bi mogle da nađu svoje mesto u prevenciji i lečenju kancera, dijabetesa i infekcija.

Red Fucales je poznat po visokom sadržaju fenola od kojih potiče njihova antioksidativna aktivnost (Andrade i sar., 2013b; Pinteus i sar., 2017).

Analiza ukupnih fenola u osnovnim ekstraktima algi je pokazala da je najviše fenola bilo u jesenjem uzorku vrste *F. virsoides*. U ekstraktu vrste *F. spiralis* je bilo značajno manje fenola nego u jesenjem ekstraktu vrste *F. virsoides*, dok je u letnjem ekstraktu *F. virsoides* bilo značajno manje fenola u odnosu na druga dva ispitivana ekstrakta.

Najviši sadržaj fenola od svih frakcija i ukupno (u odnosu na sve ispitivane ekstrakte i frakcije) je imala etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* > n-butanolna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* > petroletarska frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides*. Frakcije sa značajno manjom količinom ukupnih fenola su: n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis* > etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* > etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis* > petroletarska frakcija vrste *F. spiralis* > n-butanolna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* > etilacetatna frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*. Statistički značajna razlika u količini ukupnih fenola je dobijena između svih ispitivanih n-butanolnih frakcija. Razlika u količini ukupnih fenola je bila statistički značajna i između petroletarske i etilacetatne frakcije jesenjeg i letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*, kao i između etilacetatnih frakcija ove vrste međusobno.

Jesenji ekstrakt vrste *F. virsoides* je pokazao najjaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostale ekstrakte > vrsta *F. spiralis* > letnji uzorak vrste *F. virsoides*. Statistički značajna razlika u antioksidativnoj sposobnosti je uočena između ekstrakata vrsta *F. spiralis* i *F. virsoides* (letnjeg), kao i između jesenjeg i letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

Najjaču antioksidativnu aktivnosti pokazala je etilacetatna frakcija jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* > n-butanolna > petroletarska frakcija > etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis* > petroletarska frakcija vrste *F. spiralis* > n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis*. Letnje frakcije *F. virsoides* su imale najslabiju DPPH aktivnost. Uočena je i statistička značajnost između petroletarskih frakcija i to *F. spiralis* i *F. virsoides* (jesenjeg) i između jesenjeg i letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*. Etilacetatne frakcije su u međusobnom poređenju, takođe, pokazale statistički značajnu razliku pri ostvarivanju antioksidativnog efekta (vrsta *F. spiralis* u odnosu na vrstu *F. virsoides* (jesenji uzorak); jesenji u odnosu na letnji uzorak vrste *F. virsoides*). Statistički značajnu razliku u antioksidativnoj aktivnosti su međusobno iskazale i n-butanolne frakcije i to *F. spiralis* u poređenju sa *F. virsoides* (jesenji uzorak) kao i između jesenjeg i letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*.

Intenzitet antioksidativne aktivnosti odgovarao je ukupnom sadržaju fenola kod zimskih i letnjih uzoraka vrste *F. virsoides*. Kod uzoraka vrste *F. spiralis* nije utvrđena povezanost između intenziteta antioksidativne aktivnosti i ukupne količine detektovanih fenola. Naime, n-butanolna frakcija vrste *F. spiralis* je sadržala najveću količinu ukupnih polifenola u odnosu na ostale uzorke ove vrste ali i ispoljila najmanju antioksidativnu aktivnost. Etilacetatna frakcija je imala skoro duplo manje detektovanih ukupnih fenola u odnosu na n-butanolnu frakciju ali i najjaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na druge uzorke vrste *F. spiralis*. U prethodnim studijama je pokazano da etilacetatna frakcija poseduje najjaču antioksidativnu, odnosno antiradikalnu aktivnost i da se, usled svojstva rastvarača, upravo u ovoj frakciji akumuliraju aktivniji fenoli



(Rajbhar i sar., 2015). Drugim rečima, odsustvo direktne veze između količine ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti kod ispitivanih uzoraka vrste *F. spiralis* može se objasniti višim prisustvom snažnih fenolnih antioksidanata u etilacetatnoj frakciji, u odnosu na n-butanolnu frakciju (Pinteus i sar., 2017; Zubia i sar., 2009). Još jedno od objašnjenja zašto ukupan sadržaj fenola ne mora uvek biti u korelaciji sa jačinom antioksidativnih svojstava ispitivanog uzorka je prisustvo i drugih jedinjenja koja mogu pojačati ili smanjiti efekte fenola u oksido-redukcionim procesima (Pinteus i sar., 2017; Tierney i sar., 2013). Dakle, kada razmatramo bioaktivnost ekstrakata i frakcija algi moramo uzeti u obzir i vrstu i količinu različitih polifenola u uzorcima i njihove sinergističke i antagonističke interakcije sa drugim prisutnim jedinjenjima. Količina ukupnih fenola koja je bila znatno viša u jesenjim nego u letnjim uzorcima je jasno pokazala sezonski uticaj sredine na produkciju ukupnih fenola. To bi značilo da treba voditi računa u kojoj sezoni se sakupljaju alge kako bi se njihovom upotrebom postigao maksimalni biološki potencijal. Takođe, ove varijacije u sastavu mogu predstavljati problem prilikom poređenja rezultata pojedinih istraživanja u kojima su alge uzorkovane u različito doba godine.

Izražena antioksidativna svojstva polifenola su jedan od važnih faktora u osnovi njihove značajne antikancerske aktivnosti. Mrke alge su jedinstvene po tome što sadrže izuzetno biološki aktivne polifenole - florotanine za čiju ekstrakciju se koristi etilacetat. Ovi polifenoli imaju ne samo antioksidativna već i citotoksična, antidijabetička i antimikrobna svojstva (Li i sar., 2017; Tierney i sar., 2014). što ukazuje da upravo preparati koji u svom sastavu imaju ove vrste makroalgi mogu posedovati navedene biološke aktivnosti.

Na osnovu hemijske analize naših ispitivanih uzoraka algi *F. spiralis* i *F. virsoides* kao i na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka, da upravo fenolna jedinjenja i masne kiseline poseduju biološke aktivnosti, dalji tok našeg istraživanja bavio se ispitivanjem antikancerskog, antimikrobnog i antidijabetičkog potencijala ovih vrsta algi i međusobnim poređenjem različitih ekstrakata i frakcija. Krajnji cilj istraživanja bio je da se utvrde koji uzorci imaju najviši potencijal za nastavak istraživanja u cilju formulacije lekovitih preparata koji bi svoju ulogu imali u procesima lečenja i prevencije kancera, dijabetesa i infekcija.

## 5.2. Antikancerski potencijal ekstrakata i frakcija

Jedinjenje sa antikancerskim potencijalom treba da poseduje visoku selektivnost prema normalnim ćelijama, visoku citotoksičnost prema maligno transformisanim ćelijama pri čemu deluje na više karakteristika tumorskih ćelija kao i na angiogenezu. Pod selektivnošću se podrazumeva svojstvo ispitivane supstance da maligno transformisane ćelije uvodi u proces ćelijske smrti, dok istovremeno u što manjem procentu oštećuje normalne ćelije odnosno ispoljava što nižu toksičnost (Iqbal et al., 2017). Upravo je potreba za efikasnim antikancerskim agensima niže toksičnosti od standardne hemioterapije stimulisala porast interesovanja za izučavanje prirodnih izvora ovih agenasa, poput mrkih algi.

Kako bismo utvrdili da li ispitivani ekstrakti i frakcije vrsta *F. spiralis* i *F. virsoides* imaju dobar antikancerski potencijal *in vitro*, koristili smo standardne modele za prvu liniju procene antikancerske aktivnosti. Za ispitivanje citotoksičnosti koristili smo pet maligno transformisanih humanih ćelijskih linija (HeLa, MDA-MB-453, LS174T, A549 i K562). Selektivno dejstvo ispitivanih ekstrakata i frakcija ispitali smo na MRC-5 normalnim ćelijama, određivanjem citotoksičnosti a zatim i koeficijenta selektivnosti. Nakon utvrđivanja citotoksičnog efekta na HeLa ćelijama, koristili smo protočnu citometriju kako bismo utvrdili distribuciju ćelija po fazama ćeliskog ciklusa i fluorescentnu mikroskopiju za utvrđivanje morfoških promena nakon delovanja ekstrakata i frakcija. Jedna od ključnih osobina maligno transformisanih ćelija je i sposobnost migracije. EA.hy926 fuzionisanu ćelijsku liniju i "scratch" esej smo koristili kao model za *in vitro* ispitivanje zaustavljanja ćelijske migracije. Da bi smo ispitali antiangiogeni potencijal ekstrakata i frakcija koristili smo EA.hy926 ćelijsku liniju, zasejanu u matrigelu.

