

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Stefana D. Vuletić

BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTA KRUŠINE
(*Frangula alnus*) I NJEGOVE DOMINANTNE
KOMPONENTE, EMODINA, U PROKARIOTSKIM
I EUKARIOTSKIM TEST SISTEMIMA

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Stefana D. Vuletić

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALDER
BUCKTHORN EXTRACT (*Frangula alnus*) AND
ITS DOMINANT COMPONENT, EMODIN, IN
PROCARYOTIC AND EUKARYOTIC TEST
SYSTEMS

Doctoral disertation

Belgrade, 2022

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentor:

dr Dragana Mitić-Ćulafić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Biljana Nikolić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Nataša Simin, vanredni profesor

Univerzitet u Novom Sadu – Prirodno-matematički fakultet

dr Sergej Tomić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za primenu nuklearne energije „INEP“

dr Branka Lončarević, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju (IHTM)

dr Stefana Cvetković, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je najvećim delom odrađena na Katedri za mikrobiologiju, Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta dok su pojedini delovi doktorske disertacije odrađeni u laboratoriji Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu; u laboratoriji grupe za mikrobiološku hemiju i biotehnologiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu; u Centru za hemiju i Centru za mikroelektronske tehnologije Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu; na Odeljenju za imunologiju i imunoparazitologiju Instituta za primenu nuklearne energije INEP, Univerziteta u Beogradu; na Departmanu za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu, Prirodno-matematičkog fakulteta. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije realizovana su zahvaljujući nacionalnom projektu OI 172058 „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije.

Pre svega, veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Dragani Mitić-Ćulafić na ukazanoj prilici i prenesenom znanju tokom ovih godina. Hvala Vam za poverenje, slobodu u eksperimentalnom radu i podršku mojim idejama, ali i na trudu da omogućite da sve ideje realizujemo. Takođe, hvala na pomoći i razumevanju posebno pri kraju izrade i pisanja disertacije, a naročito na prijateljskom odnosu i savetima.

Prof. dr Biljani Nikolić na prenesenom znanju, dragocenim sugestijama prilikom pisanja publikacija i same disertacije kao i brojnim savetima. Hvala Vam na saradnji tokom proteklih godina.

*Prof. dr Nataši Simin na obezbeđenom ekstraktu *Frangula alnus* i njenoj hemijskoj analizi, ali i kritičkoj oceni doktorske disertacije i savetima prilikom pisanja.*

dr Sergeju Tomiću hvala na prilici da dođem na „INEP“ i naučim nešto novo od njega, hvala na zainteresovanosti i svakom savetu prilikom planiranja i izrade eksperimenata kao i samom finalizovanju ove teze.

*dr Branki Lončarević bih se zahvalila na velikom trudu i volji da realizujemo ispitivanja metaboličke aktivnosti sojeva *Staphylococcus aureus*, na brojnim savetima i pomoći. Posebno hvala za prijatnu atmosferu tokom rada i saradnji koja će se, nadam se i ubuduće nastaviti.*

dr Stefani Cvetković dugujem veliku zahvalnost na pomoći prilikom eksperimentalnog rada, pomoći oko rešenja problema na koje se nailazilo i prijateljskoj podršci i sugestijama tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Profesorima Katedre za Mikrobiologiju dr Slaviši Stanković, dr Branki Vuković-Gačić i dr Tanji Berić na stečenom znanju, stručnim savetima, saradnji i kolegijalnom odnosu.

Dragim kolegama Tei Ganić, Tamari Pavlović, Jeleni Đorđević, dr Ivanu Nikoliću, dr Olji Medić, dr Bojani Vasiljević, dr Marini Jovanović, Nini Tomić na pomoći, savetima, druženju i prijateljskoj atmosferi na poslu i van posla.

Posebno hvala Marini Bekić na nesebičnom zalaganju i izradi eksperimentalnog dela disertacije urađenog na „INEP“-u, analizi i obradi rezultata i svom izdvojenom vremenu za mene, moja pitanja i nedoumice.

dr Dušanu Kekiću sa Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Univerziteta u Beogradu – Medicinskog fakulteta, na obezbeđenim sojevima Staphylococcus aureus koji su bili neophodni za izradu ove disertacije ali i njegovim stručnim savetima.

dr Mariji Lješević, hvala na kvalitativnoj hemijskoj analizi ekstrakta Frangula alnus, ali i na savetima i pomoći oko nalaženja rešenja za analizu rezultata kao i pojedinih eksperimenata.

dr Danijeli Randelović hvala na AFM analizi i obradi podataka o morfologiji bakterijskih biofilmova.

Dini Tenji na pomoći oko RT-PCR analize i stručnih saveta oko tumačenja dobijenih rezultata.

Takođe hvala dr Kristini Šarac i Jovani Malbašić sa Rudarsko-geološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na SEM mikrografijama bakterijskih biofilmova.

Mojim roditeljima hvala na svemu što su mi omogućili, podršci tokom čitavog školovanja, ljubavi i razumevanju!

Mom Žarku, na neizmernoj podršci, podsticaju, strpljenju i svojoj ljubavi koju mi pruža. Hvala ti na razumevanju i veri u mene!

Mojim roditeljima.

Biološka aktivnost ekstrakta krušine (*Frangula alnus*) i njegove dominantne komponente, emodina, u prokariotskim i eukariotskim test sistemima

SAŽETAK

Frangula alnus (krušina) ima dugu istoriju korišćenja u tradicionalnoj medicini, a u ovom radu su ispitana njena određena nova svojstva, naročito antibiofilm aktivnost. Pripremljen je etil-acetatni ekstrakt kore krušine koji je hemijski okarakterisan te su ispitane njegova biološke aktivnosti. GC×GC/MS analiza je pokazala da je u ekstraktu dosta zastupljena 4-etoksi-benzoeva kiselina, dok je LC-MS/MS analiza pokazala da je bogat fenolnim i flavonoidnim jedinjenjima među kojima je najdominantniji emodin koji je odabran za dalje testiranje uz ekstrakt. Pokazano je da ekstrakt ima snažnu antioksidantnu aktivnost za razliku od emodina. MIK vrednosti su pokazale da su svi testirani sojevi *Staphylococcus aureus* izuzetno osetljivi na delovanje ekstrakta i emodina, posebno klinički izolati. Rezultati ispitivanja antibiofilm aktivnosti su pokazali da ekstrakt i emodin imaju izuzetno snažan efekat na inhibiciju formiranja biofilмова sojeva *S. aureus*, ali da je efekat na već formirane biofilmove slabiji. Pokazano je da obe test supstance imaju inhibitorni efekat na koncentraciju ekstracelularnih polisaharida, da menjaju količinu eDNK u biofilmu kao i broj ćelija perzistera, ali i deluju na metabolizam ćelija. SEM i AFM mikroskopija su potvrdile antibiofilm efekat ukazujući na promene u morfologiji, strukturi i hrapavosti biofilмова. Dodatno, obe supstance su modulisale ekspresiju *icaA*, *icaD*, *srrA*, *srrB* gena i RNA III. Rezultati MTT testa su ukazali na jaku citotoksičnu aktivnost ekstrakta i emodina prema HepG2 i HCT 116 ćelijskim linijama, dok na imortalizovanoj MRC-5 liniji nije bilo efekta. Međutim, pokazano je da supstance remete ćelijski ciklus svih linija, kao i da indukuju apoptozu i nekrozu i remete njihov mitohondrijski membranski potencijal. Obe test supstance su ispoljile snažan genotoksični efekat na svim odabranim ćelijskim linijama.

Ključne reči: *Frangula alnus*; antibakterijska aktivnost; antibiofilm aktivnost; *Staphylococcus aureus*; antioksidantna aktivnost; citotoksičnost; ćelijski ciklus; apoptoza; mitohondrijski membranski potencijal; genotoksičnost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija mikroorganizama/Genotoksikologija

Biological activity of alder buckthorn extract (*Frangula alnus*) and its dominant component, emodin, in prokaryotic and eukaryotic test systems

ABSTRACT

Frangula alnus (alder buckthorn) has a long history of use in traditional medicine, thus in this study its certain new properties, especially antibiofilm, were examined. Ethyl-acetate extract of buckthorn bark was prepared, chemically characterized and its biological activities were examined. GC×GC/MS analysis showed that 4-ethoxy-benzoic acid, is abundant in the extract, while LC-MS/MS analysis showed that extract is rich in phenolic and flavonoid compounds, with emodin as dominant one, which was selected for further testing along with extract. It was shown that extract has strong antioxidant activity unlike emodin. MIC values showed that all tested strains of *Staphylococcus aureus* were extremely sensitive to the action of the extract and emodin, especially clinical isolates. The results of the study of antibiofilm activity showed that the extract and emodin have an extraordinary inhibitory effect on biofilm formation of *S. aureus* strains, but that the effect on already formed biofilms is less pronounced. It was demonstrated that both test substances have inhibitory effect on the concentration of extracellular polysaccharides, alter the amount of eDNA in the biofilms as well as the number of persister cells, but also affect cell metabolism. SEM and AFM microscopy confirmed the antibiofilm effect, indicating changes in the morphology, structure and roughness of the biofilms. Additionally, both substances modulated the expression of *icaA*, *icaD*, *srrA*, *srrB* genes and RNA III. The results of the MTT test indicated strong cytotoxic activity of the extract and emodin against HepG2 and HCT 116 cell lines, while there was no effect on the healthy MRC-5 line. However, the substances disturbed the cell cycle of all cell lines, as well as induced apoptosis and necrosis and modulated mitochondrial membrane potential. Both test substances showed a strong genotoxic effect on all selected cell lines.

Key words: *Frangula alnus*; antibacterial activity; antibiofilm activity; *Staphylococcus aureus*; antioxidant activity; cytotoxicity; cell cycle; apoptosis; mitochondrial membrane potential; genotoxicity

Scientific field: Biology

Scientific sub-field: Biology of microorganisms/Genotoxicology

Spisak skraćenica i oznaka korišćenih u radu:

Aap – proteini vezani sa akumulacijom
AFM – mikroskopija atomskih sila
ATCC – eng. *American Type Culture Collection*
acetil-CoA – acetil koenzim A
Bap – biofilm asociran protein
BHT – butil hidroksitoluen
BSTFA – N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid
c-di-GMP – bis-(3'-5')-ciklični dimerni gnaozin monofosfat
CDK – ciklin zavisna kinaza
CV – kristal violet
DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikal
DMSO – dimetil sulfoksid
EC₅₀ – efektivna koncentracija test supstance na kojoj je neutralisano 50% DPPH radikala, odnosno inhibiran proces lipidne peroksidacije za 50%
ECACC – eng. *The European Collection of Authenticated Cell Cultures*
eDNK – ekstracelularna DNK
EPS – ekstracelularni polisaharidi
FA – etil-acetatni ekstrakt krušine
FICI – indeks frakcione inhibitorne koncentracije
GC×GC/MS – sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija sa masenim detektorom
HCT 116 – ćelije kolorektalnog karcinoma
HepG2 – ćelije hepatocelularnog karcinoma
LC-MS/MS – tečna hromatografija sa tandemskom masenom spektrometrijom
LP – lipidna peroksidacija
MBK – minimalna baktericidna koncentracija
MDA – malondialdehid
MIK – minimalna inhibitorna koncentracija
MMP – mitohondrijski membranski potencijal
MRSA – meticilin rezistentan *Staphylococcus aureus*
MRC-5 – normalni fetalni fibroblasti pluća
MSSA – meticilin senzitivna *Staphylococcus aureus*
mtDNK – mitohondrijska DNK
MTT – 3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid
PIA – polisaharidni intercelularni adhezin
PRSA – penicilin rezistentan *Staphylococcus aureus*
ROS – reaktivne kiseonične vrste
RSZ - resazurin
SCCmec – mec hromozom stafilokoknih genskih kaseti
SCV – eng. *small colony variants*, specifične varijante kolonija
SEM – skening elektronska mikroskopija
SZO – Svetska zdravstvena organizacija
TA – sistemi toksin-antitoksin
TBA - tiobarbiturna kiselina
WHO – World Health Organization

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1.1. Struktura i heterogenost bakterijskih biofilmova	2
1.1.1.1. Ekstracelularni matriks biofilma.....	3
1.1.1.2. Čelije perzisteri u biofilmu	5
1.1.2. Formiranje biofilmova.....	6
1.2. Bakterijska rezistencija.....	7
1.2.1. Mehanizmi rezistencije na antimikrobne agense	8
1.2.1.1. Mehanizmi rezistencije u planktonskoj životnoj formi	9
1.2.1.2. Mehanizmi rezistencije u zajednici	9
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.3.1. Biofilm <i>S. aureus</i>	11
1.3.1.1. Formiranje biofilma kod <i>S. aureus</i>	12
1.3.1.1.1. PIA-zavisno formiranje biofilma.....	13
1.3.1.1.2. PIA-nezavisno formiranje biofilma	13
1.3.2. Metabolizam <i>S. aureus</i>	14
1.3.3. Stafiloksantin	15
1.4. Kancer.....	16
1.4.1. Rezistencija kancerskih ćelija.....	18
1.4.2. Ćelijski ciklus	18
1.4.3. Ćelijska smrt.....	19
1.4.4. Mitohondrijski membranski potencijal.....	20
1.5. Prirodni izvori novih bioaktivnih jedinjenja.....	21
1.5.1. Biljke – izvori novih agenasa	22
2. Ciljevi	26
3. Materijal i metode.....	28
3.1. Materijal	28
3.1.1. Biljni materijal.....	28
3.1.2. Emodin	28
3.1.3. Rastvori za testiranje antioksidantne aktivnosti	28
3.1.4. Biološki materijal	29
3.1.4.1. Bakterijski sojevi	29
3.1.4.2. Ćelijske linije.....	29
3.1.4.3. Hranljive podloge, rastvori i reagensi za rad sa bakterijskim kulturama.....	29
3.1.4.4. Podloge i rastvori za humane ćelije	31
3.2. Metode.....	33
3.2.1. Priprema etil-acetatnog ekstrakta <i>F. alnus</i>	33

3.2.2. Hemijska karakterizacija etil-acetatnog ekstrakta <i>F. alnus</i>	34
3.2.2.1. Kvalitativna GC×GC/MS analiza	34
3.2.2.2. Kvantitativna LC-MS/MS analiza	34
3.2.3. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti	35
3.2.3.1. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala (DPPH test).....	35
3.2.3.2. Inhibicija lipidne peroksidacije (TBA test)	35
3.2.4. Ispitivanje bioloških aktivnosti na prokariotskim test sistemima	36
3.2.4.1. Održavanje i priprema bakterijskih kultura za rad	36
3.2.4.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	36
3.2.4.2.1. Određivanje minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija – MIK test.....	36
3.2.4.2.1.1. Dinamika preživljavanja sojeva u prisustvu FA ekstrakta/emodina.....	36
3.2.4.2.1.2. Određivanje MIK vrednosti preko metaboličke aktivnosti ćelija	36
3.2.4.2.1.3. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije	36
3.2.4.2.2. Ispitivanje kombinovanog efekta test supstanci i vankomicina primenom metode šahovske table (eng. checkerboard assay)	37
3.2.4.3. Ispitivanje antibiofilm aktivnosti	38
3.2.4.3.1. Efekat na sprečavanje formiranja biofilma.....	38
3.2.4.3.1.1. Određivanje ukupne biomase biofilмова bojenjem kristal violetom	38
3.2.4.3.2. Efekat na već formirani biofilm.....	38
3.2.4.3.3. Ekstrakcija ekstracelularnih polisaharida (EPS) iz bakterijskog biofilma.....	38
3.2.4.3.3.1. Kvantifikacija dobijenog EPS.....	39
3.2.4.3.4. Izolacija ekstracelularne DNK (eDNK) iz bakterijskog biofilma.....	39
3.2.4.3.4.1. Vizuelizacija i kvantifikacija eDNK.....	39
3.2.4.3.5. Izolacija ćelija perzistera iz bakterijskih biofilмова	39
3.2.4.3.6. Ekstrakcija karotenoidnog pigmenta stafiloksantina	39
3.2.4.3.7. Mikroskopska analiza efekta ekstrakta i emodina na biofilmove	40
3.2.4.3.7.1. Priprema preparata za mikroskopiranje	40
3.2.4.3.7.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. <i>Scanning Electron Microscopy</i>) – SEM	40
3.2.4.3.7.3. Mikroskopija atomskih sila (eng. <i>Atomic Force Microscopy</i>) – AFM.....	40
3.2.4.4. Praćenje aerobne respiracije bakterija	40
3.2.4.4.1. Praćenje aerobne respiracije u planktonskom obliku	41
3.2.4.4.2. Praćenje aerobne respiracije u bakterijskom biofilmu.....	41
3.2.4.5. Molekularne analize	42
3.2.4.5.1. Ekstrakcija genomske DNK bakterija	42
3.2.4.5.2. Umnožavanje fragmenata DNK PCR metodom.....	42
3.2.4.5.3. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	42

3.2.4.5.4. Praćenje ekspresije odabranih gena u bakterijskim biofilmovima primenom kvantitativne RT-PCR metode (qRT-PCR).....	42
3.2.4.5.4.1. Ekstrakcija RNK iz biofilмова i njeno prevođenje u cDNK	42
3.2.4.5.4.2. Kvantitativni qRT-PCR	43
3.2.5. Ispitivanje biološke aktivnosti na ćelijskim kulturama.....	43
3.2.5.1. Čuvanje i zamrzavanje ćelijskih kultura.....	43
3.2.5.2. Oživljavanje zamrznutih ćelijskih kultura i njihovo gajenje	43
3.2.5.3. Tripsinizacija ćelija.....	43
3.2.5.4. Procena broja i vijabilnosti ćelija	43
3.2.5.5. Određivanje citotoksičnosti supstanci primenom MTT testa	44
3.2.5.6. Analiziranje efekta test supstanci na ćelijski ciklus.....	44
3.2.5.7. Efekat test supstanci na apoptozu u ćelijskim linijama	45
3.2.5.8. Mitohondrijski membranski potencijal.....	45
3.2.5.9. Ispitivanje genotoksičnosti primenom alkalnog komet testa	46
3.2.5.9.1. Priprema ćelija za ispitivanje genotoksičnosti.....	46
3.2.6. Statistička obrada podataka	47
4. Rezultati.....	48
4.1. Hemijska karakterizacija etil-acetatnog ekstrakta <i>F. alnus</i>	48
4.1.1. Kvalitativna GC×GC/MS analiza.....	48
4.1.2. Kvantitativna LC-MS/MS analiza.....	49
4.2. Antioksidantna aktivnost etil-acetatnog ekstrakta <i>F. alnus</i>	49
4.2.1. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala	50
4.2.2. Potencijal inhibicije lipidne peroksidacije (LP)	50
4.3. Ispitivanja efekta FA ekstrakta i emodina na prokariotskim test sistemima	50
4.3.1. Antibakterijska aktivnost ekstrakta i emodina.....	50
4.3.1.1. Određivanje minimalnih inhibitorskih koncentracija ekstrakta i emodina.....	50
4.3.1.2. Efekat ekstrakta i emodina na preživljavanje testiranih sojeva	51
4.3.2. Kombinovani efekat test supstanci i vankomicina na sojeve <i>S. aureus</i>	53
4.3.3. Antibiofilm aktivnost ekstrakta i emodina	54
4.3.3.1. Efekat FA ekstrakta i emodina na formiranje biofilмова <i>S. aureus</i>	54
4.3.3.2. Efekat odabranih kombinacija emodina i vankomicina na formiranje biofilмова <i>S. aureus</i> ..	57
4.3.3.3. Efekat FA ekstrakta i emodina na već formirane biofilmove <i>S. aureus</i>	57
4.3.3.4. Efekat odabranih kombinacija emodina i vankomicina na već formirane biofilmove <i>S. aureus</i>	59
4.3.3.5. Efekat test supstanci na ekstracelularne polisaharide biofilмова <i>S. aureus</i>	60
4.3.3.6. Efekat FA ekstrakta i emodina na količinu eDNK u matriksu biofilмова sojeva <i>S. aureus</i> ..	62
4.3.3.7. Efekat FA ekstrakta i emodina na broj ćelija perzistera u biofilmu	62

4.3.3.8. Efekat FA ekstrakta i emodina na produkciju pigmenta stafiloksantina	63
4.3.3.9. SEM mikroskopija biofilmova tretiranih FA ekstraktom	64
4.3.3.10. AFM mikroskopija biofilmova tretiranih FA ekstraktom i emodinom	66
4.3.4. Praćenje aerobne respiracije u planktonskoj i biofilm životnoj formi sojeva <i>S. aureus</i>	72
4.3.4.1. Uticaj FA ekstrakta, emodina i odabranih kombinacija na aerobnu respiraciju u planktonskom obliku	72
4.3.4.2. Uticaj FA ekstrakta, emodina i odabranih kombinacija na aerobnu respiraciju u biofilmu ...	75
4.3.5. Molekularne analize	78
4.3.5.1. Detekcija odabranih gena kod sojeva <i>S. aureus</i>	78
4.3.5.2. Efekat FA ekstrakta i emodina na ekspresiju odabranih gena u biofilmu sojeva <i>S. aureus</i>	79
4.4. Citotoksična aktivnost FA ekstrakta i emodina	81
4.4.1. Efekat FA ekstrakta i emodina na preživljavanje odabranih ćelijskih linija	81
4.4.2. Efekat FA ekstrakta i emodina na ćelijski ciklus odabranih ćelijskih linija	83
4.4.3. Analiza tipa ćelijske smrti indukovane FA ekstraktom i emodinom na odabranim ćelijskim linijama	85
4.4.4. Efekat FA ekstrakta i emodina na mitohondrijski membranski potencijal odabranih ćelijskih linija	90
4.5. Genotoksični potencijal FA ekstrakta i emodina.....	92
5. Diskusija	93
6. Zaključci	109
7. Literatura	112
8. Prilozi	134

1. Uvod

Sve biljke koje tradicionalna i zvanična medicina smatraju lekovitim ili ih koriste u tu svrhu nazivaju se lekovitim biljkama. Kako je čovek oduvek usmeren na prirodu, tako je i upotreba lekovitih biljaka započela u dalekoj prošlosti te se može reći da je njihova upotreba stara koliko i samo čovečanstvo. Tačno vreme kada su biljke počele da se koriste kao lekovi ne može se tačno utvrditi, ali postoje dokazi o ovoj njihovoj upotrebi još pre 60000 godina (Jamshidi-Kia i sar., 2018). Skripte o lekovitim biljkama datiraju još od pre 5000 godina u Indiji, Kini i Egiptu i oko 2500 godina u Grčkoj i Aziji. Koristeći biljke u ishrani, čovek počinje da otkriva njihova blagotvorna i lekovita dejstva o kojima dalje uči kroz iskustvo i prenosi znanje na sledeće generacije (Šantić i sar., 2017). Obzirom da se u to vreme nije znalo mnogo o uzročnicima bolesti, korisnim biljakama i načinom njihove upotrebe, znanje koje se sticalo i prenosilo bio je empirijsko. Vremenom, sa novim saznanjima i iskustvom, otkriveni su i razlozi za upotrebu određenih lekovitih biljaka te njihova upotreba polako odbacuje empirijski okvir i počinje da se zasniva na činjenicama (Jamshidi-Kia i sar., 2018). Koliko je znanje o lekovitim biljkama bilo važno govore i podaci o osnivanju prve škole Lekovitog bilja od strane grčkog naučnika Teofrasta, ali i pisanje prve enciklopedije o lekovitom bilju od strane lekara i hirurga Pedaniusa Dioscorides (Jamshidi-Kia i sar., 2018). Međutim, otkrićem i mogućnošću izolacije sekundarnih metabolita biljaka počinje i nagli razvoj farmaceutskih proizvoda baziranih na ovim jedinjenjima, te se sve manje pažnja posvećuje samim lekovitim biljkama.

Sa razvojem nauke, dolazi se i do pronalaska antibiotika penicilina koji se smatra najvećim dostignućem čovečanstva 20. veka (Medina i Pieper, 2016). Potom kreće široka upotreba antibiotika u cilju lečenja bakterijskih infekcija koju za kratko vreme počinje da prati pojava bakterijske rezistencije. Danas bakterijska rezistencija predstavlja globalni problem sa kojim se čovečanstvo suočava zbog čega se nameće stalna potraga za novim antibioticima i antimikrobnim agensima. Sa druge strane, pored problema bakterijske rezistencije javlja se i veliki problem zbog sve veće i učestalije smrtnosti zbog malignih oboljenja. Uprkos naporima i dostignućima u lečenju kancera poslednjih decenija, razvija se otpornost na dostupne hemioterapeutike, ali dolazi i do mnogobrojnih kontraindikacija koje otežavaju lečenje. Heterogenost među pacijentima, tumorima ali i njihova sposobnost da se odupru delovanju terapije čine ovaj problem još ozbiljnijim (Wang i sar., 2019). Ono što je zajedničko za bakterijsku rezistenciju i rezistenciju kancera na lekove jeste da sa izlaganjem leku i sa povećanjem doze, rezistencija raste.

Imajući u vidu ozbiljnost situacije sa lečenjem bakterijskih infekcija i kancera shvatamo da je neophodno pronaći rešenje. Potrebno je pronaći nove agense koji bi se koristili u terapiji ovih oboljenja, pronaći nove strategije i ciljna mesta delovanja terapeutika i smanjiti njihova neželjena dejstva. Ovaj problem čoveka ponovo okreće ka prirodi budući da biljke predstavljaju nepresušan izvor biološki aktivnih jedinjenja koja mogu pronaći svoje mesto u terapiji. Stoga se ova doktorska disertacija bavi izučavanjem bioloških aktivnosti etil-acetatnog ekstrakta kore krušine (*Frangula alnus*) i njene dominantne komponente antrahinona emodina. Pre svega, teza se fokusira na problem bakterijske rezistencije izazvane bakterijskim biofilmovima sojeva *Staphylococcus aureus* i otkrivanja potencijalnih mehanizama delovanja test supstanci. Dodatno, daje nam uvid u to da li su ove supstance pogodne kao citotoksični i genotoksični agensi u terapiji kancera.

1.1. Bakterijski biofilmovi

Bakterije su sposobne da menjaju svoje životne forme, odnosno da prelaze iz planktonskog načina života u zajednicu – biofilm, a u regulaciju promene ove dve životne forme uključen je bis-(3'-5')-ciklični dimerni gnaozin monofosfat (c-di-GMP), tačnije njegov povišen nivo reguliše prelazak iz planktonske u biofilm formu (Chua i sar., 2014). Biofilmovi se definišu kao zajednice bakterija u kojima su ćelije uronjene u matriks od ekstracelularnih polimernih supstanci koje same

produkuju, pričvršćene za različite biotičke i abiotičke površine (Flemming i sar., 2016). Matriks koji produkuju omogućava im rast i opstanak u sesilnoj formi i čini oko 80 – 85% biofilma, dok su ostatak mikroorganizmi (Cowan, 2011). Broj ćelija u biofilmu kreće se od 10^8 do 10^{11} ćel/g i može ga činiti jedna vrsta ili više njih (Morgan-Sagastume i sar., 2008; Srivastava i Bhargava, 2016). Kroz međućelijsku interakciju, ostvarenu posredstvom signalnih molekula i fizičkim kontaktom, zajedno sa svojstvima matriksa, biofilmovi se značajno razlikuju od slobodnoživećih mikroorganizama.

Biofilmovi su jedna od najrasprostranjenijih i veoma uspešnih životnih formi na Zemlji s obzirom da svi viši organizmi, kao i različite abiotičke površine, mogu biti kolonizovani njima. Pronađeni su i u fosilima starim 3,2 milijardi godina (Rodis i sar., 2020). U kontekstu evolucije i adaptacije smatra se da su ovakve životne forme omogućile interakcije među ćelijama i razvoj signalnih puteva. Biofilmovi mogu biti povezani sa upornim infekcijama biljaka, životinja i ljudi, ali i sa kontaminacijom medicinskih uređaja i implanata uključujući urinarne katetere, centralne venske katetere i zglobove proteze. Cistična fibroza, upale pluća, infekcije rana dijabetičara su samo neka od oboljenja koja se javljaju kod ljudi, a izazvana su bakterijskim biofilmovima (Omar i sar., 2017). Ipak, biofilmovi koji se mogu javiti na različitim površinama ljudskog tela ne moraju uvek biti štetni, a primer tome jesu biofilmovi zubnog plaka (Lopez i sar., 2010). Dalje, oni mogu biti odgovorni i za kontaminaciju prirodnih voda i vodovodnih cevi; samim tim pogoršava se kvalitet i higijena vode za piće, ali mogu dovesti i do korozije (Costerton, 1987).

Imajući u vidu sve prednosti i mane bakterijskih biofilмова, od izuzetnog je značaja razumeti kako bakterije u njima funkcionišu radi adekvatnog delovanja na njih.

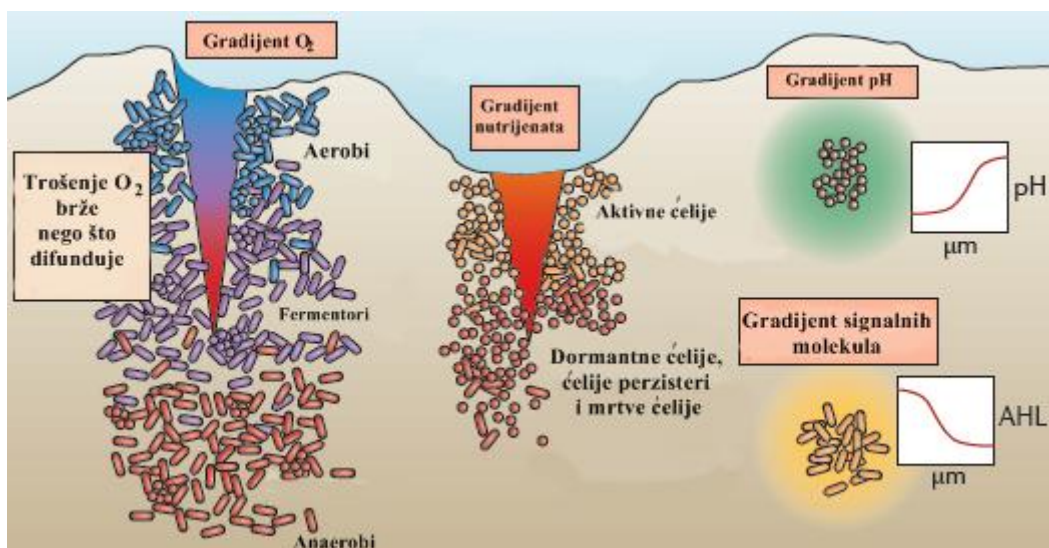
1.1.1. Struktura i heterogenost bakterijskih biofilмова

Zreli biofilmovi su dinamične zajednice bakterijskih ćelija koje aktivno razmenjuju i dele produkte koji su od značaja za održavanje strukture biofilma i obezbeđivanja povoljne okoline (Kostakioti i sar., 2013). Spoljašnji, ali i unutrašnji faktori omogućavaju stalnu promenljivost strukture i arhitekture biofilma u vremenu i prostoru. Sama organizacija biofilma, bazirana na ekstracelularnom matriksu, omogućava interakciju velikog broja ćelija na manjim površinama. Ovo podrazumava razmenu metabolita, signalnih molekula i genetičkog materijala.