Dobijeni rezultati su pokazali da se po citotoksičnoj aktivnosti i selektivnosti izdvajaju najpre petroletarska, etilacetatna frakcija i ekstrakt vrste *F. spiralis* i to prema HeLa ćelijama

adenokarcinoma grlića materice. Petroletarska, etilacetatna frakcija i ekstrakt vrste *F. virsoides* pokazali su dobru citotoksičnu aktivnost i selektivnost pri tretiranju iste maligno transformisane ćelijske linije. Prema ostalim testiranim malignim ćelijskim linijama najizraženije dejstvo su imali etilacetatna i petroletarska frakcija i osnovni ekstrakti, pre svega, vrste *F. spiralis*, a zatim, i vrste *F. virsoides*. Osetljivost ostalih testiranih malignih ćelijskih linija je bila redom LS174T (kolorektalni adenokarcinom), K562 (hronična mijeleoidna leukemija), MDA-MB-453 (adenokarcinom dojke) i A549 (adenokarcinom pluća). Frakcije n-butanola svih testiranih uzoraka su imale najslabije citotoksično dejstvo. Upravo ovaj podatak ukazao nam je na to da su najaktivnije komponente od značaja za citotoksičnu aktivnost bile izdvojene petroletarskim i etilacetatnim rastvaračima. Važno je naglasiti i da su ekstrakti i frakcije letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* imale znatno slabije citotoksično dejstvo prema svim testiranim ćelijskim linijama u odnosu na uzorke pripremane od vrste *F. virsoides* sakupljane u jesen, što ukazuje na izraženu razliku u količini i sastavu aktivnih komponenti u algama u zavisnosti od godišnjeg doba i uslova sredine. Naši rezultati sugerišu i da je osetljivost testiranih malignih ćelijskih linija zavisila od samog tipa maligno transformisanih ćelija. Takav rezultat bi mogao da ukaže na specifični mehanizam dejstva testiranih ekstrakata i frakcija, odnosno na specifični signalni put koji je deregulisan u određenom tipu malignih ćelija. Na ovo ukazuju i brojna istraživanja koja su pokazala da različite maligne ćelijske linije međusobno imaju deregulisane različite signalne i metaboličke puteve a još izraženija razlika se uočava u odnosu na normalne ćelije (Ertel i sar., 2006; Ferreira i sar., 2013). Testirani ekstrakti i frakcije nisu pokazali citotoksični efekat prema normalnim MRC5 ćelijama (fetalni fibroblasti pluća) što može značiti da je maligna transformacija ćelija neophodna za ispoljavanje biološke aktivnosti naših ispitivanih uzoraka. Ujedno, upravo ovakav efekat frakcija i ekstrakata odabranih vrsti algi doprinosi njihovoj selektivnosti, što povećava njihov potencijal da doprinesu lečenju malignih bolesti. Značaj ovih rezultata ogleda se i u činjenici da su skoro svi testirani ekstrakti i frakcije pokazali veću selektivnost prema malignim ćelijskim linijama u odnosu na normalnu liniju u poređenju sa cisplatinom koja je bila nisko selektivna, a koja predstavlja jedan od standardnih hemioterapeutika. Najveću selektivnost su iskazali ekstrakti i frakcije koji su imali i najjače citotoksično dejstvo prema HeLa ćelijama: ekstrakti i frakcije vrste *F. spiralis* i jesenjih uzoraka vrste *F. virsoides*. Dobru selektivnost ostvarili su i osnovni ekstrakt, a potom i petroletarska i etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis* prema LS174T i K562 linijama, kao i etilacetatna frakcija prema MDA-MB-453 ćelijskoj liniji.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa navodima drugih autora koji su pokazali citotoksičnu aktivnost ekstrakta vrste *F. spiralis*, uzorkovanog iz portugalskog priobalja, prema ćelijama hepatocelularnog karcinoma (Alves i sar., 2016). Literaturni podaci takođe sugerišu da bi različite klase primarnih i sekundarnih metabolita kao što su fenoli, masne kiseline, terpeni, hidrokarboni i fukoksantin mogli biti odgovorni za citotoksični efekat *F. spiralis* prema MCF-7 ćelijama adenokarcinoma dojke (Ayyad i sar., 2011; Boujaber N. i Boujaber N, 2013) ).

Najizraženiji citotoksični efekti petroletarskih i etilacetatnih frakcija i osnovnih ekstrakata navode na zaključak da su odgovorne komponente za ovu aktivnost masne kiseline i polifenoli, kojih je bilo najviše u ovim frakcijama a i moguće njihovo sinergističko dejstvo u osnovnim ekstraktima. Rezultati su u saglasnosti sa obimnim literaturnim navodima koji su pokazali da polifenoli i masne kiseline, a pogotovo polinezasićene masne kiseline, imaju selektivno citotoksično dejstvo (Pacheco i sar., 2018; Paiva i sar., 2014).

Do sada objavljeni podaci pokazali su i da bi polisaharid fukoidan mogao biti jedna od komponenti odgovornih za citotoksičnu aktivnost. Utvrđeno je da je fukoidan izolovan iz algi *Sargaassum* spp. i *Fucus vesiculosus* smanjio vijabilnost ćelija karcinoma pluća i melanoma (Ale i sar., 2011). Dalja ispitivanja frakcija i ekstrakata vrsta *F. spiralis* i *F. virsoides* svakako bi trebalo da uključe i ispitivanje prisustva ovog polisaharida.

Protočnom citometrijom želeli smo da utvrdimo da li ekstrakti i frakcije ispitivanih vrsti algi dovode do proapoptotskog efekta u vidu nakupljanja ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa i zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G2/M fazama. Kako je fragmentacija DNK molekula jedna od glavnih karakteristika apoptoze, nakon bojenja sa PI i analize na protočnom citometru, apoptotske

ćelije sa fragmentisanom DNK se uočavaju kao pik u subG1 delu histograma, odnosno predstavljaju akumulaciju apoptotskih ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa (Kajstura et al., 2007).

Rezultati analize HeLa ćelija na protočnom citometru pokazali su da je do najveće akumulacije u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa je došlo nakon tretmana etilacetatnom i petroletarskom frakcijom vrste *F. spiralis*. Od svih testiranih ekstrakata i frakcija vrste *F. virsoides* etilacetatna i petroletarska letnja frakcija su indukovale najveću akumulaciju HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa. Od jesenjih ekstrakata i frakcija *F. virsoides*, najveću akumulaciju u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa indukovali su jesenji ekstrakt i petroletarska frakcija. Iako su jesenji uzorci vrste *F. virsoides* pokazali bolji citotoksični efekat (MTT testom), veći procenat ćelija, tretiranih letnjim frakcijama vrste *F. virsoides*, bio je u subG1 fazi. Ovo se može objasniti ograničenjima metode protočne citometrije, koja često ne dozvoljava detekciju ćelijskih ostataka nakon ćelijske smrti. Tako su ćelije tretirane aktivnijim jesenjim frakcijama, koje više nisu bile vijabilne, su mogle biti izgubljene u procesu pripreme za metodu citometrije. Proapoptotski efekat ekstrakata i frakcija se, dakle, ispoljavao nakupljanjem ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, a utvrđeno je i zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazama pri obe ispitivane koncentracije (IC<sub>50</sub> i dvostruke IC<sub>50</sub>), kao i u dva vremenska intervala, nakon 24 h i 48 h. Analizom svih dobijenih rezultata pokazano je da na razliku u dejstvu ekstrakata i frakcija, odnosno na zastoj u ćelijskom ciklusu i proapoptotski efekat utiče vrsta algi iz kojih su izolovani ekstrakti i frakcije, a u slučaju vrste *F. virsoides* i sezonski faktori sredine u kojoj rastu alge.

Daljom analizom možemo zaključiti da su frakcije bogate polifenolima i masnim kiselinama imale izražen efekat na akumulaciju ćelija u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa, što je bilo u skladu sa literaturnim podacima (Brglez Mojzer i sar., 2016; Jing i sar., 2013; Lamoral-Theys i sar., 2010; Pacheco i sar., 2018).

Pored uticaja polifenola i masnih kiselina na zastoj u fazama ćelijskog ciklusa, u navodima drugih autora se spominje fukoidan kao jedna od aktivnih komponenti koje bi mogle da doprinesu ovakvom efektu. Potvrđeno je da fukoidan indukuje zastoj u ćelijskom ciklusu i apoptozu (Kim i sar., 2010). Kim i njegovi saradnici u svojim studijama došli su do podataka da fukoidan inhibira rast kancerskih ćelijskih linija humanog kolona HT-29 i HTC116 i indukuje apoptozu, dok istovremeno nije imao nikakvog efekta na normalne FHC ćelije humanog kolona (Kim i sar., 2010).