Biofilm čine mikrokolonije različitog oblika, uronjene u ekstracelularni matriks koji varira u gustini, formirajući otvorene površine u kojima se stvaraju vodeni kanali. Kroz ove kanale protiče voda što omogućava razmenu svih neophodnih materija, te zato oni predstavljaju vitalne delove biofilma, jer su od značaja za njegovo održanje (de Beer i sar., 1994; Davey i O'Toole G, 2000). Heterogena fiziološka aktivnost u biofilmu dovodi do gradijenta akceptora i donora elektrona, pH vrednosti, redoks uslova ali i hranljivih materija i signalnih molekula neophodnih za komunikaciju. Jedan od najvažnijih faktora, čiji se gradijent uočava u svim biofilmovima, jeste kiseonik. Obično su gornji slojevi biofilma aerobni i bogati kiseonikom, koji aktivno koristeći vrlo brzo mogu da potroše ćelije na površini biofilma, dok će njegova količina opadati ka dubljim slojevima, što će rezultirati anaerobnim uslovima u dubokim slojevima. Slična je situacija i sa potrošnjom hranljivih materija u gornjim slojevima biofilma, što dovodi do izgladnjivanja ćelija u nižim slojevima i čak do usporavanja rasta i formiranja dormantnih ćelija (Flemming i sar., 2016; Slika 1). Bakterije u biofilmu često poseduju vezikule sa različitim enzimima poput proteaza, alkalne fosfataze, fosfolipaze C i enzima koji hidrolizuju peptidoglikan. Pretpostavlja se da je funkcija ovih vezikula liza pojedinih ćelija koje će služiti kao izvor faktora rasta za preostale članove biofilma. Ovo na neki način predstavlja vid altruističkog ponašanja ćelija u biofilmu (Srivastava i Bhargava, 2016).

Kao što je već napomenuto, bakterije u biofilmu su u stalnoj komunikaciji obezbeđenom signalnim molekulima u procesu koji se naziva *quorum sensing*. Ovaj proces funkcioniše kroz lučenje i detekciju autoinducera čija se spoljašnja koncentracija povećava sa povećanjem gustine populacije ćelija (Daniels i sar., 2004). Visoka gustina bakterijske populacije, povećava sintezu autoinducera, koji dalje aktiviraju ekspresiju brojnih gena pod kontrolom međubakterijske

komunikacije. Na ovaj način čitava populacija može da sinhronizuje svoje aktivnosti na nivou cele zajednice (Srivastava and Bhargava, 2016).



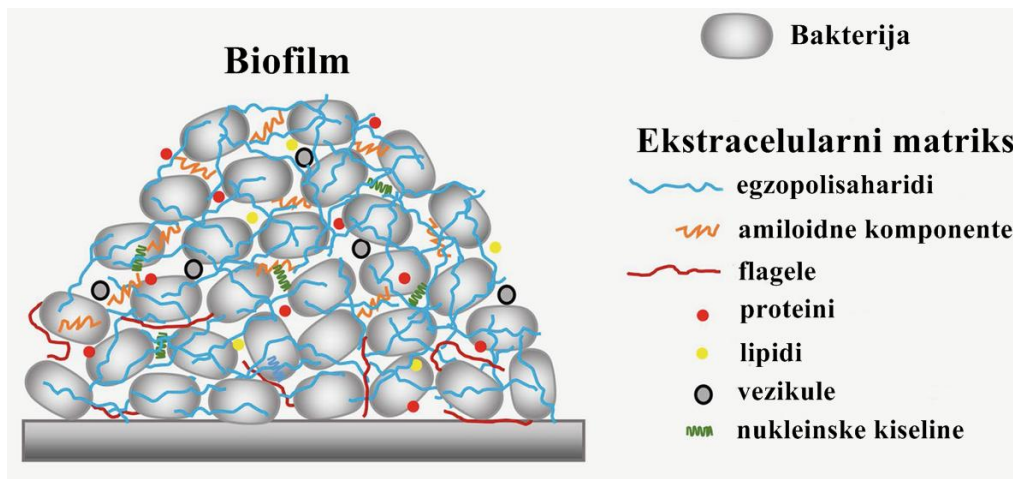
Slika 1. Gradijent i heterogenost u bakterijskim biofilmovima (Flemming i sar., 2016).

1.1.1.1. Ekstracelularni matriks biofilma

Matriks predstavlja ekstracelularni materijal produkovan od samih ćelija, koje su ujedno uronjene u njega. U većini biofilmova matriks čini oko 90% suve mase, dok ćelije čine svega oko 10%. Formiranje matriksa je dinamičan proces koji zavisi od dostupnosti hranljivih materija, sinteze i lučenja ekstracelularnog materijala, stresa i socijalne kompeticije. Očekivano, ovakav proces zahteva veliki utrošak energije, zbog strukturnih i fizičko hemijskih funkcija samog matriksa (Flemming i Wingender, 2010).

Obzirom da su ćelije uronjene u matriks, to im omogućava blizak kontakt, intenzivne interakcije i međubakterijsku komunikaciju. Kako se u njemu nalaze i brojni egzoenzimi, matriks je i sistem u kom se rastvaraju i hranljive materije koje se dalje koriste i kao izvor energije. Takođe, matriks zadržava sve komponente liziranih ćelija, uključujući i DNK koja može poslužiti kao rezervoar gena za horizontalni transfer (Flemming i Wingender, 2010). Osim toga, matriks pruža hidrataciju, omogućava bolje iskorišćenje resursa, zaštitu od antimikrobnih agenasa i olakšava komunikaciju, što doprinosi poboljšanju metaboličkog kapaciteta i rezistencije. Ipak, adhezija, kao osnova za arhitekturu biofilma, mehanička stabilnost i zaštita su najvažnije funkcije matriksa.

Matriks se sastoji od različitih vrsta biopolimera (poznatih kao vanćelijski) koji čine osnovicu za formiranje trodimenzionalne arhitekture biofilma (Wingender i Flemming., 1999). Koncentracija, kohezija, naelektrisanje, apsorpcioni kapacitet i priroda pojedinih komponenti matriksa utiču na način života u zajednici (Sutherland, 2001). Takođe, na arhitekturu utiču i proteini i glikoproteini domaćina (ukoliko govorimo o biofilmovima formiranim u/na živim sistemima), koji pomažu u pričvršćavanju ćelija mikroorganizama, služeći kao izvor hranljivih materija (Karygianni i sar., 2020). Komponente matriksa mogu varirati u zavisnosti od vrste mikroorganizama, ali glavne su obično polisaharidi, proteini, eDNK, lipidi, od čega proteini i polisaharidi čine 75 – 89 % matriksa (Slika 2).



Slika 2. Prikaz komponenata matriksa bakterijskog biofilma (preuzeto i modifikovano iz Serra i Hengge, 2019)

Polisaharidi su glavne komponente matriksa i obično su to dugački, linearni ili razgranati molekuli različite molekulske mase. Ako se sastoje od ponavljajuće ugljenohidratne monomernice nazivaju se homopolisaharidi, međutim većinom su heteropolisaharidi i čini ih kombinacija neutralnih i naelektrisanih jedinica. Takođe, mogu sadržati organske ili neorganske supstituente koji dosta utiču na njihova fizička i biološka svojstva. Prisustvo uronskih kiselina kao što su D-glukuronska, D-galakturonska i manuronska kiselina i ketal vezanih piruvata daju polianjonska svojstva polisaharidima. Anjonska svojstva im omogućavaju veću snagu vezivanja u razvijenom biofilmu, što samim tim doprinosi i stabilnosti biofilma (Bhaskar i Bhosle, 2005). Dalje, postoje i polikatjonski polisaharidi, kao što je međućelijski adhezini β -1,6-vezanog N-acetilglukozamina, koji je karakterističan za sojeve *S. aureus* i *S. epidermidis*, a kasnije je otkriven i kod drugih bakterija (Flemming i Wingender, 2010). Egzopolisaharidi imaju veoma važnu ulogu u formiranju biofilma, te su mutanti koji ne mogu da ih sintetišu veoma ugroženi ili onesposobljeni da ga formiraju. S obzirom na njihovu zastupljenost u matriksu, brojne su i funkcije koje imaju u biofilmu. Prva od funkcija u nizu jeste adhezija ćelija u kojoj egzopolisaharidi doprinose u početnim koracima kolonizacije biotičkih i abiotičkih površina i samim tim učestvuju i u ćelijskoj agregaciji. Hidrofilni polisaharidi imaju visoku sposobnost zadržavanja vode, te na taj način održavaju vlažnost mikrookruženja biofilma što sprečava isušivanje i omogućava opstanak u uslovima nedostatka vode. Neutralni i naelektrisani egzopolisaharidi formiraju hidratizovanu polimernu mrežu (matriks biofilma) dajući mehaničku stabilnost biofilmu i doprinoseći arhitekturi biofilma. Mogu posredovati u apsorpciji organskih i neorganskih jedinjenja iz okoline tako da služe i kao izvor jedinjenja sa ugljenikom, fosforom i azotom što obezbeđuje nutrijente zajednici, a takođe mogu služiti i kao rezervni izvor energije u zajednici. Ono što je veoma značajno jeste da egzopolisaharidi obezbeđuju otpornost na odbrambene mehanizme domaćina tokom infekcija, kao i na antimikrobne agense (Nwodo i sar., 2012).

U matriksu se može naći i velika količina proteina, a često mogu i nadmašiti sadržaj egzopolisaharida. Proteinske komponente matriksa čine adhezini ćelijske površine, proteinske podjedinice flagela i pila, izlučeni ekstraćelijski proteini i proteini vezikula spoljašnje membrane. Proteini ćelijske površine, pili i flagele, učestvuju u inicijalnom pričvršćivanju za površinu, a kod nekih mikroorganizama su uključeni u migraciju duž površina što olakšava kolonizaciju. Kao i polisaharidi, proteini matriksa doprinose stabilnosti biofilma, jer pojedine studije ukazuju da odsustvo proteina smanjuje sposobnost formiranja biofilma, a utiče i na njegovu stabilnost (Fong i Yildiz, 2015). Deo matriksnih proteina su enzimi čiji su supstrati ostale komponente matriksa, kao što je disperzin glikozid hidrolaza B, sposobna da hidrolizuje polisaharide, zatim proteaze koje ciljaju proteine, ili DNaze koje razgrađuju nukleinske kiseline čime se doprinosi reorganizaciji matriksa ali i disperziji (Kaplan i sar., 2003; Mann i sar., 2009).

Dalje, pojedini biofilmovi sadrže i velike količine eDNK koja je u početku viđena kao ostatak liziranih ćelija, a danas se zna da je važan sastavni deo matriksa, gotovo univerzalni (Molin i Tolker-Nielsen, 2003). Kod kliničkih infekcija, nije samo sastavni deo matriksa već često i njegova dominantna komponenta. Ovaj polianjonski molekul igra važnu ulogu u ranom prijanjanju ćelija za površinu omogućavajući dalju kolonizaciju i ćelijsku agregaciju i doprinoseći strukturi i arhitekturi bakterijskog biofilma. Izuzetno je svestran molekul, te predstavlja mnogo više od strukturne komponente matriksa (Campoccia i sar., 2021). Otkriveno je da eDNK učestvuje u horizontalnom transferu gena, vezuje katjone uključujući i magnezijum iz spoljašnje sredine, uspešno neutrališe katjonske efekte urođenog imuniteta, aktivno doprinosi toleranciji biofilma ograničavajući difuziju antimikrobnih agenasa, zakišeljava okolnu sredinu i time doprinosi dodatnoj rezistenciji, stupa u interakciju sa ćelijama imunskog sistema domaćina, usmerava širenje biofilma i izvor je dodatnih hranljivih materija tokom gladovanja (Hemmi i Akira., 2002; Finkel i Kolter, 2001; Molin i Tolker-Nielsen, 2003; Gloag i sar., 2013; Jones i sar., 2013). Jasno je da eDNK pored brojnih funkcija, igra i ključnu ulogu u razvoju različitih fizičko-hemijskih interakcija ne samo sa komponentama matriksa već i sa biotičkim i abiotičkim površinama. Zahvaljujući visokom stepenu složenosti, danas je i dalje nejasan mehanizam oslobađanja i regulacije eDNK.

1.1.1.2. Ćelije perzisteri u biofilmu

Sposobnost bakterija da prežive veoma visoke koncentracije antibiotika postaje sve veća briga zdravstva. Bakterijske ćelije, rezistentne na izuzetno visoke koncentracije antibiotika, jesu ćelije perzisteri koje se javljaju kao odgovor na nepovoljne uslove sredine. To su subpopulacije dormantnih ćelija čija tolerantnost nije uzrokovana genetičkim promenama već se uočava na nivou fenotipa, a prvi put su opisane kod *Staphylococcus* spp. (Bigger, 1944), a kasnije i kod ostalih bakterija. Iako su ovako rano uočene, ovim ćelijama se do skoro nije pridavao klinički značaj, do momenta kada je Kim Lewis prvi predložio moguću ulogu perzistera u toleranciji na antibiotike u biofilmu (Lewis, 2001).

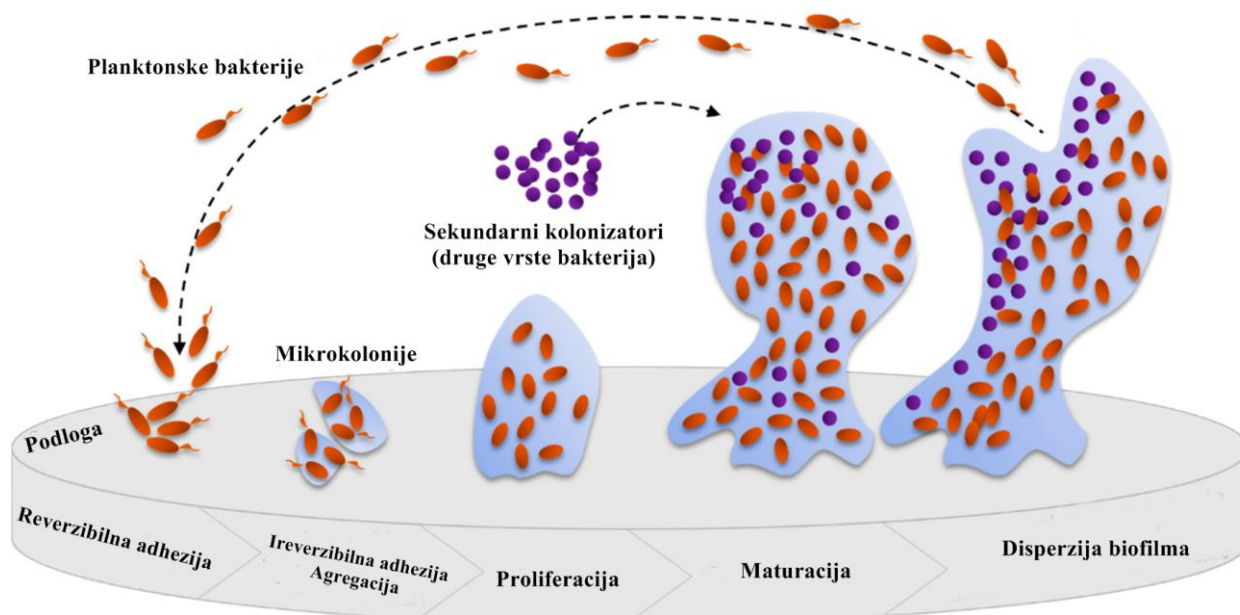
Perzisteri pokazuju privremene fenotipove otporne na antibiotike i stoga se razlikuju od uobičajene, trajne rezistencije na lekove uzrokovane genskim mutacijama ili horizontalnim transferom gena (Miyae i sar., 2018). Generalno, smatralo se da je nakon uspešnog lečenja antibiotikom, imunuski sistem domaćina sposoban da se izbori sa preostalom frakcijom ćelija otpornom na antibiotik. Međutim, perzisterske ćelije su sposobne da se odupru delovanju imunskog sistema i dovedu do ozbiljnih hroničnih infekcija (Defraigne i sar., 2018).