Prema tome i u našem radu bi fukoidan, pored polifenola i masnih kiselina, mogao biti jedan od faktora koji su doprineli pojavi apoptoze nakon tretmana HeLa ćelija ispitivanim ekstraktima algi. Fukoidan bi u antikancerskoj terapiji mogao imati dvojako dejstvo. Jedno je sinergističko dejstvo sa postojećim antikancerskim agensima, zbog njegovog citotoksičnog dejstva. Drugo je moguće učešće u prevenciji sistemske toksičnosti standardne antikancerske terapije, jer je pokazana selektivnost ovog jedinjenja prema tumorskim ćelijama u odnosu na normalne ćelije. Primena fukoidana sa standardnim hemioterapeuticima bi značila i aplikovanje manje doze tih hemioterapeutika, a samim tim i manju sistemska toksičnost (Atashrazm i sar., 2015).

Iako se metoda protočne citometrije standardno primenjuje za detekciju ćelija u apoptozi, usled gore pomenutih nedostataka same metode, trebalo je još jednom metodom potvrditi da su ekstrakti i frakcije imali proapoptotski efekat, te su ćelije nakon tretmana ekstraktima i frakcijama posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom.

Ispitivanjem HeLa ćelija pod fluorescentnim mikroskopom nakon 24 h tretmana sa dvostrukim inhibitornim koncentracijama (2xIC<sub>50</sub>) ekstrakata i frakcija uočeni su tipični znaci ćelijske smrti, odnosno apoptoze. Analizom efekta ekstrakata i frakcija vrste *F. spiralis* utvrđeno je da je najizraženiji efekat pokazala etilacetatna frakcija. Jesenji ekstrakt i petroletarska frakcija su pokazali bolji efekat od ostalih ispitivanih jesenjih uzoraka vrste *F. virsoides*, dok je etilacetana frakcija letnjeg uzorka vrste *F. virsoides* pokazala bolji proapoptotski efekat u odnosu na ostale ispitivane letnje uzorke.

Rezultati dobijeni analizom morfoloških promena tretiranih ćelija su potvrdili naše rezultate dobijene analizom preraspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Ekstrakti i frakcije koji su imali najjači proapoptotski efekat i indukovali najveći zastoj u SubG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa su pokazali identično dejstvo na HeLa ćelije što je potvrđeno morfološkom analizom nakon obavljene

fluorescentne mikroskopije. Na mikrografijama su uočene ćelije koje su bile izmenjene morfologije, ali intaktne membrane, obojene akridin oranžom (zeleno), zaokrugljene, manjeg dijametra u odnosu na ćelije u kontroli, a uočene su pojave mehuranja membrane, tipične za ćelije u apoptozi. Apoptotska tela i ćelije u sekundarnoj nekrozi obojeni su narandžasto-crvenom bojom usled narušavanja integriteta ćelijske membrane i prodiranja etidijum-bromida (Ribble et al., 2005).

Jedna od ključnih osobina maligno transformisanih ćelija je njihova sposobnost migracije. Rasejavanje ćelija iz primarnog tumora i njihovo metastaziranje u udaljene organe je jedan od najčešćih uzroka smrti obolelih od malignih bolesti. Da bi tumorske ćelije otpočele migraciju potrebno je da poseduju invazivni fenotip koji im omogućava da reaguju na promigratorne signale iz spoljašnje sredine (Yamaguchi i sar., 2005). Molekuli koji učestvuju u migraciji malignih ćelija mogu biti potencijalne mete za antimetastatsku terapiju.

“Scratch esej”, je eksperiment zasnovan na osnovnom 2D modelu ćelija u kulturi, koji može dati uvid u sposobnost ćelija da migriraju praćenjem njihove sposobnosti da popune prekid kontinuiteta sloja ćelija (Liang i sar., 2007). EA.hy926 ćelijska linija je nastala fuzijom A549 maligno transformisanih ćelija i humanih endotelnih ćelija umbilikalne vene. Sposobnost athezije i migracije EA.hy926 ćelija je veća u odnosu na roditeljsku A549 liniju, dok je stopa proliferacije slična onoj kod A549 ćelija, te je ova fuzionisana ćelijska linija dobar model za izučavanje ćelijske migracije *in vitro* (Lu i sar., 2009). Naši rezultati su pokazali da su najbolji efekat u sprečavanju migracije EA.hy926 ćelija imali ekstrakt i frakcije vrste *F. spiralis* i to redom: etilacetatna frakcija, osnovni ekstrakt i petroletarska frakcija. Zatim, značajan efekat imali su ekstrakt i pojedine frakcije jesenjeg uzorka vrste *F. virsoides* i to redom: etilacetatna frakcija, petroletarska frakcija i osnovni ekstrakt. Znatno slabiji efekat na inhibiciju migracije su pokazali ekstrakti i frakcije letnjeg uzorka vrste *F. virsoides*. Ostvareni efekti ekstrakata i frakcija na spečavanje migracije endoteljskih ćelija ukazuju na mogućnost veze između etilacetatne frakcije bogate fenolima i petroletarske frakcije bogate masnim kiselinama na zaustavljanje migracije. Uočena razlika u efektu između jesenjih i letnjih uzoraka odgovara našoj, hemijskom analizom potvrđenoj, razlici u sastavu između ekstrakata i frakcija sakupljenih u različitim sezonama. Letnji ekstrakti i frakcije koji su iskazali neznatan ili uopšte nisu imali efekat na ćelijsku migraciju, imali su znatno manju količinu ukupnih fenola u odnosu na jesenje ekstrakte i frakcije, kao i znatno manju količinu n-3 masnih kiselina. Najjači antimigratorni efekat ekstrakta i frakcija alge *F. spiralis* ukazuje da su određeni tip polifenola, masnih kiselina i njihovo sinergističko dejstvo u osnovnom ekstraktu sa drugim komponentama, odgovorni za sprečavanje migracije EA.hy926 ćelija (Brglez Mojzer i sar., 2016; Pacheco i sar., 2018; Silva i sar., 2013). Ferres i saradnici su pokazali da florotanini, polifenoli, karakteristični za mrke alge, sprečavaju migraciju kancerskih ćelija (Ferrerres i sar., 2012). Takođe, zabeleženo je u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima da fukoidan može uticati na migratorne i metastatske sposobnosti maligno transformisanih ćelija (Ferrerres i sar., 2012; Kim i sar., 2010). Fukoidan pored masnih kiselina i polifenola može doprineti antimigratornim efektima ekstrakata i frakcija.

Rast tumora prati i rast vaskularne mreže krvnih i limfnih sudova. Regulacija angiogeneze se vrši kako stimulišućim, tako i inhibitornim molekulima. Nivoi ekspresije angiogenih faktora znatno utiču na agresivnost tumorskih ćelija. Otkrivanje novih inhibitora angiogeneze moglo bi da doprinese smanjenju smrtnosti od kancera. Postojeće antiangiogene terapije nisu uspele da poboljšaju preživljavanje pacijenata. Prema tome, postoji potreba za novim antiangiogenim agensima koji bi u kombinaciji sa citostaticima bili efikasni u lečenju kancera (Nishida i sar., 2006).

Vaskularna mreža tumora ne mora biti sastavljena samo od endotelnih ćelija, već endotelne ćelije i ćelije tumora mogu činiti „mozaične” sudove. Pored toga, kancerske ćelije se mogu fuzionisati sa endoteljskim ćelijama i tako formirati hibridne ćelije. Ovaj proces se dešava i *in vitro* i *in vivo*. Endotelni markeri ovih hibridnih ćelija omogućavaju izbegavanje imunskog odgovora, dok proteaze degradiraju vaskularnu bazalnu membranu (Lu i sar., 2009).

Ispitivani uzorci u ovom radu pokazali su da poseduju antiangiogeni potencijal. Iz rezultata može se zaključiti da vrsta *F. spiralis* i uzorci jesenjih frakcija vrste *F. virsoides* imaju dobar

antiangiogeni efekat, izuzev n-butanolne frakcije, koja je i kroz sve do sada opisane eksperimente pokazivala najslabiji efekat. Samo je etilacetatna frakcija letnjih uzoraka vrste *F. virsoides* ostvarila antiangiogeni efekat. Dobar efekat ispitanih ekstrakata i frakcije ogleda se u inhibiciji formiranja karakteristične mreže, koju stvara ćelijska linija EA.hy926, uz nemogućnost ostvarivanja međućelijskih veza i međućelijske komunikacije. Ovaj efekat se na mikrofografijama vidi kao prisustvo pojedinačnih, živih, ali međusobno nepovezanih ćelija.

Ovi rezultati sugerišu da ulogu antiangiogenih agenasa imaju i polifenoli i masne kiseline, na šta ukazuju i podaci drugih autora, koji su pokazali da ova jedinjenja ispoljavaju antiangiogenu aktivnost (Brglez Mojzer i sar., 2016; Pacheco i sar., 2018; Rose i Connolly, 2000). Takođe, ne možemo isključiti ni ulogu fukoidana u ekstraktima, jer literaturni podaci ukazuju da fukoidan može biti odgovoran za supresiju angiogeneze inhibirajući vezivanje VEGF za odgovarajući receptor u ćelijskoj membrani (Cumashi i sar., 2007). Odsustvo inhibicije angiogeneze nakon tretmana letnjim ekstraktom, petroletarskom i n-butanolnom frakcijom vrste *F. virsoides*, ukazuje na postojanje promena u sastavu ili količini aktivnih komponenti sa antiangiogenim potencijalom alge *F. virsoides* u zavisnosti od sezonskih promena u faktorima sredine.

### 5.3. Antidijabetički potencijal ekstrakata i frakcija

Problemi koji su karakteristični za dijabetes utiču na povećanje rizika za nastanak kancera: visoki nivoi insulina, visok nivo šećera u krvi i hronična inflamacija. Ljudi koji imaju dijabetes često imaju i dodatne faktore rizika za nastanak kancera kao što su gojaznost, loša ishrana, starost, fizička neaktivnost. Prevencijom ili držanjem dijabetesa pod kontrolom može se smanjiti incidenca kancera. Enzim  $\alpha$ -glukozidaza je ključan u procesu stvaranja monosaharida jer katalizuje hidrolizu složenih ugljenih hidrata, koji se dalje apsorbuju u tankom crevu što za posledicu ima povećanje nivoa glukoze u krvi nakon obroka. Inhibicijom ovog enzima sprečava se postprandijalna hiperglikemija (Palanuvej i sar., 2009).

Svi testirani ekstrakti i frakcije su ispoljili znatno jaču inhibiciju enzima  $\alpha$ -glukozidaze u odnosu na primenjeni standardni antidijabetički lek akarbozu. Ekstrakt i frakcije vrste *F. spiralis* su pokazali najjaču inhibiciju enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Slede uzorci vrste *F. virsoides* jesenji pa letnji. Etilacetatne i petroletarske frakcije i osnovni ekstrakti su ostvarili jaču inhibiciju enzima u odnosu na n-butanolne frakcije. Povoljne  $IC_{50}$  vrednosti etilacetatnih frakcija ukazuju na uticaj polifenola u inhibiciji enzima. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim prema kojima polifenoli mogu inhibirati enzime koji hidrolizuju polisaharide i tako sprečavati pojavu hiperglikemije (Hanamura i sar., 2005; de Sousa i sar., 2004). Pokazano je da su florotanini efikasni kao inhibitori enzima  $\alpha$ -glukozidaze (Liu i sar., 2016). Snažno dejstvo petroletarskih frakcija ukazuje da i masne kiseline inhibiraju ovaj enzim. Ovaj podatak u saglasnosti je sa podacima iz literature (Liu i sar., 2018). Su i saradnici su pokazali da zasićene i nezasićene masne kiseline inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu jače nego standard, akarboza (Su i sar., 2013). Kao najbolji inhibitori među nezasićenim masnim kiselinama izdvojile su se redom: oleinska, linoleinska,  $\alpha$ -linoleinska, arahidonska, palmitoleinska. Od zasićenih masnih kiselina zbog svog inhibitornog potencijala istakle su se redom: palmitinska, miristinska, stearinska i laurinska (Su i sar., 2013).

Naši dobijeni rezultati su u skladu sa navodima drugih autora prema kojima je etanolni ekstrakt vrste *F. spiralis* ispoljio inhibiciju enzima  $\alpha$ -glukozidaze i amilaze (Lordan i sar., 2013). Inhibitorno dejstvo ekstrakata i frakcija vrste *F. virsoides* na enzimsku aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze je prvi put pokazano u našem radu, pri čemu je uočena jasna razlika u dejstvu između jesenjih i letnjih uzoraka. Istraživanja su pokazala značajnu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola i florotanina iz mrke alge *Padina pavonica* i inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze (Husni i sar., 2014). Kellog i saradnici su utvrdili da je etilacetatna frakcija *Fucus distichus*, alge sa Aljaske, ispoljila najjaču inhibitornu aktivnost prema  $\alpha$ -glukozidazi, kao i da je ova frakcija imala najveći sadržaj ukupnih fenola (Kellogg i sar., 2014). Naše istraživanje ukazuje da inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze najverovatnije potiče od fenola, koji su bili znatno zastupljeniji u uzorcima vrste *F. virsoides* sakupljane u jesen u odnosu na uzorke iste alge sakupljane u leto. Ovi rezultati, prvi put objavljeni u našem radu

(Grozđanić i sar., 2019), jasno pokazuju da alga *F. virsoides* ima potencijala da se koristi za regulisanje nivoa glukoze u krvi, što joj omogućuje da se priključi širokom spektru sličnih biljnih preparata koji su u upotrebi kod pacijenata sa hiperglikemijom ili dijabetesom. Rezultati naše studije takođe sugerišu da osim fenola i nezasićenih masnih kiselina i drugi konstituenti ekstrakata, zajedno doprinose visokoj inhibiciji enzima. Ovo se može zaključiti na osnovu hemijskog sastava vrste *F. spiralis* koja je, iako je imala manje ukupnih fenola i nezasićenih masnih kiselina, pokazala bolju inhibiciju enzima  $\alpha$ -glukozidaze od ispitivanih ekstrakata vrste *F. virsoides*.

## 5.4. Antimikrobni potencijal ekstrakata i frakcija

Prirodni preparati i njihovi derivati imaju značajnu ulogu u mikrobiologiji. Oko 75% lekova koji se koriste u lečenju infektivnih bolesti su prirodnog porekla. (Newman i sar 2003). Alge su poznate kao dobri izvori antimikrobnih supstanci (Pérez i sar., 2016; Taskin i sar., 2010).

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata i frakcija ispitivanih vrsta algi *F. spiralis* i *F. virsoides* su pokazali povezanost sa sadržajem ukupnih fenola i masnih kiselina. Kod vrste *F. spiralis* n-butanolna frakcija, najbogatija ukupnim fenolima, a zatim, i petroletarska, frakcija najbogatija masnim kiselinama, su ostvarile najbolje antimikrobne efekte. Kod ekstrakata i frakcija vrste *F. virsoides* najjaču inhibiciju rasta mikroorganizma ostvarile su etilacetatne frakcije iz obe sezone, koje su takođe imale i najveću količinu ukupnih fenola. Literaturni podaci podržavaju da polifenoli i masne kiseline imaju antimikrobni efekat (Daglia, 2012; Saritha i sar., 2018). Saritha i saradnici su demonstrirali da su frakcije bogate masnim kiselinama izolovane iz tri različite makroalge imale antibakterijsko dejstvo (Saritha i sar., 2018). Prethodne studije u kojima je korišćen manje osetljiv disk-difuzni metod su, takođe, detektovale antimikrobnu aktivnost ekstrakata vrste *F. spiralis* (Ibtissam i sar., 2009; Oumaskour i sar., 2012, 2013; Rhimou i sar., 2013). Sa druge strane, Rizzo i saradnici su pokazali antibakterijsku aktivnost etanolnog ekstrakta vrste *F. virsoides* (Rizzo i sar., 2017). Etahiri i saradnici su zabeležili da su sezonske varijacije uslova sredine imale uticaja na antibakterijsku aktivnost ekstrakata algi, kao i da su alge sakupljene iz priobalnog pojasa Maroka u periodu od marta do maja imale jaču antibakterijsku aktivnost u odnosu na alge sakupljene u decembru i januaru (Etahiri i sar., 2003).

Naši rezultati su pokazali i različit stepen osetljivosti bakterijskih i gljivičnih sojeva na dejstvo ekstrakata i frakcija. Bakterijski sojevi su bili osetljiviji na dejstvo ekstrakata i frakcija. Na osnovu literaturnih podataka, jasno je da uzrok različite osetljivosti treba tražiti u specifičnoj građi i propustljivosti ćelijskog zida bakterijskih i gljivičnih ćelija (Madigan i sar., 2019; Yang i Anderson, 1999). Građa ćelijskog zida uslovljava i razliku u osetljivosti na antimikrobna sredstva između G+ i G- bakterija. G+ bakterije imaju nešto propustljiviji ćelijski zid koji se sastoji od peptidoglukana i tejhodne kiseline, a G- bakterije imaju i dodatni lipopolisaharidni sloj sa spoljašnje strane zida. Ćelijski zid gljiva je različito građen kod različitih grupa, ali se pretežno sastoji od čvrstog hitina i glukana (polisaharidi), (Kosanić i sar., 2015, 2012; Madigan i sar., 2019).