Broj ćelija perzistera zavisi od faze rasta, a najčešće se sreću u stacionarnoj fazi i u biofilmovima. Komparacijom aktivnih genskih profila ćelija perzistera i ćelija u ekspanzionalnoj fazi rasta primećena je znatno niža produkcija proteina, koja je bila u korelaciji sa smanjenom proizvodnjom energije, što ukazuje na stanje mirovanja ovih ćelija (Wainwright i sar., 2021). Tokom godina, dosta su istraživani modeli, odnosno mehanizmi putem kojih dolazi do formiranja ćelija perzistera u biofilmu. Često se govori o tome da ove ćelije ne nastaju samo kao odgovor na visoke doze antibiotika već i kao odgovor na nedostatak hranljivih materija unutar biofilma, ali i visokog pH i oštećenja molekula DNK (Defraigne i sar., 2018), odnosno u uslovima delovanja različitih stresora. Gledano u smislu genetičke osnove, glavni model za formiranje perzistera jesu toksin-antitoksin (TA) parovi koji izazivaju stanje mirovanja i time doprinose toleranciji na antibiotike (Lewis, 2008). Ovi sistemi se obično sastoje od stabilnog toksina, koji je uvek protein iremeti neki od esencijalnih procesa u ćeliji i labilnog antitoksina (protein ili RNK) koji sprečava toksičnost (Van Melderen i Saavedra De Bast, 2009). Toksini su često inhibitori translacije, odnosno smanjuju sintezu proteina, te se iz tog razloga dovode u vezu sa nastankom ćelija perzistera i njihovim stanjem mirovanja (Goormaghtigh i sar., 2018). Drugi model koji se predlaže za nastanak ćelija perzistera jeste smanjen nivo energije, odnosno ATP-a, obzirom da je on važan u ekspanzionalnom rastu bakterija i metaboličkoj aktivnosti koja je često ciljno mesto pojedinih antibiotika (Wainwright i sar., 2021).

Bez obzira na mehanizme koji omogućavaju ulazak u stanje dormancije i formiranja perzistera, ove ćelije se na kraju vraćaju u funkcionalno stanje pri čemu mogu nastaviti da se razvijaju i šire infekciju. Po potrebi, mogu se ponovo vratiti u dormantno stanje, a tačan način na koji dolazi do uporne reanimacije ovih ćelija nije dovoljno istražen (Svenningsen i sar., 2019). Pretpostavlja se da ulogu u ovom procesu ponovo mogu imati TA sistemi. Ako se razgradnja antitoksina smanji kada se smanji i delovanje stresa, onda odnos toksin:antitoksin može da se vrati na nivo koji vrši represiju operona. Sa druge strane, postoji mogućnost da faktori iz sredine, kao što je prisustvo glukoze, smanjenje stresa i promene u ćelijama domaćina, mogu uticati na ovaj proces (Fisher i sar., 2017).

1.1.2. Formiranje biofilmova

Biofilmovi se mogu razviti na različitim površinama poput akvatičnih, zemljišnjih, u/na tkivima živih organizama i na površini medicinskih i industrijskih uređaja. Sposobnost bakterija da formiraju biofilm zavisi od nekoliko faktora kao što su površina za koju se vezuju ćelije, prisustvo drugih bakterija, dostupnost nutrijenata, pH vrednost i temperatura (Van Houdt i Michiels, 2010). Proces formiranja biofilma je složen i sastoji se od nekoliko faza (Slika 3) i to su: adhezija, agregacija, formiranje mikrokolonija, maturacija tj. formiranje zrelog biofilma i disperzija biofilma (Satpathy i sar., 2016).



Slika 3. Proces formiranja bakterijskih biofilmova. (Pinto i sar., 2020)

Pre samih ćelija, prvo što će doći u kontakt sa površinom jesu pojedine organske materije koje će formirati sloj na podlozi (Costerton i sar., 1995). Smatra se da ovakav sloj neutrališe prekomerno naelektrisanje površine i višak energije koji mogu sprečiti približavanje ćelija i samim tim inicijalnu adheziju. Materijal na kom će se razviti biofilm naziva se supstrat i može biti, kao što je već napomenuto, različite prirode. Bakterije se približavaju supstratu bilo nasumično ili vođene hemotaksijom i uvlače se unutar graničnog sloja. Neke od ovih ćelija će se ubrzo odvojiti, a ovakav fenomen je nazvan reverzibilna adsorpcija. Proces adhezije zavisi od neto zbira privlačnih i odbojnih sila između dve površine. U početku su bakterije vezane uz površinu slabim Van der

Waals-ovim silama, pre nego što dođe do jače vezanosti kombinacijom fizičkih i hemijskih sila (Liu i Tay, 2001). Onog momenta kada sile privlačenja budu veće od sila odbijanja tada možemo reći da se radi o ireverzibilnoj adheziji. Faktori koji utiču na vezivanje ćelija za površinu jesu hrapavost površine, hidrofobnost, prisustvo flagela i fimbrija kao i stepen produkcije matriksa (Donlan 2002; Vu i sar., 2009).

Nakon vezivanja sledi proces agregacije i akumulacije koji je potpomognut produkcijom ekstracelularnog matriksa. Dakle, bakterijska adhezija praćena je formiranjem matriksa koji ubrzo počinje da apsorbuje hranljive materije, enzime, faktore rasta, minerale, organske materije, što će omogućiti pionirskim ćelijama da krenu sa razmnožavanjem (Smirnova i sar., 2010). U ovom momentu pokreće se i međubakterijska komunikacija. Dalji rast biofilma praćen je i adhezijom novih planktonskih ćelija i kontinuiranom deobom primarnih kolonizatora, kao i sve većom produkcijom matriksa. Kako biofilmovi mogu biti sačinjeni od različitih vrsta, može doći i do vezivanja sekundarnih kolonizatora. Ove ćelije metabolišu otpad primarnih kolonizatora, ali i proizvode sopstveni koje mogu koristiti druge ćelije. Kako će se i kojom brzinom razvijati biofilm dalje zavisi od raspoloživosti hranljivih materija i eliminacije produkata metabolizma, kao i izvora ugljenika, difuzije kiseonika, pH vrednosti (Milanov i sar., 2008). Maturacijom biofilma menjaju se i uslovi mikrookoline što dovodi do heterogenosti u biofilmu. Zrelim biofilmom smatra se biofilm sastavljen od ćelija, matriksa i vodenih kanala koji će omogućiti razmenu hranljivih materija i eliminaciju otpadnih produkata.

Kako biofilm nastavlja da raste, deblja i širi se, dolazi do disperzije biofilma i izlaska pojedinih ćelija koje potom mogu formirati novi biofilm. Ujedno, disperzija je i poslednja faza u formiranju biofilmova. Disperzija biofilma nastaje usled nedostatka hranljivih materija, nagomilavanja toksičnih materija i stresa (Kostakioti i sar., 2013). U zavisnosti od pokretača, ističu se dva tipa disperzije: aktivna i pasivna. Aktivna disperzija pokrenuta je od strane samih bakterija i kao rezultat bakterije se oslobodaju u životnu sredinu. Jedan od mehanizama aktivne disperzije jeste aktivna razgradnja c-di-GMP. Aktivacija fosfodiesteraze smanjuje količinu c-di-GMP, što dalje rezultira proizvodnjom enzima koji razgrađuju ekstracelularni matriks i dovode do raspršivanja (Wille i Coenye, 2020). Sa druge strane, do pasivne disperzije dovode spoljašnji faktori poput sila trenja, abrazija, ljudskog faktora ili predatorstva nad bakterijama biofilma (Kaplan, 2010). Disperzija biofilma se uopšteno može odvijati na nekoliko načina: erozijom (kontinuirano odvajanje ćelija ili fragmenata biofilma), abrazijom (sudari čestica iz okolne tečnosti biofilma dovode do njegovog raskidanja), otkidanjem (otkidanje većih komada biofilma) i rasejavanjem (otpuštanje velikog broja pojedinačnih ćelija) (Hall-Stoodley i sar., 2004; Kaplan, 2010; Sheffield i Crippen, 2012). Disperzija je od ključnog značaja jer omogućava da se na novim površinama formiraju novi biofilmovi.

1.2. Bakterijska rezistencija

Termin „antibiotik” prvi put je upotrebio mikrobiolog Selman Waksman kako bi imenovao jedinjenja koja proizvode mikroorganizmi, a koja imaju inhibitorni efekat na rast drugih mikroorganizama. Iako su antibiotici uvedeni u kliničku praksu tek prošlog veka, podaci o upotrebi mikroorganizama za kontrolu mikrobioloških infekcija datiraju još iz drevnog Egipta, Grčke i Kine. Međutim, moderna era antibiotika počinje sa otkrićem penicilina iz kulture gljive *Penicillium notatum*, od strane Aleksandra Fleminga 1928. godine (Sengupta i sar., 2013). Za ozbiljne infekcije, antibiotici su prvi put upotrebljeni 1940. godine, a penicilin je u početku korišćen samo za lečenje vojnika u Drugom svetskom ratu (Medina i Pieper, 2016; Penchovsky i Traykovska, 2015). Osim što su sprečili smrt mnogih pacijenata, antibiotici su napravili veliki pomak u medicini i hirurgiji uspešno tretirajući infekcije pacijenata na hemioterapijama i nakon teških hirurških intervencija, kao i pacijenata sa teškim hroničnim bolestima (Ventola, 2015).

Ipak, samo deset godina nakon početka upotrebe penicilina u medicinskoj praksi, počinje da se javlja bakterijska rezistencija na penicilin. Danas postoji veliki problem bakterijske rezistencije s obzirom da je većina bakterija rezistentna ne samo na penicilin već i na njegove derivate i ostale

grupe antibiotika koji su u upotrebi (Medina i Pieper, 2016). Kako su antibiotici vremenom postajali sve dostupniji tako je rasla i njihova upotreba, što je vodilo ka širenju rezistencije. Otpornost bakterija na antibiotike je veliki problem u zdravstvu, jer ometa efikasnost njihove upotrebe i produžava vreme lečenja pojedinih infekcija (Abushaheen i sar., 2020). Dodatni problem predstavljaju bakterije koje su rezistentne ne samo na jedan antibiotik već na više njih i to su takozvane multirezistentne bakterije (Ventola, 2015).

Bakterijska rezistencija se definiše kao sposobnost bakterija da se odupru inhibitornom delovanju antibakterijskih agenasa i prežive njegovo delovanje. Nekoliko je vrsta antimikrobnih agenasa, među kojima su antibiotici, dezinfekciona sredstva i konzervansi u hrani, koji se koriste da bi inhibirali rast i razmnožavanje bakterija, ali i doveli do ubijanja istih. Mogu biti prirodni, polusintetički i sintetički agensi sa karakterističnim mehanizmima delovanja, koji dovode do promena na metaboličkom i fiziološkom nivou kao što su: modifikacije u sintezi ćelijskog zida, inhibicija sinteze proteina i metaboličkih puteva, ometanje replikacije i transkripcije DNK, promene nivoa biosinteze lipida i funkcionalnosti citoplazmatične membrane (Tenover, 2006). Iako se ovo smatra i prirodnim procesom, nedovoljno znanje o rezistenciji udruženo sa neadekvatim i prekomernim prepisivanjem antibiotika od strane lekara, zloupotrebom, neadekvatnim korišćenjem od strane pacijenata, ali i pogrešnim dijagnozama, podiže bakterijsku rezistenciju, čija stopa konstantno raste i dostiže nivo ozbiljnog problema i izazova za zdravstvo na globalnom nivou. Nastavak ovakvog scenarija može dovesti i do „postantibiotske ere” u kojoj i najmanje povrede i uobičajene infekcije mogu imati fatalne ishode (Morgan i sar., 2011; Alam i sar., 2019).

U prilog ozbiljnosti ide i podatak da je Svetska zdravstvena organizacija (SZO; engl. World Health Organization, WHO) po prvi put od svog postojanja, dala listu prioriternih patogenih za koje je neophodno pronalaženje novih antibiotika, odnosno antimikrobnih jedinjenja (Ismail i sar., 2021). Ova lista podeljena je na tri kategorije prema hitnosti: kritični, visoki i srednji prioritet. Kritičnu grupu čine bakterije koje u bolnicama dovode od ozbiljnih infekcija kod pacijenata sa ozbiljnim plućnim i krvnim infekcijama i uključuje *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i bakterije iz familije Enterobacteriaceae. U preostale dve grupe svrstane su bakterije izazivači uobičajenih infekcija. Kategoriji visokog prioriteta pripadaju: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella* spp., nekoliko vrsta roda *Campylobacter*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Helicobacter pylori*. Tri vrste se smatraju srednjim prioritetom i to su *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i nekoliko vrsta roda *Shigella*. Standardi za podelu u kategorije zasnovani su prema hitnosti potrebe za novim antibioticima, prirodni infekcija, dostupnosti opcija lečenja i obimu pretnji po ljudsko zdravlje.

1.2.1. Mehanizmi rezistencije na antimikrobne agense

Bakterijska rezistencija je kod pojedinih mikroorganizama urođena sposobnost, dok je kod većine stečena i nastajekada bakterije razviju mehanizme kojima bi se zaštitile od delovanja antimikrobnih agenasa. Rezistencija se može razviti preko horizontalnog transfera gena putem konjugacije, transdukcije ili transformacije, ili putem vertikalnog transfera prenošenjem kroz generacije (Stachelek i sar., 2021). Skup gena koji omogućava rezistenciju može se preneti kao genska kasetna lokalizovana na mobilnim genetičkim elementima ili otpornost može nastati kao proizvod spontanijih mutacija (Martinez i sar., 2007). Izlaganje mikroorganizama antibioticima duži vremenski period, prekomerna ili neadekvatna, pa čak i niska doza antibiotika favorizuju opstanak otpornijih sojeva (von Wintersdorff et al., 2016).

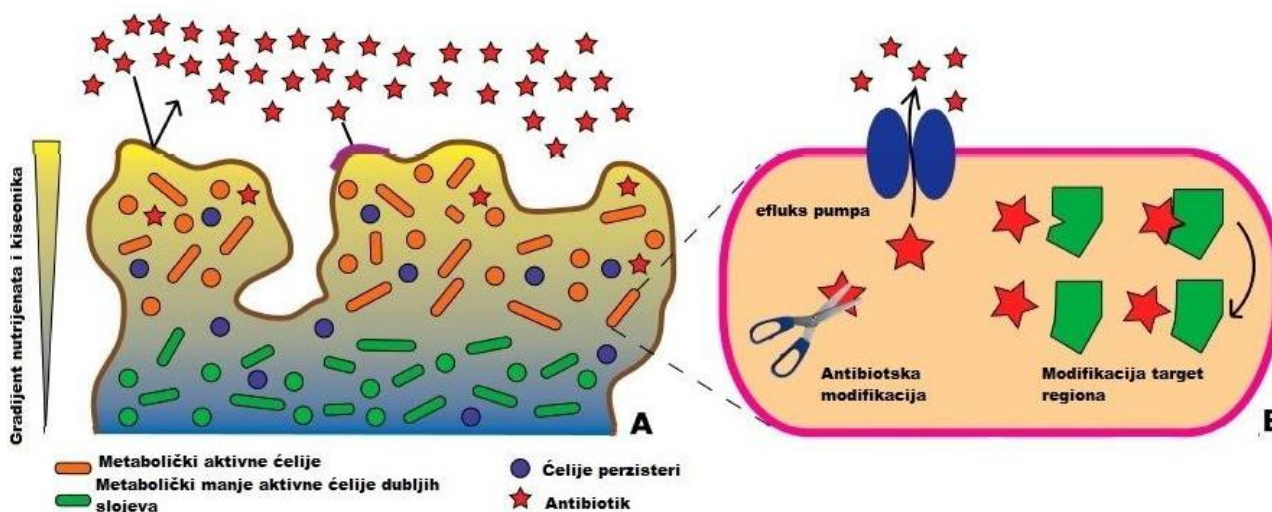
Danas je poznato da bakterije mogu živeti u planktonskoj životnoj formi, kao pojedinačni organizmi, ali i u zajednici, u formi biofilmova (O'Toole et al., 2000). Stoga se mehanizmi rezistencije na antibiotike razlikuju na ćelijskom nivou i na nivou zajednice (Slika 4), a kako bakterije lako prelaze iz jedne životne forme u drugu, tako i ovi mehanizmi često deluju sinergistički (Penesyan i sar., 2015).

1.2.1.1. Mehanizmi rezistencije u planktonskoj životnoj formi

Tradicionalno razumevanje bakterijske rezistencije odnosi se upravo na rezistenciju na ćelijskom nivou. Osnovni mehanizmi rezistencije na ćelijskom nivou su: enzimska inaktivacija antibiotika hidrolizom (npr. β -laktamaza inaktivira β -laktamske antibiotike) ili modifikacijom (npr. antibiotika iz grupe aminoglikozida), izmena ciljnog regiona za koji se vezuje antibiotik što ih čini neprepoznatljivim (npr. fluorohinoloni), korišćenje barijera za prodiranje antibiotika (npr. spoljašnja membrana Gram negativnih bakterija) i aktivni efluks antibiotika putem efluks pumpi na membrani. Poslednjih godina, istraživanja su fokusirana na kliničke aspekte rezistencije, dok bi razumevanje originalnih funkcija gena za rezistenciju možda omogućilo razvoj uspešnih strategija u borbi sa rezistencijom (Penesyan i sar., 2015).

1.2.1.2. Mehanizmi rezistencije u zajednici

Bakterijske zajednice mogu pokazati toleranciju na stresne uslove iz okoline koju inače pojedinačne ćelije ne bi mogle. Ovakav vid zaštite podiže nivo rezistencije, te su bakterije u zajednici otpornije na delovanje antimikrobnih agenasa čak i do 1000 puta (Yan i sar., 2017). Prva stvar koja omogućava rezistenciju biofilma jeste prisustvo ekstracelularnog matriksa, barijere koja onemogućava ulazak antimikrobnih jedinjenja, ali je i sposoban da ih akumulira do 25% svoje težine. Takođe, u njemu se nalaze i brojni egzoenzimi koji omogućavaju razgradnju metabolita ovih agenasa i samim tim slabljenje njihovog delovanja (Arciola i sar., 2012). Osim toga, u biofilmu se nalaze i različiti enzimi koji mogu transformisati antimikrobne agense u netoksične forme i na taj način obezbediti otpornost. Dalje, važan faktor jeste i metabolička heterogenost koja se javlja usled različite dostupnosti hranljivih materija ali i kiseonika. Antimikrobni agensi prvenstveno ubijaju metabolički aktivne ćelije dok dormantne forme ostaju otporne. Primer ovoj situaciji jesu i ćelije perzisteri u biofilmu, koje predstavljaju populacije dormantnih ćelija odgovornih za teške hronične bolesti, čije je otkrivanje veliki izazov. Ove ćelije uspevaju da podnesu smrtonosne doze antibiotika, a po prestanku njihovog delovanja one se ponovo aktiviraju i započinju rast i razmnožavanje u biofilmu (Stewart, 2003; Singh i sar., 2017). Nezaobilazan deo jesu i genetske adaptacije neophodne za smanjenje osetljivosti i promenu fenotipa u odgovoru na stres. Reakcije na stres u biofilmu karakterišu brojne promene u morfologiji i fiziologiji bakterija što doprinosi većoj rezistenciji. Na kraju, velikoj otpornosti doprinosi i veliki broj efluks pumpi kao i njihov prekomeran rad (Whitchurch i sar., 2002; Singh i sar., 2017).



Slika 4. Mehanizmi rezistencije na nivou zajednice (A) i na nivou pojedinačnih ćelija (B). (Penesyan i sar., 2015).

1.3. *Staphylococcus aureus*

S. aureus je gram pozitivni, fakultativno anaerobni oportunistički patogen koji pripada rodu *Staphylococcus*, Firmicutes. Prvi put ga je opisao hirurg Alexander Ogston 1880. godine, u Škotskoj, koji ga je primetio u inficiranim ranama pacijenata. Iste godine, Louis Pasteur je ukazao na prisustvo apcesa kod životinja kojima je ubrizgan gnoj iz humanih stafilokoknih infekcija (Parastan i sar., 2020). Dve godine kasnije, Rozenbah izoluje ove bakterije i naziva ih *S. aureus*, imenom koje vodi poreklo od grčkih reči *staphyle* (grozd) i *kokkos* (bobice).

Bakterija je veličine oko 0,8 μm u prečniku i pod mikroskopom se može uočiti da formira grozdove. Optimalna temperatura za rast je 37 °C, na pH 7,4 (Edwards and Massey, 2011; Gardete and Tomasz, 2014). Obično raste na svim hranljivim podlogama u vidu okruglih, sjajnih kolonija koje su dijametra 1 – 2 mm, a na pločama sa krvnim agrom može se uočiti i providan prsten oko kolonija obzirom da većina njih poseduje hemolitičku aktivnost (Sato i sar., 2019). *S. aureus* ne formira spore ni flagele, ali zato može imati kapsule i produkuje zlatno-žuti pigment (Tayeb-Fligelman i sar., 2017).

S. aureus naseljava različite ekološke niše, ali primarno su to koža i sluzokoža ljudi, a takođe kolonizuje i nozdrve, ždrelo, perineum. Približno 30 % ljudske populacije je kolonizovano ovim patogenom (Raafat i sar., 2019). Kako je veoma prilagodljiv patogen, može izazvati invazivne infekcije u zajednici, ali i medicinskim ustanovama i ima širok spektar kliničkih sindroma. Infekcije ovim sojem se kreću od izuzetno blagih i akutnih do hroničnih koje mogu biti opasne po život (Troeman i sar., 2018). Izazivač je blagih infekcija kože i mekih tkiva, ali dovodi i do endokarditisa, osteomijelitisa, pneumonija, kao i hroničnih infekcija hirurških rana i krvnih infekcija. Često se dovodi i u vezu sa infekcijama izazvanim kolonizovanjem medicinskih uređaja i implanata. Kao posledica stafilokoknih infekcija dolazi do sepse, ali i neretko do ozbiljnih i upornih bolničkih infekcija (Tong i sar., 2015; Guo i sar., 2020).

Ovaj patogen, osim što je prilagodljiv, veoma lako evoluirao i razvija rezistenciju na veliki broj antibiotika. Kod njega je razvoj rezistencije posledica horizontalnog transfera gena, koji omogućava pojavu novih varijanti sojeva rezistentnih na antibiotike bez potrebe za mutacijama. Ova pojava se često sreće u bolnicama gde je selektivni pritisak veliki. Rezistencija kod *S. aureus* je prvi put primećena 1940. godine, kada su se pojavili sojevi rezistentni na penicilin (PRSA). Ovi sojevi su produkovali laktamaze sposobne da hidrolizuju β -laktamski prsten penicilina i na taj način učine lek neaktivnim (Chambers i Deleo, 2009). Već nakon nekoliko godina PRSA sojevi postaju veoma učestali, te kako bi se prevazišao problem, u terapiju se uvodi meticilin 1959. godine. Samo dve godine nakon njegovog uvođenja dolazi do pojave meticilin rezistentnih sojeva *S. aureus* (MRSA), a mehanizam koji se pojavio jeste modifikacija ciljnog mesta (Stapleton i Taylor, 2002). Nastanak MRSA sojeva je rezultat takozvanih mec hromozomskih stafilokoknih genskih kaseti (SCCmec), koje su locirane na hromozomu i sadrže *mecA* gen odgovoran za rezistenciju na β -laktamske antibiotike. Pored ovog gena, pomenuta genska kaseti sadrži i brojne druge gene kao i mobilne genetičke elemente (Okwu i sar., 2019). Danas, MRSA sojevi predstavljaju globalan problem, posebno u bolnicama, ispoljavajući rezistenciju na peniciline, cefalosporine, karbapeneme sa tendencijom rezistencije na hinolone, aminoglikozide i makrolide (Craft i sar., 2019; Okwu i sar., 2019).

Dva faktora čine *S. aureus* veoma patogenim; prvi je njegova prednost kao komensalnog patogena koji naseljava 30 – 50% populacije te može izazvati infekcije čim mu se ukaže prilika, a drugi je sposobnost produkcije velikog broja faktora virulencije pod selektivnim pritiskom (Mulcahy i McLoughlin, 2016). Faktori virulencije se kod *S. aureus* mogu podeliti na dve velike grupe i to su faktori povezani sa adhezijom i faktori koji se izlučuju (egzotoksini). Pregled faktora virulencije i njihovih uloga dat je u Tabeli 1.

Tabela 1. Prikaz brojnih faktora virulencije i njihovih funkcija kod *S. aureus* (Costa i sar., 2013).

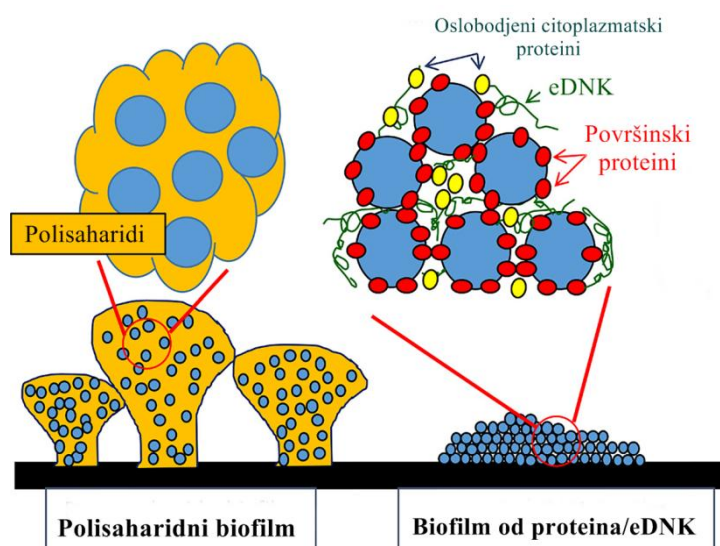
Faktor virulencije	Pretpostavljena funkcija
Faktori u vezi sa adhezijom	
<i>Komponente mikrobne površine koje prepoznaju adhezivne molekule matriksa (The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, MSCRAMM)</i>	
Stafilokokni protein A (spA)	Ometanje fagocitoze vezivanjem za IgG
Fibronektin vezujući proteini (FnbpA i FnbpB)	Vezivanje za fibronektin i ugruške plazme
Kolagen vezujući protein	Adhezija za kolagena tkiva i hrskavicu
Proteini faktora zgrušavanja (ClfA i ClfB)	Posredovanje u zgrušavanju i vezivanje za fibrinogen
<i>Kapsularni polisaharidi</i>	Smanje fagocitoze neutrofila, pojačavanje kolonizacije
<i>Stafiloksantin</i>	Rezistencija na reaktivne kiseonične vrste (ROS)
Izlučeni faktori	
<i>Superantigeni</i>	
Enterotoksini (SEA, B, C, D, E, D i K)	Masivna aktivacija T ćelija i antitela
Sindrom toksičnog šoka toksin 1 (TSST-1)	
<i>Citolitički toksini</i>	
<i>Citolizini</i>	
α -hemolizini	Indukcija lize širokog spektra ćelija, posebno monocita i trombocita
β -hemolizini	Hidroliza sfingomijelina plazmatske membrane monocita, eritrocita, limfocita i neutrofila
γ -hemolizini	Indukcija lize eritrocita i limfocita
<i>Familija leukocidina</i>	
Leukocidini E/D i M/F-PV	Indukcija lize leukocita
Panton-Valentine leukocidin (PVL)	
<i>Razni egzoenzimi</i>	
Lipaze	Inaktivacija masnih kiselina
Nukleaze	Inaktivacija nukleinskih kiselina
Proteaze	
Serin	Inaktivacija neutrofila, aktivacija T ćelija
Cistein	Blokiranje aktivacije neutrofila i hemotaksija
Aureolizin	Inaktivacija antimikrobnih peptide
Hijaluronidaze	Razgradnja hijaluronske kiseline
Stafilokinaza	Aktivacija plazminogena
<i>Ostali proteinski faktori virulencije</i>	
Stafilokokni inhibitor komplemenata (SCIN)	Inhibicija aktivacije komplemenata
Ekstracelularni fibrinogen vezujući protein	Inhibicija hemotaksije i aktivacija neutrofila
Protein koji inhibira hemotaksiju <i>S. aureus</i>	
Inhibitorni protein receptora sličanog formil peptidu 1	Inhibicija hemotaksije neutrofila
Ekstracelularni adhezivni protein	Inhibicija migracije neutrofila

1.3.1. Biofilm *S. aureus*

S. aureus može formirati izuzetno robusne biofilmove na biotičkim i abiotičkim površinama i to je još jedan važan faktor njegove virulencije. Dok se kolonizacija nosa i kože kod ljudi ovim patogenom dešava bez ikakvih simptoma, prelazak sa pojedinačnih slobodnoživućih ćelija na formiranje višćelijskog biofilma je ključan korak u razvoju infekcije. Oko 30 – 40 % bolničkih

infekcija, izazvano je upravo biofilmovima *S. aureus*, s obzirom da implantati, protetika, kateteri i neki drugi medicinski uređaji predstavljaju pogodne površine za razvoj biofilma (Suresh i sar., 2019).