Iako testirani ekstrakti nisu bili jači od standardnih antibiotika i antimikotika, što je očekivano, ispoljili su znatno antimikrobno dejstvo. Upravo ovi rezultati ih izdvajaju kao potencijalne kandidate za dalja ispitivanja antimikrobne aktivnosti u formi ekstrakata i frakcija, kao i u formi njihovih pojedinačnih komponenti. Njihovim kombinovanjem sa standardnim antimikrobnim agensima mogla bi se povećati efikasnost standardne terapije i smanjiti rezistencija mikroorganizama. Rezistencija patogena postaje sve veći globalni problem, a naročito je izražena u bolničkim uslovima i kod imunokompromitovanih pacijenata poput onkoloških bolesnika (Szakács i sar., 2006). Iz ovih razloga, izuzetno je značajan moguć doprinos prirodnih agenasa u prevazilaženju rezistencije mikroorganizama na osnovne tipove terapije.

Na osnovu naših rezultata i literaturnih podataka, jasno je da je dalja hemijska analiza uzoraka algi *F. spiralis* i *F. virsoides* neophodna za identifikaciju potencijalnih novih terapeutika, pa tako, predstavlja jedan od glavnih ciljeva budućih istraživanja. Iz svega do sada navedenog, jasan je potencijal fenola iz ispitivanih vrsti algi, kao antikancerskih agenasa koji mogu potisnuti

agresivne kancere visokog metastatskog potencijala. Na osnovu rezultata koje su pokazale frakcije, ove dve vrste algi, bogate ukupnim fenolima možemo zaključiti da su fenoli iz algi *F. spiralis* i *F. virsoides* doprineli i indukciji apoptoze, sprečavanju migracije, angiogeneze, inhibiciji enzima  $\alpha$ -glukozidaze i antimikrobnoj aktivnosti. Ukazano je i na moguću ulogu masnih kiselina, pogotovo n-3 masnih kiselina kao agenasa koji dovode do *in vitro* citotoksičnosti, antimikrobnog efekta, i inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze što možemo zaključiti na osnovu efekta koje su ostvarile petroletarske frakcije. Dobijene razlike u hemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti ekstrakata i frakcija vrste *F. virsoides* sugerišu da bi dalja farmakološka istraživanja trebalo da uzmu u obzir sezonu branja algi, kako bi se iz njih izdvojila najveća količina aktivnih jedinjenja i ostvario najbolji biološki efekat.

## 6. Zaključci

- Ekstrakti i frakcije su ispoljili selektivno citotoksično dejstvo prema maligno transformisanim ćelijskim linijama.
- Ekstrakti i frakcije su indukovali apoptozu, a najjači proapoptotski efekat je ispoljila etilacetatna frakcija vrste *F. spiralis*.
- Ekstrakti i frakcije su ispoljili antiangiogeni i antimigratorni efekat *in vitro*.
- Ekstrakti i frakcije su inhibirali  $\alpha$ -glukozidazu *in vitro*.
- Ekstrakti i frakcije su ostvarili antimikrobno dejstvo.
- Efekti ispitivanih ekstrakata i frakcija su zavisili od vrste algi i njihovog specifičnog sastava u kvalitativnom i kvantitativnom smislu.
- Sezonske varijacije sredinskih faktora su uticale na produkciju aktivnih komponenti ekstrakata i frakcija
- Sadržaj ukupnih fenola i masnih kiselina je imao uticaj na biološku aktivnost ekstrakata i frakcija.
- Na biološku aktivnost ekstrakata i frakcija uticalo je i moguće sinegrističko i antagonističko međusobno dejstvo ukupnih fenola i masnih kiselina kao i njihov odnos sa drugim aktivnim metabolitima u ispitivanim ekstraktima i frakcijama.



## 7. Literatura

- Ahmad, R. (2018). Introductory Chapter: Basics of Free Radicals and Antioxidants. In *Free Radicals, Antioxidants and Diseases*, R. Ahmad, ed. (Rijeka: IntechOpen), DOI: 10.5772/intechopen.76689.
- Alam, M.M., Naeem, M., Khan, M.M.A., Uddin, M. (2017). Vincristine and Vinblastine Anticancer *Catharanthus* Alkaloids: Pharmacological Applications and Strategies for Yield Improvement. In *Catharanthus Roseus: Current Research and Future Prospects*, M. Naeem, T. Aftab, M.M.A. Khan, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 277–307.
- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Morgan, D., Raff M., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J., Hunt, T. (2015). *Molecular biology of the cell*, VI izdanje, Garland Science, New York.
- Ale, M.T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J.D., and Meyer, A.S. (2011). Fucoidan from *Sargassum sp.* and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 331–336.
- Alves, C., Pinteus, S., Horta, A., and Pedrosa, R. (2016). High cytotoxicity and anti-proliferative activity of algae extracts on an in vitro model of human hepatocellular carcinoma. *SpringerPlus* 5, 1339–1352.
- Anđelković, Z., Somer, Lj., Matavulj, M., Lačković, V., Lalošević, D., Nikolić, I., Milosavljević, Z., Danilović, V. (2002). Čelija i tkiva. I izdanje, Bonafides, Niš.
- Andrade, P.B., Barbosa, M., Matos, R.P., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T., and Valentão, P. (2013). Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chem.* 138, 1819–1828.
- Aranda E., Owen G.I. (2009). A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol Res.*; 42, 377–89.
- Atashrazm, F., Lowenthal, R.M., Woods, G.M., Holloway, A.F., and Dickinson, J.L. (2015). Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar. Drugs* 13, 2327–2346.
- Ayyad, S.-E.N., Ezmirly, S.T., Basaif, S.A., Alarif, W.M., Badria, A.F., and Badria, F.A. (2011). Antioxidant, cytotoxic, antitumor, and protective DNA damage metabolites from the red sea brown alga *Sargassum sp.* *Pharmacogn. Res.* 3, 160–165.
- Bedoux, G., Hardouin, K., Burlot, A.S., and Bourgougnon, N. (2014). Chapter Twelve - Bioactive Components from Seaweeds: Cosmetic Applications and Future Development. In *Advances in Botanical Research*, N. Bourgougnon, ed. (Academic Press), pp. 345–378.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410.
- Bertoni, G. (2013). A key step in phlorotannin biosynthesis revealed. *Plant Cell* 25, 2770–2770.
- Besednova, N., Zaporozhets, T., Kuznetsova, T., Makarenkova, I., Fedyanina, L., Kryzhanovsky, S., Malyarenko, O., and Ermakova, S. (2019). Metabolites of seaweeds as potential agents for the prevention and therapy of influenza infection. *Mar. Drugs* 17, 373–394.

- Bhatia, S., Garg, A., Sharma, K., Kumar, S., Sharma, A., and Purohit, A.P. (2011). Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation. *Pharmacogn. Rev.* 5, 138–146.
- Biancarosa, I., Belghit, I., Bruckner, C.G., Liland, N.S., Waagbø, R., Amlund, H., Heesch, S., and Lock, E. (2018). Chemical characterization of 21 species of marine macroalgae common in Norwegian waters: benefits of and limitations to their potential use in food and feed. *J. Sci. Food Agric.* 98, 2035–2042.
- Bischoff, H. (1995). The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin. Investig. Med. Med. Clin. Exp.* 18, 303–311.
- Blaženčić J. (2007). *Sistematika algi*. VI izdanje, NNK Internacional, Beograd.
- Boujaber N., and Boujaber N (2013). Cytotoxic activity of some marine algae collected from the coast of sidi bouzid (El Jadida-Morocco). *Int. J. Adv. Pharm. Res.* 4, 2542–2547.
- Bratton, S.B., and Salvesen, G.S. (2010). Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *J. Cell Sci.* 123, 3209–3214.
- Bräunlich, M., Slimestad, R., Wangensteen, H., Brede, C., Malterud, K.E., and Barsett, H. (2013). Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients* 5, 663–678.
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., and Bren, U. (2016). Polyphenols: *extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects*. Mol. Basel Switz. 21, 901-939.
- Campanelli, A., Bulatovic, A., Cabrini, M., Grilli, F., Kljajic, Z., Mosetti, R., Paschini, E., Penna, P., Marini, M. (2009). Spatial distribution of physical, chemical and biological oceanographic properties, phytoplankton, nutrients and coloured dissolved organic matter (CDOM) in the Boka Kotorska Bay (Adriatic Sea). *Geofizika.* 26, 215–228.
- Catarino, M.D., Silva, A.M.S., and Cardoso, S.M. (2018). Phytochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. *Mar. Drugs* 16, 249–283.
- Chiheb, I., Riadi, H., Martinez-Lopez, J., Dominguez Seglar, J. F., Gomez Vidal, J. A., Bouziane, H., and Kadir M. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *Afr. J. of Biotechnol.* 8, 1258-1262.
- Chojnacka, K. (2012). Biologically active compounds in seaweed extracts - the prospects for the application. *Open Conf. Proc. J.* 3, 20–28.
- Collins, K.G., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., and Ross, R.P. (2016). Looking beyond the terrestrial: the potential of seaweed derived bioactives to treat non-communicable diseases. *Mar. Drugs* 14, 60–91.
- Cumashi, A., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., D’Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G.E., Berman, A.E., Bilan, M.I., et al. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17, 541–552.
- Curti, V., Di Lorenzo, A., Dacrema, M., Xiao, J., Nabavi, S.M., and Daglia, M. (2017). In vitro polyphenol effects on apoptosis: An update of literature data. *Semin. Cancer Biol.* 46, 119–131.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 174–181.

- Damjanovic, A.D., Zdunic, G., Savikin, K., Mandic, B., Jadranin, M., Matic, I.Z., and Stanojkovic, T.P. (2016). Evaluation of the anti-cancer potential of *Mahonia aquifolium* extracts via apoptosis and anti-angiogenesis. *Bangladesh Journal of Pharmacology* *11*, 741–749.
- Damonte, E.B., Matulewicz, M.C., and Cerezo, A.S. (2004). Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr. Med. Chem.* *11*, 2399–2419.
- de Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T.B., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B., and Silva, F.R.M.B. (2004). Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3, 7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *J. Nat. Prod.* *67*, 829–832.
- Dias, D.A., Urban, S., and Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* *2*, 303–336.
- Doughman, S.D., Krupanidhi, S., and Sanjeevi, C.B. (2007). Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Curr. Diabetes Rev.* *3*, 198–203.
- Dunai, A., Spohn, R., Farkas, Z., Lázár, V., Györkei, Á., Apjok, G., Boross, G., Szappanos, B., Grézal, G., Faragó, A., et al. (2019). Rapid decline of bacterial drug-resistance in an antibiotic-free environment through phenotypic reversion. *ELife* *8*, e47088.
- Dunstan, D.E., and Goodall, D.G. (2007). Terraced self assembled nano-structures from laminarin. *Int. J. Biol. Macromol.* *40*, 362–366.
- El Gamal, A.A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm. J.* *18*, 1–25.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495–516.
- Ertel, A., Verghese, A., Byers, S.W., Ochs, M., and Tozeren, A. (2006). Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol. Cancer* *5*, 55.
- Etahiri, S. (2002). Isolement et caractérisation de composés pharmacologiquement actifs à partir des algues marines de la côte d'El Jadida ( Maroc ). Th. DOC. UNI. Chouaib Doukkali, Th-577/ETA.
- Etahiri, S., Bultel-Poncé, V., Elkour, i A.E., Assobhei O., Zaoui D., Guyot M. (2003) Antibacterial activities of marine algae from the atlantic coast of Morocco. *Mar. Life.* *13*, 3-9.
- Farid, Y., Jaatit, L., Etahiri, S. (2016). The antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory and antifungal activities of algae collected off the Moroccan cost GJAR. *3*, 269-282.
- Ferreira D. (2013). The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylome Analysis and Anticancer Drugs Testing. In *Oncogenomics and Cancer Proteomics*, Filomena Adegas F., ed. (Rijeka: IntechOpen), p. Ch. 6. DOI: 10.5772/53110.
- Ferreres, F., Lopes, G., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P.B., Sousa, C., Mouga, T., and Valentão, P. (2012). Phlorotannin extracts from Fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MSn: approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. *Mar. Drugs* *10*, 2766–2781.
- Fidler, B., and Goldberg, T. (2014). Ingenol mebutate gel (picato): a novel agent for the treatment of actinic keratoses. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* *39*, 40–46.
- Freile-Pelegrín, Y., and Morales, J.L. (2004). Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Bot. Mar.* *47*, 140–146.

- Gaysinski, M., Ortalo-Magné, A., Thomas, O.P., and Culioli, G. (2015). Extraction, purification, and NMR analysis of terpenes from brown algae. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1308, 207–223.
- Geiselman, J.A., and McConnell, O.J. (1981). Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *J. Chem. Ecol.* 7, 1115–1133.
- Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., Regensteiner, J.G., and Yee, D. (2010). Diabetes and cancer. *Diabetes Care* 33, 1674–1685.
- Goldar, S., Khaniani, M., Derakhshan, S., and Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 16, 2129–2144.
- Gomez-Zavaglia, A., Prieto Lage, M.A., Jimenez-Lopez, C., Mejuto, J.C., and Simal-Gandara, J. (2019). The Potential of seaweeds as a source of functional ingredients of prebiotic and antioxidant value. *Antioxidants* 8, 406–436.
- Goyal, R., and Jialal, I. (2020). Diabetes Mellitus Type 2. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>
- Green, D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94, 695–698.
- Grozđanić, N., Zdunić, G., Šavikin, K., Đuričić, I., Kosanić, M., Mačić, V., Matić, I., Stanojković, T. (2019). Seasonal variation in biopharmaceutical activity and fatty acid content of endemic *Fucus Virsoides* algae from adriatic sea. *Acta Pol. Pharm.* 76, 833-844.
- Gu, Z., Suburu, J., Chen, H., and Chen, Y.Q. (2013). Mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids in prostate cancer prevention. *BioMed Res. Int.* 2013, 824563.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2020). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org/>; searched on 21 August 2020.
- Guiry, M.D. (2012). How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48, 1057–1063.
- Gunathilaka, T.L., Samarakoon, K., Ranasinghe, P., and Peiris, L.D.C. (2020). Antidiabetic potential of marine brown algae - a mini review. *Journal of Diabetes Research (Hindawi)*. e1230218
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanamura, T., Hagiwara, T., and Kawagishi, H. (2005). Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 280–286.
- Hardman, W.E. (2004). (n-3) fatty acids and cancer therapy. *J. Nutr.* 134, 3427S-3430S.
- Haugsten, E.M., Wiedlocha, A., Olsnes, S., and Wesche, J. (2010). Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Mol. Cancer Res.* 8, 1439–1452.
- Hsu, W.J., Lin, M.H., Kuo, T.C., Chou, C.M., Mi, F.L., Cheng, C.H., and Lin, C.W. (2020). Fucoidan from *Laminaria japonica* exerts antitumor effects on angiogenesis and micrometastasis in triple-negative breast cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 149, 600–608.
- Huang, C., and Freter, C. (2015). Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 924–949.

- Husni, A., Wijayanti, R., Ustadi. (2014). Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by *Padina pavonica* extracts. *J. Biol. Sci.* *14*, 515-520.
- Ibtissam, C., Hassane, R., Jose, M. i sar. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *Afr. J. Biotechnol.* *8*, 1258-62.
- Ichihara, K., and Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* *51*, 635–640.
- Iqbal, J., Abbasi, B.A., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., Shah, S.A., and Khalil, A.T. (2017). Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* *7*, 1129–1150.
- Jing, K., Wu, T., and Lim, K. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* *13*, 1162–1177.
- Kajstura, M., Halicka, H.D., Pryjma, J., and Darzynkiewicz, Z. (2007). Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *71*, 125–131.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.
- Kandale, A., Meena, K., Rao, M.M., Panda, P., Mangal, K., Reddy, G., Babu, R. (2011). Marine algae: an introduction, food value and medicinal uses. *J. Pharm. Res.* *4*, 219–221.
- Karsch-Bluman, A., Feiglin, A., Arbib, E., Stern, T., Shoval, H., Schwob, O., Berger, M., and Benny, O. (2019). Tissue necrosis and its role in cancer progression. *Oncogene* *38*, 1920–1935.
- Keith, S.A., Kerswell, A.P., and Connolly, S.R. (2014). Global diversity of marine macroalgae: environmental conditions explain less variation in the tropics. *Glob. Ecol. Biogeogr.* *23*, 517–529.
- Kellogg, J., Grace, M.H., and Lila, M.A. (2014). Phlorotannins from Alaskan seaweed inhibit carbolytic enzyme activity. *Mar. Drugs* *12*, 5277–5294.
- Khalid S. (2018). Therapeutic Potential of Seaweed Bioactive Compounds. In *Seaweed Biomaterials*, Munawar Abbas, ed. (Rijeka: IntechOpen), p. Ch. 2. DOI: 10.5772/intechopen.74060.
- Kharroubi, A.T., and Darwish, H.M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J. Diabetes* *6*, 850–867.
- Kim, E.J., Park, S.Y., Lee, J.-Y., and Park, J.H. (2010). Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol.* *10*, 96.
- Kortlever, R.M., Sodir, N.M., Wilson, C.H., Burkhart, D.L., Pellegrinet, L., Brown Swigart, L., Littlewood, T.D., and Evan, G.I. (2017). Myc cooperates with Ras by programming inflammation and immune suppression. *Cell* *171*, 1301-1315.e14.
- Kosanić, M., Ranković, B., and Stanojković, T. (2015). Biological activities of two macroalgae from Adriatic coast of Montenegro. *Saudi J. Biol. Sci.* *22*, 390–397.
- Kosanić, M.M., Ranković, B.R., and Stanojković, T.P. (2012). Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *J. Sci. Food Agric.* *92*, 1909–1916.
- Kumar, H.D., and Singh, H.N. (1979). Phaeophyta. In *A Textbook on Algae*, H.D. Kumar, and H.N. Singh, eds. (London: Macmillan Education UK), pp. 141–160.

- Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C.R.K., and Jha, B. (2013). 3 - Algal lipids, fatty acids and sterols. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, H. Domínguez, ed. (Woodhead Publishing), pp. 87–134.
- Lamoral-Theys, D., Pottier, L., Dufrasne, F., Neve, J., Dubois, J., Kornienko, A., Ingrassia, R.K. (2010). Natural polyphenols that display anticancer properties through inhibition of kinase activity.
- Larsson, S.C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., and Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* *79*, 935–945.
- Larue, L., and Bellacosa, A. (2005). Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* *24*, 7443–7454.
- Lee, R. E. (2008). *Phycology*, IV izdanje, Cambridge University Press, New York.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., and Zhao, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* *13*, 1671–1695.
- Li, Y., Fu, X., Duan, D., Liu, X., Xu, J., and Gao, X. (2017). Extraction and identification of phlorotannins from the brown alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Mar. Drugs* *15*, 49.
- Liang, C.-C., Park, A.Y., and Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* *2*, 329–333.
- Liberti, M.V., and Locasale, J.W. (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem. Sci.* *41*, 211–218.
- Linardić, J. (1949). Studies on the Adriatic Fucus (*Fucus virsoides*). *Acta Bot. Croat.* *12–13*, 7–131.
- Liu, B., Kongstad, K.T., Wiese, S., Jäger, A.K., and Staerk, D. (2016). Edible seaweed as future functional food: Identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors by combined use of high-resolution  $\alpha$ -glucosidase inhibition profiling and HPLC–HRMS–SPE–NMR. *Food Chem.* *203*, 16–22.
- Liu, J., Abdelmagid, S.A., Pinelli, C.J., Monk, J.M., Liddle, D.M., Hillyer, L.M., Hucik, B., Silva, A., Subedi, S., Wood, G.A., i sar. (2018). Marine fish oil is more potent than plant-based n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumors. *J. Nutr. Biochem.* *55*, 41–52.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* *4*, 118–126.
- Lordan, S., Smyth, T.J., Soler-Vila, A., Stanton, C., Ross, R.P. (2013). The  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chem.* *141*, 2170–2176.
- Lu, Z.J., Ren, Y.Q., Wang, G.P., Song, Q., Li, M., Jiang, S.S., Ning, T., Guan, Y.S., Yang, J.L., and Luo, F. (2009). Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *CR 28*, 16.
- Lugano, R., Ramachandran, M., and Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* *77*, 1745–1770.
- Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W.,M., Stahl, D. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*, XV izdanje. Pearson Education Limited, New York.
- Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 143–148.

- Manni, A., Richie, J.P., Xu, H., Washington, S., Aliaga, C., Bruggeman, R., Cooper, T.K., Prokopczyk, B., Trushin, N., Calcagnotto, A., i sar. (2014). Influence of omega-3 fatty acids on Tamoxifen-induced suppression of rat mammary carcinogenesis. *Int. J. Cancer* *134*, 1549–1557.
- Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M.A., Montinari, M.R., and De Caterina, R. (2008). Omega-3 Fatty Acids, Inflammation and Angiogenesis: Nutrigenomic effects as an explanation for anti-atherogenic and anti-inflammatory effects of fish and fish oils. *Lifestyle Genomics* *1*, 4–23.
- Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T., and Osajima, Y. (1996). In vitro survey of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory food components. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *60*, 2019–2022.
- McInnes, R.S., McCallum, G.E., Lamberte, L.E., and van Schaik, W. (2020). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Host-Microbe Interact. Bact.* *53*, 35–43.
- Mei, C., Zhou, S., Zhu, L., Ming, J., Zeng, F., and Xu, R. (2017). Antitumor effects of *Laminaria* extract fucoxanthin on lung cancer. *Mar. Drugs* *15*, 39.
- Milkova, T., Talev, G., Christov, R., Dimitrova-Konaklieva, S., and Popov, S. (1997). Sterols and volatiles in *Cystoseira barbata* and *Cystoseira crinita* from the black sea. *Phytochemistry* *45*, 93–95.
- Moraes, R.M., Bedir, E., Barrett, H., Burandt, C., Canel, C., and Khan, I.A. (2002). Evaluation of *Podophyllum peltatum* accessions for podophyllotoxin production. *Planta Med.* *68*, 341–344.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* *65*, 55–63.
- Munda, I.M. (1979). Some Fucacean associations from the vicinity of Rovinj, Istrian Coast, Northern Adriatic. *Nova Hedwigia.* *31*, 607-666.
- NCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1998). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P Wayne, Pa.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* *2*, 213–219.
- Noda, H., Amano, H., Arashima, K., and Nisizawa, K. (1990). Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia* *204*, 577–584.
- Ohno, M., and Abe, T. (1991). Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J. Immunol. Methods* *145*, 199–203.
- Orford, K.W., and Scadden, D.T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 115–128.
- Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S., and Assobhei, O. (2012). Screening of antibacterial and antifungal activities in green and brown algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco). *Afr. J. Biotechnol.* *11*, 16831–16837.
- Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S., Assobhei O. (2013). Anti-inflammatory and antimicrobial activities of twenty-three marine red algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida-Morocco). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, *5*.

- Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S., Assobhei, O. (2012) Screening of antibacterial and antifungal activities in green and brown algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco). *Afr. J. Biotechnol.* *11*, 16831-7.
- Pacheco, B.S., dos Santos, M.A.Z., Schultze, E., Martins, R.M., Lund, R.G., Seixas, F.K., Colepicolo, P., Collares, T., Paula, F.R., and De Pereira, C.M.P. (2018). Cytotoxic activity of fatty acids from antarctic macroalgae on the growth of human breast cancer cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* *6*, 185.
- Paiva, L., Lima, E., Patarra, R.F., Neto, A.I., and Baptista, J. (2014). Edible Azorean macroalgae as source of rich nutrients with impact on human health. *Food Chem.* *164*, 128–135.
- Pal, A., Kamthania, M.C. and Kumar, A. (2014) Bioactive compounds and properties of seaweeds a review. *OALib Journal.* *1*, e752.
- Palanuvej, C., Hokputsa, S., Tunsaringkarn, T., Ruangrunsi, N., et al (2009). In vitro glucose entrapment and alpha-glucosidase inhibition of mucilaginous substances from selected Thai medicinal plants. *Sci Pharm* *77*, 837–849.
- Patterson, G.W. (1971). The distribution of sterols in algae. *Lipids* *6*, 120–127.
- Pavlenko, A.F., Kurika, A.V., Khomenko, V.A., and Ovodov, Yu.S. (1974). Polysaccharides of brown algae VIII. A study of pelvecyan and sargassan by methylation. *Chem. Nat. Compd.* *10*, 155–158.
- Peddi, P.F., and Hurvitz, S.A. (2013). Trastuzumab emtansine: the first targeted chemotherapy for treatment of breast cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* *9*, 319–326.
- Pérez, M.J., Falqué, E., and Domínguez, H. (2016). Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Mar. Drugs* *14*, 52.
- Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Horta, A., Fino, N., Rodrigues, A.I., Mendes, S., and Pedrosa, R. (2017). Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). *Food Chem.* *218*, 591–599.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., and Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae1. *J. Phycol.* *39*, 1008–1018.
- Poleksić, V., Bogojević, J., Marković, Z., Dulić Stojanović, Z. (2003). *Zoologija. Poljoprivredni Fakultet, Beograd.*
- Pozarowski, P., and Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* *281*, 301–311.
- Rajbhar, K., Dawda, H., and Mukundan, U. (2015). Polyphenols: methods of extraction. *Sci. Rev. Chem. Commun.* *5*, 1–6.
- Ramasamy Ravichandran, and Goldberg Ira J. (2010). Aldose Reductase and Cardiovascular Diseases, Creating Human-Like Diabetic Complications in an Experimental Model. *Circ. Res.* *106*, 1449–1458.
- Rhimou, B., Hassane, R., José, M., Nathalie, B. (2013). The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco. *Afr. J. Biotechnol.* *9*, 6365–72.