Razumevanju stafilokoknih biofilmova dosta su doprinele razne biohemijske metode kao i tehnike snimanja biofilmova. Trodimenzionalne analize strukture biofilma pokazale su visok stepen složenosti i organizacije. Studije su pokazale i da matriks biofilmova *S. aureus* može da varira u zavisnosti od dostupnosti hranljivih materija, okruženja domaćina ali i mehaničkih sila. Međutim, kao i kod ostalih biofilmova, njihov matriks se sastoji u najvećoj meri od vode (oko 97%) i organske materije koja uključuje EPS i mikrokolonije (Nazir i sar., 2019). Ekstracelularni matriks predstavlja kompleks organskih materija koji se sastoji pretežno od polisaharida, proteina i eDNK (Slika 5). Za stafilokokne biofilme je karakterističan polisaharidni intercelularni adheziv (PIA) koji se sastoji od β -1,6-vezanih ostataka N-acetilglukozamina (80–85 %) i ne-N-acetilovanih ostataka D-glukozamina koji su anjonska frakcija i sadrže fosfate i estarski-vezane sukcinat (15 – 20 %) (Mack i sar., 1996). U matriksu su prisutne pozitivno i negativno naelektrisane i hidrofobne grupe različitih komponenti. Negativno naelektrisane komponente su karboksilne grupe, fosfati, sulfati, glutaminska i asparaginska kiselina, dok su pozitivno naelektrisane komponente aminošećeri. Ipak, ukupno naelektrisanje samog matriksa je negativno (Idrees i sar., 2021).



Slika 5. Različiti biofilmovi kod sojeva *S. aureus* (Zapotoczna i sar., 2016)

1.3.1.1. Formiranje biofilma kod *S. aureus*

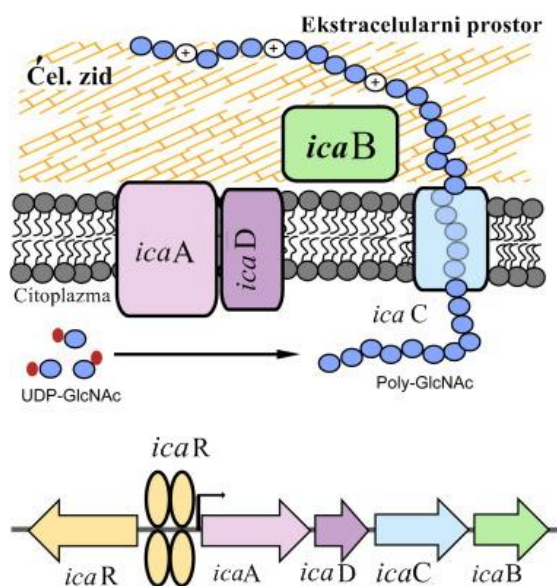
Formiranje biofilma *S. aureus* je veoma kompleksan proces koji počinje vezivanjem planktonskih ćelija za površinu, uz korišćenje niza faktora i mehanizama uključujući površinske adhezine, tejhajnu kiselinu, lipotejhajnu kiselinu, autolizine, promene hidrofobnosti površine bakterijske ćelije i proizvodnju eDNK (Schilcher i Horswill, 2020). Utvrđeno je da površina ćelije *S. aureus* prijanja na hidrofobne površine uz pomoć slabih veza makromolekula, dok prijanjanje na hidrofилne površine uključuje manje ali jače vezivanje makromolekula (Maikranz i sar., 2020). Kod *S. aureus* su izražene komponente mikrobne površine koje prepoznaju adhezivne molekule matriksa (MSCRAMM) i omogućavaju vezivanje za proteine humanog matriksa kao što su fibrinogen i fibronektin (Kırmusaoğlu, 2016). Nakon adhezije, dolazi do produkcije egzopolisaharida kao što je PIA, eDNK i proteina, što je praćeno formiranjem zrelog biofilma. Proteini na površini ćelijskog zida bakterije obezbeđuju prijanjanje, međućelijsku adheziju, akumulaciju biofilma i sazrevanje. Agregacija omogućena produkcijom PIA formira ćelijske klastere dok ne dođe do formiranja višeslojnog biofilma. Jednom kada se formira zrelo biofilm kreće faza disperzije biofilma koja može biti izazvana oslobađanjem različitih enzima koji razlažu matriks, međubakterijskom

komunikacijom ili spoljašnjim faktorima. Nakon toga, planktonske ćelije mogu ponovo kolonizovati površine i krenuti sa novim formiranjem biofilma (Kirmusaoğlu, 2016; Idrees i sar., 2021).

Kod *S. aureus* postoji nekoliko puteva formiranja biofilma, od kojih je najdominantniji put posredstvom produkcije PIA. Stoga se mehanizmi formiranja biofilma dele na PIA-zavisne i PIA-nezavisne puteve.

1.3.1.1.1. PIA-zavisno formiranje biofilma

Pozitivno naelektrisana PIA obezbeđuje međucelijsku adheziju putem vezivanja za negativno naelektrisane površine bakterijskih ćelija. PIA se proizvodi od UDP-N-acetilglukozamina, a sama produkcija je pod kontrolom *icaADBC* operona koji poseduje veliki broj *S. aureus* sojeva. Pokazano je da su geni i produkti *ica* lokusa neophodni za formiranje biofilma i virulenciju. Operon *icaADBC* sastoji se od gena *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* i pozitivno je regulisan stresnim uslovima poput anaerobnih, ekstremne temperature, osmolarnosti, prisustva etanola ili antibiotika i brojnim regulatornim proteinima (Cramton i sar., 2001). Pokazano je da su transmembranske glikoziltransferaze, produkti *icaA* i *icaD* gena, esencijalne za produkciju PIA. Sam IcaA ima nisku aktivnost N-acetilglukozaminil-transferaze dok se u koekspresiji sa *icaD* ta aktivnost pojačava čak i do 20 puta, što samim tim povećava i produkciju matriksa (Kot i sar., 2018). IcaC je membranski protein koji omogućava produžavanje oligomernih lanaca i njihov transport na površinu membrane odgovoran je za sukcinilaciju PIA (Atkin i sar., 2014). PIA biva delimično deacetilizovana ekstracelularnom polisaharid deacetilazom, produktom *icaB* gena i kao takva se nalazi na površini bakterijske ćelije (Vuong i sar., 2004). Čitav operon se nalazi pod regulacijom *icaR* gena, koji se nalazi uzvodno od *ica* operona i odgovoran je za sintezu IcaR represora (Conlon i sar., 2002; Slika 6).



Slika 6. Molekularni mehanizam biosinteze PIA (Nguyen i sar., 2020)

1.3.1.1.2. PIA-nezavisno formiranje biofilma

Iako je formiranje biofilma putem PIA dominantno, postoje i drugi putevi formiranja koji isključuju PIA. Kod sojeva kod kojih nema *ica* operona, PIA se ne proizvodi, ali se biofilm proizvodi, što znači da virulencija nije pogođena ovim nedostatkom. Brojni proteini takođe imaju važnu ulogu u formiranju biofilma kod *S. aureus* (Arciola i sar., 2015). Ovo nije iznenađujuće, obzirom da koristi razne površinske proteine za vezivanje za matriks domaćina. PIA-nezavisni

biofilmovi mogu biti posredovani proteinima vezanim sa akumulacijom (Aap) koji omogućavaju formiranje biofilma posredovano proteazama domaćina koje vrše proteolitičku obradu Aap (Rohde i sar., 2007). Pored toga, biofilm asociran protein (Bap) i Bap srodni proteini *S. aureus* omogućavaju formiranje biofilma kroz agregaciju ćelija, jer mogu da formiraju matrice slične amiloidnim što promoviše formiranje biofilma. Fibronektin vezujući proteini takođe mogu imati ulogu u formiranju biofilma (Cucarella i sar., 2004). Sve ove proteine karakteriše visoka molekulska masa, prisustvo na površini ćelije, uloga kao faktora virulencije. Primećeno je i da su ovakvi biofilmovi češći kod MRSA sojeva.

Još jedan tip formiranja biofilma nezavisnog od PIA jeste putem oslobađanja eDNK. Ovakav tip biofilma privlači veliko interesovanje, a primećeno je da je kod mutanta sa nedostatkom glavnog autolizina *S. aureus* odgovornog za lizu ćelija i oslobađanje eDNK, smanjena produkcija biofilma. Dodatno, zreli biofilmovi su osetljivi na delovanje Dnaze I, što ukazuje da je eDNK važna komponenta biofilma. Do sada je pokazano i da pojedini proteini i lipoproteini mogu da vezuju eDNK i time doprinose akumulaciji. Značajno je da se ćelijska liza i oslobađanje eDNK desi u ranoj fazi vezivanja kako bi se biofilm pravilno razvijao, a *S. aureus* ima razne puteve kontrole lize i oslobađanja eDNK (Schilcher i Horswill, 2020).

1.3.2. Metabolizam *S. aureus*

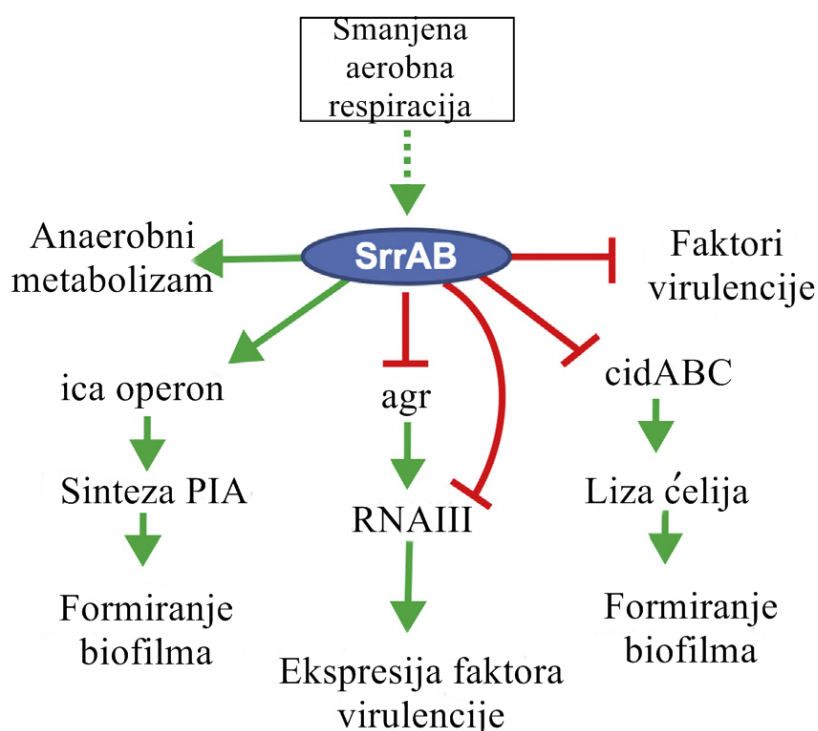
Krajnja tačka bakterijske respiracije jeste produkcija ATP-a, za koju bakterije koriste kiseonik ili druge akceptore elektrona. U zavisnosti od krajnjeg akceptora elektrona respiracija može biti aerobna respiraciju (korišćenje kiseonika) ili anaerobna (neko drugo jedinjenje). Kako je *S. aureus* fakultativni anaerob, on u aerobnim uslovima koristi kiseonik kao krajnji akceptor elektrona, a u anaerobnim uslovima nitrat. U prvom koraku respiracije dolazi do razgradnje prostih šećera do piruvata putem glikolize, a dobijeni piruvat se dalje tokom aerobne respiracije metaboliše do acetata ili acetil koenzima A (acetyl-CoA), koji dalje ulazi u ciklus trikarboksilnih kiselina, odnosno Krebsov ciklus (Somerville i Proctor, 2009). Kao krajnji produkt ovih reakcija oslobađa se velika količina NADH i FADH₂ molekula, dinukleotida čija se oksidacija može ostvariti kroz nekoliko puteva, ali se najveća količina ostvaruje preko elektron transportnog lanca na ćelijskoj membrani. Da bi se reoksidovali, ovi molekuli predaju elektrone i protone brojnim intermedijerima koji ih transportuju i na taj način formiraju protonski gradijent na membrani. Među brojnim intermedijerima važni su mali molekuli neproteinske strukture – kinoni koji dalje predaju elektrone citohromima kao terminalnim oksidazama. Kod *S. aureus* postoji samo jedan kinon, a to je menakinon i tri tipa citohroma (aa₃, bo₃ i bd). Kao što je već spomenuto, kao krajnji akceptor u slučaju anaerobne reapiacije *S. aureus* koristi nitrat, aktiviraju se geni u kompleksu nitrat reduktaze, a potom geni koji redukuju nitrat do amonijaka (Proctor, 2019).

Smanjen nivo ATP-a stimuliše odgovor na stres kod *S. aureus*, što redukuje rast i dovodi do pojave specifičnih varijanti sitnih kolonija (eng. Small colony variants, SCV) koje su defektne u respiraciji. Kod njih dolazi do pojave mnogih kompenzacionih metaboličkih puteva. Često su ove varijante ćelija odgovorne za uporne infekcije koje se veoma teško leče zbog rezistencije na brojne antibiotike. Upravo promene u metabolizmu i fenotipu *S. aureus* omogućavaju njegov opstanak u uslovima stresa (Proctor i sar., 2014).

Za *S. aureus* karakterističan je dvokomponentni stafilokokni regulator respiratornog odgovora (eng. staphylococcal respiratory response, srrAB). Ovaj sistem se sastoji od SrrA jedinice (intracelularni regulator odgovora) koja je regulisana fosforilacijom. Druga jedinica, srrB je histidin kinaza sposobna da fosforiliše SrrA, a koja predstavlja specifični senzorni protein smešten u ćelijskoj membrani. Ovakvi sistemi omogućavaju bakterijama da reaguju na spoljašnje uslove sredine čak i kada molekul stimulusa ne prodre do citoplazme. srrAB sistem je kod *S. aureus* od izuzetnog značaja, jer reguliše prelazak sa aerobne na anaerobnu respiraciju i to reagovanjem na promene u nivou kiseonika (Rudra i Boyd, 2020). On je plejotropni regulator aerobnog i anaerobnog disanja i energetskog metabolizma, sposoban i da aktivira i da potisne transkripciju

gena, a takođe je uključen i u kontrolu protoka ugljenika, fermentacije, metabolizma nukleotida i virulencije (Mashruwala i sar, 2017). Veza sa virulencijom jeste i njegova regulacija produkcije PIA preko *ica* operona (Slika 7). Sistem može da promoviše formiranje biofilma u mikroaerofilnim ili anaerobnim uslovima sredine. Osim preko *ica* operona, na formiranje biofilma može uticati i tako što direktno kontroliše transkripciju *cidABC* operona koji kontroliše ćelijsku lizu (Windham i sar., 2016). Metabolomske analize *srrAB* mutanata ukazuju da uloga ovog sistema nije ograničena samo na reakcije na niske koncentracije kiseonika, već da može da kontroliše i protok ugljenika. Pored respiratornog statusa, sistem reaguje i na nitrozativni stres. Budući da azot oksid može da inhibira funkciju hemoproteina, a terminalne oksidaze *S. aureus* su hemoproteini, ovo rezultira u smanjenoj stopi disanja (Kinkel i sar., 2013).

Dodatno, preko globalnog regulatora *quorum sensing* sistema (*agr*), *srrAB* reguliše sintezu RNK signalnog molekula, RNAIII. RNAIII je glavni efektor *quorum sensing* sistema, multifunkcionalna RNK koja kodira male peptide, a njeni nekodirajući regioni deluju kao *antisens* RNK za regulisanje translacije glavnih faktora virulencije i enzima metabolizma ćelijskog zida (Novick i Geisinger, 2008). Deluje i na sintezu glavnih površinskih proteina kao što su protein A, koagulaza i fibrinogen vezujući protein. RNAIII stabilizuje velike transkripte regulatora MgrA i na taj način utiče na ekspresiju njegovih gena. Ovo je od značaja obzirom da MgrA regulator negativno deluje na formiranje biofilma, autolizu ćelija, a pozitivno utiče na formiranje kapsula. Važna je i veza RNAIII i tipa metabolizma. Njena količina je znatno snižena pri anaerobnim uslovima i kada je smanjen transport elektrona. Nizak nivo RNAIII se dovodi u vezu i sa hroničnim infekcijama, jer zajedno sa njenim smanjenim nivoom opadaprodukcija proteaza i toksina, ali se povećava produkcija adhezina i liganda. Kako su male količine detektovane i kod SCV, jasno je da im ovo omogućava opstanak i rezistenciju tokom infekcija (Proctor, 2019).



Slika 7. Shematski prikaz *srrAB* regulisane ekspresije odabranih gena *S. aureus* i veze metabolizma i faktora virulencije (Rudra i Boyd, 2020).

1.3.3. Stafiloksantin

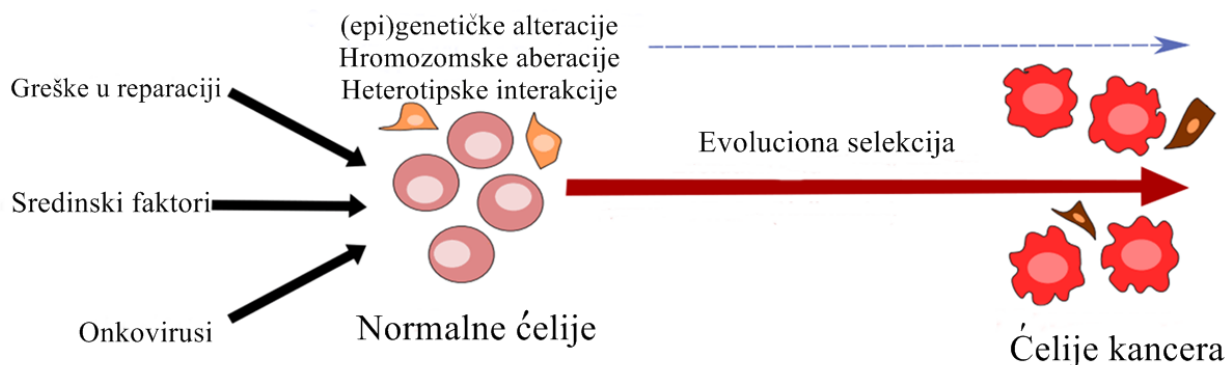
Među brojnim faktorima virulencije kod *S. aureus*, jedan se posebno izdvaja, a to je njihov prepoznatljiv zlatni pigment stafiloksantin (Liu i Nizet, 2009). Poznato je da je pigmentisano oko 90

% sojeva *S. aureus*. Stafiloksantin je karotenoidni pigment, a karotenoidi su strukturno jedinstveni prirodni proizvodi koji imaju skelet od dugog ugljenikovog lanca sa dva terminalna prstena. Najvažnija strukturna karakteristika karotenoida jeste obilna delokalizacija π -elektrona što im omogućava da apsorbuju vidljivu svetlost dajući im intenzivne boje koje variraju od žute do crvene. Pretpostavljeni put biosinteze stafiloksantina započinje direktnom kondenzacijom dva molekula farnezil difosfata da bi se formirao preskvalen difosfat, a zatim dihidroskvalen, katalizovan pomoću enzima dehidroskvalen sintaze (CrtM). Potom se dehidrogenizacijom dehidroskvalena formira sledeće jedinjenje, srednje žute boje, a to je 4,4'-diaponeurosporen. Sledeće jedinjenje koje nastaje je 4,4'-diaponeurosporenska kiselina iz koje će nastati glikozil-4,4'-diaponeurosporenoat. U poslednjem koraku, uz pomoć enzima acetiltransferaze nastaje stafiloksantin (Leejae i sar., 2013). Nivo produkcije stafiloksantina varira od soja do soja i od uslova životne sredine. Biosinteza pigmenta je pod kontrolom gena iz operona *crtOPQMN* i SigB pozitivnog regulatora ovog operona (Xue i sar., 2019). Pokazano je da protein hladnog šoka (eng. *cold-shock protein*, CspA) i regulator koji reaguje na nivo aeracije pozitivno utiču na aktivnost SigB i samim tim povećavaju pigmentaciju. Dodatno, inaktivacija ciklusa trikarboksilnih kiselina može da poveća pigmentaciju (Tiwari i sar., 2018).

MRSA sojevi koji proizvode zlatni pigment su široko rasprostranjeni po bolnicama i mogu opstati duže od onih manje pigmentisanih sojeva. Ovaj fenomen ukazuje na to da pigmentisani sojevi poseduju neke prednosti. Stafiloksantin deluje kao antioksidant, štiteći ćeliju od štetnog delovanja ROS kojim se domaćin brani od patogena. Takođe, ovaj pigment ima važnu ulogu u regulaciji mehaničkih svojstava ćelijske membrane, smanjujući njenu fluidnost i stabilizujući njene strukture. Menjajući fluidnost membrane, omogućava i zaštitu od pojedinih antimikrobnih agenasa, povećavajući toleranciju i fitnes bakterije (Mishra i sar., 2011). Blokiranje sinteze ovog pigmenta može biti potencijalni target za nova antimikrobna jedinjenja.

1.4. Kancer

Kancer je izuzetno kompleksna skupina oboljenja koje u kasnijim fazama može da se manifestuje kao sistemsko oboljenje. Normalne ćelije imaju sposobnost da se dele i diferenciraju pod strogo regulisanim ćelijskim ciklusom kako bi deoba bila kontrolisana i dabi se održala homeostaza tkiva (Fouad i Aanei, 2017). U određenim delovima genoma, dolazi do akumulacije mutacija što izaziva transformacije normalnih ćelija u ćelije kancera. Promene se dešavaju u tri glavne grupe gena i to su onkogeni i tumor supresori (regulišu stopu ćelijske deobe i ćelijske smrti) i geni odgovorni za očuvanje stabilnosti genoma (regulišu stopu mutacija u ćeliji). Kod normalnih ćelija protonkogeni pozitivno regulišu ćelijsku deobu, ali negativno proces apoptoze. Različitim mutacijama dolazi do transformacije protoonkogeno u onkogene, čime njihovi produkti bivaju previše aktivni (Vogelstein i Kinzler, 2004). S druge strane, tumor supresor geni inhibiraju ćelijski rast i indukuju apoptozu, te mutacije tih genova dovode do smanjene aktivnosti njihovih proteinskih produkata. Mutacije koje nastaju u ove dve grupe gena u ćeliji kancera daju niz adaptivnih osobina i prednosti u odnosu na okolne ćelije. Dalje, mutacije u genima odgovornim za očuvanje stabilnosti genoma dodatno povećavaju nestabilnost transformisanih ćelija, što dovodi do heterogenosti kancerskih ćelija i ova hipoteza je danas opšte prihvaćena za mehanizam nagomilavanja mutacija (Loeb, 2001). Do pojave mutacija i njihovog nagomilavanja u ovim genima, dolazi usled grešaka u procesima replikacije, reparacije, zastoja u ćelijskom ciklusu ili usled postojanja osetljivih mesta u hromozomima, kao i i sekvence DNK koje imaju visok nivo transkripcije (Aguilera i Gómez-González, 2008). Proces kancerogeneze i transformacije ćelija je dinamičan, višestepen proces koji obuhvata inicijaciju, promociju, progresiju, invaziju i pojavu metastaza. Kontinuirano delovanje određenih faktora vodi ka transformativnim promenama u (epi)genetici, broju i rearanžmanima hromozoma i heterotipskim interakcijama, koje na putu do maligniteta prolaze kroz evolucionalnu klonalnu selekciju koja omogućava sticanje novih osobina kancerskih ćelija (Slika 8).



Slika 8. Proces transformacije normalnih ćelija u ćelije kancera (Fouad i Aanei, 2017).

Ćelije kancera odlikuju se osobinama koje normalne ćelije nemaju, a autori Hanahan i Weinberg (2000) predložili njihove karakteristike: nekontrolisana, odnosno stalna proliferacija ćelija, sposobnost izbegavanja apoptoze, indukcija angiogeneze, sposobnost naseljavanja okolnih tkiva i sposobnost metastaziranja. U svojim kasnijim studijama, ovi autori su ukazali na još dve dodatne osobine – sposobnost reprogramiranja energetskog metabolizma zbog potrebe za velikom količinom energije koju proliferacija zahteva i sposobnost da izbegnu imunski odgovor (Hanahan i Weinberg, 2011). Progresija kancera narušava normalne biološke procese zdravih ćelija, a to se postiže pre svega invazijom u okolna i metastaziranjem u udaljena tkiva.

Danas je kancer vodeći uzročnik morbiditeta i smrtnosti širom sveta koji sa sobom nosi sve veći zdravstveni, ali i ekonomski teret. Starenje stanovništva u kombinaciji sa rastom populacije, kao i društvene, ekonomske i životne promene rezultuju u godišnjem porastu broja novih slučajeva. Takođe, faktori rizika koji mogu doprineti razvoju kancera jesu duvanski dim, neadekvatna ishrana i razne infekcije i inflamatorni procesi u organizmu (Wild, 2019). Za lečenje kancera, danas se primenjuju tri pristupa, a to su hirurške intervencije, zračenje i hemioterapija (Rang i sar., 2005). Ovim grupama i načinima lečenja, pridružuje se i imunoterapija, kombinovana terapija i laserska terapija (Wild, 2019). Koji pristup će biti primenjen zavisi od vrste kancera i stadijuma u kojem je dijagnostifikovan. U svojoj najjednostavnijoj definiciji terapija kancera deluje kao trokomponentni sistem: terapija (i) koja cilja određenu populaciju ćelija (ii) unutar određenog okruženja domaćina (iii). Farmakološke karakteristike terapije, zajedno sa urođenim i stečenim fizičkim i molekularnim parametrima ćelija karcinoma, kao i spoljašnji faktori životne sredine, rezultuju širokim spektrom kliničkih odgovora (Vasan i sar., 2019).

Što se tiče hemioterapeutika koji su u upotrebi, oni se mogu podeliti u nekoliko grupa i to: citotoksični lekovi (citostatici), hormoni i ostali agensi koji nisu iz ovih kategorija (Rang i sar., 2005). Citostatici su opšte korišćeni u terapiji malignih bolesti, ali postoji problem koji se ogleda u njihovom delovanju i na zdrave ćelije, što za posledicu može imati brojne neželjene efekte. U citostatike ubrajamo alkilirajuće agense i njima slična jedinjenja koja imaju sposobnost kovalentnog vezivanja za molekul DNK, sprečavajući dalje replikaciju. Veoma su reaktivna jedinjenja koja, osim što se vezuju za DNK, mogu da spreče rasplitanje lanaca neophodno za proces replikacije. Sledeća grupa citostatika jesu antimetaboliti, odnosno analozi metabolita sa specifičnom funkcijom u ćeliji (npr. analozi azotnih baza). Sposobni su da blokiraju ili ometaju metaboličke puteve koji su uključeni u sintezu DNK. Ova grupa je ujedno i jedna od najčešće primenjivanih i najuspešnijih u lečenju kancera (Lansiaux, 2011). Velika grupa citotoksičnih agenasa jesu i citotoksični antibiotici poreklom iz mikroorganizama, koji imaju različite načine delovanja. Najčešće su to interkalirajući agensi, ali i inhibitori enzima topoizomeraze I i II (Lansiaux i Pourquier, 2011). Poslednja grupa citostatika jesu inhibitori stvaranja mikrotubula i deobnog vretena, što ometa proces ćelijske deobe (Dumontet, 2011).

Iako iz navedenih pristupa lečenju kancera deluje da je izbor veliki, raznovrstan i samim tim uspešan, situacija je ipak drugačija. Osim brojnih neželjenih efekata, glavni problem je pojava rezistencije na postojeće antikancerske agense što dovodi do neuspelog lečenja.

1.4.1. Rezistencija kancerskih ćelija

Rezistencija na lekove je glavni ograničavajući faktor u lečenju kancera. Kao i u slučaju antimikrobnih terapija, entuzijazam po pitanju uspešnog lečenja kancera u početku, zamenjen je činjenicom da je kancer vrlo brzo krenuo u remisiju i razvio raznovrsne mehanizme rezistencije. Početni problem rezistencije na pojedinačne hemioterapeutike bio je rešavan kombinovanom terapijom, kao što je slučaj i kod antimikrobnih terapija. Međutim, kako je vreme odmicalo ovakva terapija, pa i svi ostali pristupi postajali su sve neuspešniji (Vasan i sar., 2019). Mnogi standardni hemioterapeutici oštećuju molekul DNK ćelija kancera, međutim veliki je problem u njihovoj nespecifičnosti i visokoj toksičnosti. Stoga, u novije vreme je razvijeno dosta ciljnih terapija, odnosno ciljnih agenasa koji precizno deluju na promene koje pokreću rast i proliferaciju isključivo kancerskih ćelija. Uspešnost lečenja ovim agensima je u početku bila velika, međutim kod pacijenata se već tokom terapije razvijala rezistencija. Jasno je da rezistencija proizilazi i iz širokog spektra faktora, poput genskih mutacija, epigenetskih promena, pojačanog rada efluks pumpi i raznih drugih (Wang i sar., 2019).

Uglavnom, kada je reč o rezistenciji ćelija kancera na hemioterapeutike, govori se o urođenoj i stečenoj rezistenciji, a zapravo mnogi tipovi kancera su rezistentni zbog preklapanja oba ova faktora. Pomenute rezistencije se razlikuju po vremenu nastanka, jer urođena postoji i pre tretmana lekovima, dok se stečena razvija tokom primene terapije. Urođena rezistencija može biti uzrokovana već postojećim genetskim mutacijama u ćelijama kancera, heterogenošću kancera u kojima postoje neosetljive populacije ćelija i aktivacijom unutrašnjih mehanizama zaodbranu od toksina iz spoljašnje sredine. Sa druge strane, stečena rezistencija je postepena i javlja se nakon otpočinjanja tretmana. Ovaj tip rezistencije može biti posledica aktivacije novog protoonkogeno koji postaje pokretač, mutacije ili izmenjenih nivoa ekspresije ciljnog mesta leka i promene u mikrookruženju kancera nakon tretmana. Ipak, za dobro razumevanje, ali i rešenje rezistencije, neophodno je i dobro poznavanje bioloških determinanti kancerski ćelija.

Kancerske ćelije su vremenom razvile brojne mehanizme rezistencije na hemioterapeutike, a među njima su: inaktivacija lekova, promene u metabolizmu lekova, rezistencija na više lekova, inhibiranje ćelijske smrti (apoptoze), promene u ciljnom mestu leka, epigenetičke promene, pojačan rad efluks pumpi, pojačana reparacija DNK molekula i amplifikacija gena odgovornih za rezistenciju (Housman i sar., 2014; Mansoori i sar., 2017). Pored ovih mehanizama važan faktor je i heterogenost kancera koja se može posmatrati na više nivoa uključujući genetički, epigenetički, transkriptomski i proteomski. Sve više se daje na značaju i mikrookruženju kancera kao značajnom faktoru u rezistenciji na lekove i razlogu za recidiv kancera i neuspelo lečenje. Kombinacije ovih faktora i mehanizama koreliraju sa lošijom prognozom u lečenju kancera.