- Ribble, D., Goldstein, N.B., Norris, D.A., and Shellman, Y.G. (2005). A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol.* 5, 12.
- Rizzo, C., Genovese, G., Morabito, M., Faggio, C., Pagano, M. i sar. (2017). Potential antibacterial activity of marine macroalgae against pathogens relevant for aquaculture and human health. *J. Pure Appl. Microbiol.* 11, 1695–1706.
- Rolston, K.V.I. (2017). Infections in cancer patients with solid tumors: a review. *Infect. Dis. Ther.* 6, 69–83.
- Rosa, G.P., Tavares, W.R., Sousa, P.M.C., Pagès, A.K., Seca, A.M.L., and Pinto, D.C.G.A. (2020). Seaweed secondary metabolites with beneficial health effects: an overview of successes in in vivo studies and clinical trials. *Mar. Drugs* 18, 8.
- Rose, D.P., and Connolly, J.M. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr. Cancer* 37, 119–127.
- Saritha S., Kala K.J., Prashob Peter K.J, Nair S.M. (2018). In vitro antibacterial screening of fatty acid fractions from three different microalgae. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 9.
- Sarker, S.D., Nahar, L., and Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the “*in vitro*” antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321–324.
- Shannon, E., and Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: an overview of pharmacological mechanisms and applications. *Mar. Drugs* 14, 81.
- Silke, J., and Meier, P. (2013). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008730.
- Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., and Dias, A.C.P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem.* 90, 157–167.
- Silva, G., Pereira, R.B., Valentão, P., Andrade, P.B., and Sousa, C. (2013). Distinct fatty acid profile of ten brown macroalgae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 23, 608–613.
- Singh, D., and Bonomo, R.A. (2016). Infections in Cancer Patients. *Oncol. Crit. Care.*
- Singh, P., Jayaramaiah, R.H., Agawane, S.B., Vannuruswamy, G., Korwar, A.M., Anand, A., Dhaygude, V.S., Shaikh, M.L., Joshi, R.S., Boppana, R., et al. (2016). Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights. *Sci. Rep.* 6, 18798.
- Sithranga Boopathy, N., and Kathiresan, K. (2011). Anticancer drugs from marine flora: an overview. *J. Oncol.* 2010, e214186.
- Solski, L.V., Longyhore, D.S. (2008). Prevention of type 2 diabetes mellitus with angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Am J Health Syst Pharm.* 65, 935-940.
- Song, M., Chan, A.T., Fuchs, C.S., Ogino, S., Hu, F.B., Mozaffarian, D., Ma, J., Willett, W.C., Giovannucci, E.L., and Wu, K. (2014). Dietary intake of fish,  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids and risk of colorectal cancer: A prospective study in U.S. men and women. *Int. J. Cancer* 135, 2413–2423.
- Su, C.-H., Hsu, C.-H., and Ng, L.-T. (2013). Inhibitory potential of fatty acids on key enzymes related to type 2 diabetes. *BioFactors* 39, 415–421.

- Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., and Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 219–234.
- Taskin, E., Caki, Z., and Ozturk, M. (2010). Assessment of in vitro antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean sea. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 4272–4277.
- Taskin, E., Caki, Z., and Ozturk, M. (2010). Assessment of in vitro antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean sea. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 4272–4277.
- Tierney, M.S., Smyth, T.J., Rai, D.K., Soler-Vila, A., Croft, A.K., Brunton, N. (2013). Enrichment of polyphenol contents and antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity and molecular size. *Food Chem.* 139, 753–761.
- Tierney, M.S., Soler-Vila, A., Rai, D.K., Croft, A.K., Brunton, N.P., Smyth, T.J. (2014). UPLC-MS profiling of low molecular weight phlorotannin polymers in *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* and *Fucus spiralis*. *Metabolomics* 10, 524–535.
- Vadlapudi, V., and John, M. (2012). Antioxidant activities of marine algae: a review. *Int. J. Recent Sci. Res.* 3, 574–580
- van Zijl, F., Krupitza, G., and Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.* 728, 23–34.
- Vento, S., and Cainelli, F. (2003). Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. *Lancet Oncol.* 4, 595–604.
- Wang, Y., Xiang, L., Wang, C., Tang, C., and He, X. (2013). Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PLoS ONE* 8, e71144.
- Wannous, R., Bon, E., Mahéo, K., Goupille, C., Chamouton, J., Bougnoux, P., Roger, S., Besson, P., and Chevalier, S. (2013). PPAR $\beta$  mRNA expression, reduced by n-3 PUFA diet in mammary tumor, controls breast cancer cell growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1618–1625.
- Waterman, P.G., and Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites* (Wiley).
- WHO. (2016). *Global report on diabetes*, World Health Organization, Geneva. p. 83
- World Health Organization . (2020). *WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all*. Geneva.
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., et al. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J. Cell Biol.* 168, 441–452.
- Yang, H., Zeng, M., Dong, S., Liu, Z., and Li, R. (2010). Anti-proliferative activity of phlorotannin extracts from brown algae *Laminaria japonica* Aresch. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 28, 122–130.
- Yang, S.S., Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2001). The Camptothecin Experience: From Chinese Medicinal Plants to Potent Anti-Cancer Drugs. In *Drug Discovery and Traditional Chinese Medicine: Science, Regulation, and Globalization*, Y. Lin, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 61–74.

- Yang, Y., and Anderson, E.J. (1999). Antimicrobial activity of a porcine myeloperoxidase against plant pathogenic bacteria and fungi. *J. Appl. Microbiol.* 86, 211–220.
- Yao, Y., and Dai, W. (2014). Genomic instability and cancer. *J. Carcinog. Mutagen.* 5, 1000165.
- Younes, F., Etahiri, S., and Assobhei, O. (2009). Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc) : Criblage et optimisation de la période de la récolte. *Journal of Applied Biosciences.* 24, 1543 – 1552.
- Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P., and Pestell, R.G. (2012). Cancer stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 2144–2151.
- Yuan, Y.V., and Walsh, N.A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1144–1150.
- Zenthoefler, M., Geisen, U., Hofmann-Peiker, K., Fuhrmann, M., Kerber, J., Kirchhöfer, R., Hennig, S., Peipp, M., Geyer, R., Piker, L., et al. (2017). Isolation of polyphenols with anticancer activity from the Baltic Sea brown seaweed *Fucus vesiculosus* using bioassay-guided fractionation. *J. Appl. Phycol.* 29, 2021–2037.
- Ziegler, U., i Groscurth, P. (2004). Morphological Features of Cell Death. *Physiology* 19, 124–128.
- Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Lann, K.L., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., and Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem.* 116, 693–701.

## 8. Prilozi

### Biografija

Nađa Grozdanić Stanisavljević rođena je 14.11.1981. u Beogradu. Završila je Prvu beogradsku gimnaziju, a zatim 2000. godine upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Opšta biologija. Diplomirala je u decembru 2008. sa prosečnom ocenom 8.29 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Nakon diplomiranja, radila je u osnovnoj školi Ruđer Bošković kao nastavnik biologije. 2009 godine je upisala doktorske studije smer Biologija ćelija i tkiva na Biološkom fakultetu u Beogradu. Iste godine je započela volontiranje u Histološkoj laboratoriji Biološkog fakulteta. Od decembra 2010. je bila volonter na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, gde je i zaposlena u februaru 2011. godine kao istraživač-pripravnik u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, kroz angažovanje na projektu broj 175011 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, pod nazivom „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“. U februaru 2013. godine, Nađa Grozdanić Stanisavljević je stekla naučno zvanje istraživač saradnik. Do danas je publikovala 19 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od kojih dva neposredno vezana za temu doktorske disertacije i veći broj saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima. Od 2011. godine je član Srpskog društva istraživača raka (SDIR) kao i Evropskog društva za istraživanje raka (European Association for Cancer Research, EACR), a od 2019. je i ambasador EACR-a kao i član Evropskog društva za medicinsku onkologiju (European Society For Medical Oncology, ESMO).

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Нађа Грозданић Станисављевић  
Број индекса Б3401/2009

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Биолошки одговор одабраних типова ћелија на деловање екстраката алги *Fucus spiralis* Linnaeus и *Fucus virsoides* J.Agardh in vitro**

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

У Београду, 1. 10. 2020.

Потпис аутора

---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Нађа Грозданић Станисављевић

Број индекса: Б3401/2009

Студијски програм: Биологија, Биологија ћелија и ткива

Наслов рада: Биолошки одговор одабраних типова ћелија на деловање екстраката алги  
*Fucus spiralis* Linnaeus и *Fucus virsoides* J.Agardh in vitro

Ментори: др Татјана Станојковић и др Маја Чакић Милошевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора**

У Београду, 1. 10. 2020.

---

## Изјава о коришћењу

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

**Биолошки одговор одабраних типова ћелија на деловање екстраката алги *Fucus spiralis* Linnaeus и *Fucus virsoides* J.Agardh in vitro**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 1. 10. 2020.

---

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 прерада.** 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 прерада.** 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.