1.4.2. Ćelijski ciklus

Ćelijski ciklus predstavlja kompleksan niz procesa koji za krajnji cilj ima dupliranje genetičkog materijala i njegovu ravnomernu raspodelu na ćelije potomaka. Čini ga nekoliko faza, a to su: G1, S, G2, M i G0. Prva faza, G1, označava period u kom dolazi do pripreme ćelija za replikaciju DNK i samo povećanje ćelijske mase, nakon čega sledi S faza u kojoj dolazi do sinteze DNK. G1 je ujedno i najduži period ćelijskog ciklusa tokom kog je ćelija pogodna i dostupna za delovanje faktora iz spoljašnje sredine. U sledećoj, G2 fazi, ćelije se spremaju za ulazak u mitozu, a tokom nje (M faza) dolazi do kariogeneze kao i citokineze. Po završenoj deobi, ćelije ne kreću uvek

u nov ciklus već mogu ući u G0 fazu, odnosno fazu mirovanja bez rasta i proliferacije (Williams i Stoeber, 2012).

Ćelijski ciklus je strogo regulisan proces, te u njemu postoje takozvane kontrolne tačke. Kontrola se fokusira na dva događaja, a to su replikacija DNK i naknadna segregacija. Ćelije se oslanjaju na kontrolne tačke, kako ne bi došlo do akumulacije i propagacije genetičkih grešaka tokom deobe. Upravo zbog toga može dolaziti do zastoja ćelijskog ciklusa kako bi se reparirala DNK ili, ukoliko je to nemoguće, sprečila dalje propagacija i ciklus. Kontrolne tačke nalaze se pre ulaska u S fazu radi provere oštećenja DNK tokom i nakon replikacije DNK, ali ih takođe ima i u M fazi (Vermeulen i sar., 2003). Dodatno, za neometan proces ćelijskog ciklusa odgovorne su i ciklini zavisne kinaze (CDK) čija je aktivnost pod regulacijom CDK inhibitora i vezivanja ciklina. Ciklini se ciklično produkuju i degraduju tokom različitih faza ćelijskog ciklusa. Kada formiraju kompleks sa ciklinima, CDK imaju ulogu u fosforilaciji proteina kao što je protein retinoblastoma (pRb) koji reguliše transkripciju gena potrebnih za pravilno odvijanje ćelijskog ciklusa.

Kod ćelija kancera prisutne su određene promene u genetskoj kontroli ćelijske deobe, što vodi ka nekontrolisanoj proliferaciji ćelija i često se smatra da ćelijski ciklus kancerskih ćelija mora biti defektan u većini kontrolnih tačaka (Metthews i sar., 2021).

1.4.3. Ćelijska smrt

Ćelijska smrt je važan i suštinski proces u razvoju, homeostazi i održanju integriteta višecelijskih organizama. Proliferacija i eliminacija ćelija su neophodni za održanje ravnoteže i homeostaze fizioloških procesa. U osnovi brojnih patoloških stanja, pa i kancera, leži poremećaj upravo ovog procesa. Ćelijska smrt uključuje programiranu ćelijsku smrt – apoptozu i nekrozu (Duprez i sar., 2009).

Apoptoza kao termin je prvi put upotrebljena 1972. godine od kada privlači veliku pažnju za izučavanje (Kerr i sar., 1972). Obzirom da je vid programirane ćelijske smrti, omogućava eliminisanje pojedinačnih ćelija okruženih normalnom ćelijskom populacijom. Izuzetno je energetski zahtevan proces obzirom da je za njega neophodna sinteza makromolekula i da ćelija aktivno učestvuje u njemu. Stalano je prisutan proces u organizmu, ali ipak, apoptoza može da se javi i u slučaju oštećenja ćelija usled delovanja toksičnih agenasa ili pojave određenih bolesti. Mehanizmi koji regulišu proces apoptoze u vezi su i sa mehanizmima kontrole ćelijskog ciklusa. Kao što je već pomenuto, različiti fizički i hemijski agensi mogu da oštete DNK molekul, što dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa i aktivacije mehanizama reparacije. Ukoliko oštećenja ne mogu da se poprave, može doći do aktivacije mehanizama koji vode ka apoptozi (Taylor i sar., 2008).

Apoptotične ćelije se odlikuju posebnim morfološkim karakteristikama koje se javljaju određenim redosledom. Prva uočljiva promena je gubitak međucelijskih veza, a potom smanjenje volumena ćelije. Sledeće što se uočava jesu promene u obliku jedra, fragmentacija molekula DNK, a potom i pucanje jedra i formiranje apoptotskih tela. Ova tela su u vidu manjih fragmenata okruženih membranom, a u unutrašnjosti se nalaze delovi citoplazme, organela i nukleusa. Osim morfoloških promena, kod apoptotskih ćelija javljaju se i biohemijske promene. Vrlo važna karakteristika jeste sinteza određenih proteaza – kaspaza. Ovi enzimi su u svojoj neaktivnoj formi u vidu proenzima, čija aktivacija sleduje odvajanjem subjednica. Aktivacijom jedne od kaspaza pokreće se kaskadna aktivacija ostalih. Značajna je uloga takozvanih egzekutornih kaspaza, kao što je kaspaza 3, koja dovodi do degradacije brojnih proteina i posledično do fragmentacije DNK molekula. Osim toga, kaspaze deluju i na enzime ćelijskog ciklusa i reparacije molekula DNK. Još jedna važna pojava jeste i prelazak fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, što će omogućiti fagocitima prepoznavanje apoptotskih tela obzirom da se ona vrlo brzo uklanjaju iz organizma fagocitozom (Elmore i sar., 2007). Takođe, za fosfatidilserinske ostatke se snažno vezuje protein, Aneksin V, te se često koristi kao marker u detekciji ovog procesa.

Poznata su dva puta apoptoze koja mogu biti izazvana faktorima iz spoljašnje sredine i to su unutrašnji (mitohondrijalni put) i spoljašnji (aktivacija receptora smrti). Krajni rezultat oba puta jeste produkcija i aktivacija brojnih proteolitičkih enzima, kaspaza, ali i brojnih endonukleaza (Dong i sar., 2018). Antiapoptotski i proapoptotski geni familije Bcl-2 utiču na aktivaciju mitohondrijalnog puta apoptoze. Bcl-2 je prvi protein otkriven u ovoj familiji, a njegova uloga je da spreči izlazak citohroma c, koji je aktivator apoptoze i sinteze kaspaza, iz mitohondrija. Ova familija gena se nalazi pod kontrolom tumor supresorskog gena p53. Kada dođe do oštećenja molekula DNK, p53 gen zaustavlja ćelijski ciklus kako bi došlo do reparacije DNK ili pokretanja apoptoze tako što aktivira transkripciju gena čiji produkti inhibiraju Bcl2 (proteini sa BH3 domenom) (Stark i Taylor, 2004; Elmore i sar., 2007). Nekoliko je načina preko kojih može doći do aktivacije apoptoze regulisane p53 genom. Jedan od ovih puteva je i akumulacija ROS, i sledstvenog oštećenja DNK, kao veoma moćnih aktivatora apoptoze (Tsang i sar., 2003). S druge strane, raznovrsni spoljašnji stimuli, kao što su zračenje, fizičke traume, hemioterapeutici i bakterijski toksini, takođe mogu indukovati apoptozu aktiviranjem p53. Međutim, količina ovih stimulusa može uticati na to da li će ćelija ući u programiranu ćelijsku smrt ili drugi tip ćelijske smrti- nekrozu.

U odnosu na apoptozu, nekroza je energetski manje zahtevan proces koji obuhvata veći broj ćelija. Nekada se smatralo da je nekroza spontani proces ćelijske smrti i to u određenim patološkim stanjima. Ipak, mnogo različitih stimulansa može aktivirati put nekroptotske ćelijske smrti uključujući i članove superfamilije receptora faktora tumorske nekroze (TNFR), receptore za prepoznavanje obrazaca (PRR), receptore T ćelija (TCR) i više hemoterapeutskih lekova (Pasparakis i Vandenabeele, 2015). Nekrotične ćelije se odlikuju bubrenjem, pucanjem ćelijske membrane i curenjem citoplazmatskog sadržaja. Izlivanje sadržaja citoplazme u okolni prostor dovodi do inflamacije, dok se ovapojava ne dešava u slučaju apoptoze. Uklanjanje nekrotičnih ćelija je nešto sporije u odnosu na apoptotične, obzirom da razliven ćelijski sadržaj, pogotovo enzimi lizozoma, mogu izazvati brojna sekundarna oštećenja, kao i zbog toga što ne postoje specifični mehanizmi uklanjanja ćelijskih ostataka kao u slučaju apoptoze (Elmore i sar., 2007).

Iscrpljivanje unutarćelijskog nivoa ATP-a može dovesti do promene sa apoptotičnog odgovora na nekrotičan, što govori da ovi procesi nisu potpuno nezavisni. Smatra se da u fiziološkim uslovima, nekroza predstavlja vid podrške apoptozu i da nikada nije jedini put eliminacije i ćelijske smrti (Jan, 2019).

1.4.4. Mitohondrijski membranski potencijal

Mitohondrije, ćelijske organele sa sopstvenom, mitohondrijskom DNK (mtDNK) imaju dobro okarakterisane funkcije kao što su energetski metabolizam, homeostaza kalcijuma, redoks regulacija i apoptoza (Porporato i sar., 2018). Razlika u koncentraciji jona u međumembranskom prostoru i matriksu mitohondrija predstavlja mitohondrijski membranski potencijal (MMP). Nastaje kao rezultat aktivnosti enzima u electron-transportnom lancu prilikom oksidativne fosforilacije na unutrašnjoj membrani mitohondrija. MMP nastao u oksidativnoj fosforilaciji predstavlja pokretačku snagu za sintezu ATP-a hemiosmotskim mehanizmom (Zorova i sar., 2018). Odgovarajući nivo ćelijskog ATP-a i redoks ravnoteže su od suštinskog značaja za normalno funkcionisanje i proliferaciju ćelija, te bi narušavanje ove ravnoteže moglo imati značaja u terapiji kancera.

Kako ćelije kancera već pokazuju određen stepen različitosti u odnosu na normalne ćelije (promene u energetskom metabolizmu, povećani MMP, povećana generacija ROS) to omogućava da upravo mitohondrije budu ciljno mesto delovanja terapeutika (Wen i sar., 2013). U ćelijama kancera sa disfunkcijom mitohondrija povećanje proizvodnje ROS može ih učiniti osjetljivijim na oksidativni stres koji mogu prouzrokovati razni terapeutici. Razlika u energetskom metabolizmu ćelija kancera i normalnih ćelija takođe omogućava selektivnije delovanje terapeutika na kancerske ćelije. Važna je i uloga disfunkcije membrana u apoptozu. Povećanje propustljivosti membrane na

početku apoptoze, radi oslobađanja apoptotskih faktora poput citohroma c, dovodi i do poremećaja u MMP. Stoga, jedinjenja koja imaju potencijal da naruše permeabilnost membrane, odnosno depolarizuju membranu mitohondrija i samim tim naruše MMP, imaju veliki značaj u terapiji kancera (Porporato i sar., 2018).

1.5. Prirodni izvori novih bioaktivnih jedinjenja

Ljudi su tokom dugog vremenskog perioda istraživali mnoge prirodne resurse u nadi da će pronaći lek za određene bolesti. Za mnoge prirodne proizvode otkriveno je da pokazuju snažnu biološku aktivnost, zbog čega predstavljaju polazne supstance za razvoj novih lekova. Biološki aktivni prirodni proizvodi su najčešće produkti sekundarnog metabolizma u živim organizmima (biljke, životinje, mikroorganizmi). Mehanizmi sinteze specifični su za određeni organizam. Veliki diverzitet biljnih i životinjskih vrsta u prirodi omogućava postojanje ogromnog broja različitih struktura sekundarnih biomolekula sa potencijalnom biološkom aktivnošću (Abdel-Razek i sar, 2020).

Dobro je poznato da je veliki deo Zemljine površine pod okeanima što ukazuje na važnost marinskih sistema kao izvora novih biološki aktivnih agenasa. Istraživanja mnogih morskih organizama poput sunđera, korala, algi, mekušaca, ukazuju da se u njima sintetišu brojni sekundarni metaboliti koji se ne susreću među kopnenim organizmima (Haefner, 2003). Dalje, pokazano je da jedinjenja izolovana iz rakova, paukova, riba i ptica ređe pokazuju biološku aktivnost (Abdel-Razek i sar, 2020). Danas je poznato da su niže i više biljke veoma bogate brojnim sekundarnim biomolekulima koji pokazuju najrazličitije biološke aktivnosti (Niu i Li, 2019). Takođe, dobri izvori raznovrsnih prirodnih proizvoda su i mikroorganizmi, posebno bakterije iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* (Charyulu i sar., 2009), ali i razne vrste aktinomiceta i cijanobakterija (Manivasagan i sar., 2014). Iako su za mnoge prirodne proizvode dokazane različite biološke aktivnosti, potraga za novim agensima sa jakom antimikrobnom aktivnošću i jakim antikancerogenim delovanjem je stalno aktuelna zbog sve veće rezistencije mikroorganizama i kancer ćelija na postojeće terapeutike.

Prirodni proizvodi ili proizvodi prirodnog porekla se prema Newman-u i Cragg-u (2016) mogu podeliti na tri grupe: nepromenjeni prirodni (čisti) proizvodi, definisane smeše prirodnih proizvoda poreklom iz biljaka, gljiva, lišaja, sunđera, mikroorganizama i ostalih živih organizama i proizvodi koji su hemijski i modifikovani. Postavlja se pitanje zašto su prirodni proizvodi u prednosti što se tiče njihove biološke aktivnosti u odnosu na sintetska jedinjenja, a odgovor leži u činjenici da su oni genetski kodirani od strane organizama koji ih produkuju i kao takvi prošli kroz prirodnu selekciju. Oni su prirodno dizajnirani da štite organizam u kome se produkuju od različitih štetnih faktora iz spoljašnje sredine i time mu daju evolutivnu prednost u odnosu na druge organizme (Wright, 2019). Poređenje prirodnih proizvoda sa hemijski sintetisanim ukazuje na veću složenost trodimenzionalne strukture prirodnih proizvoda što im omogućava bolje vezivanje za ciljno mesto delovanja. Složenoj trodimenzionalnoj strukturi doprinosi povećan broj sp³-hibridizovanih ugljenika i hiralnih centara, manje aromatičnih prstenova, veći alifatični prstenovi, niži sadržaj azota, a povišen sadržaj kiseonika. Njihova strukturna svojstva se mogu dodatno hemijski modifikovati u cilju dobijanja što adekvatnijeg medicinskog agensa sa poboljšanim osobinama, kao što su povećana stabilnost u organizmu domaćina, delovanje samo u ciljnim tkivima, proširenje spektra receptora za koje se vezuje i dr. (Rodrigues i sar., 2016).

Uprkos dokazanoj efikasnosti, poslednjih godina se beleži pad broja lekova izvedenih od prirodnih proizvoda u kliničkoj upotrebi. Trenutni izazovi za upotrebu prirodnih proizvoda u farmaciji i kliničkoj praksi jesu nedostatak standardizovanih procedura za proizvodnju, metoda za izolaciju čistih proizvoda iz prirodnih izvora, nedovoljno objašnjeni mehanizmi delovanja i retko podvrgavanje kontrolisanim i dobro dokumentovanim kliničkim ispitivanjima prema postavljenim standardima (Thomford i sar., 2018).

1.5.1. Biljke – izvori novih agenasa

Godinama unazad, kroz istoriju, ljudi su se okretali prirodi kako bi lečili najrazličitije tegobe i bolesti. Ovi tradicionalni lekovi su se prenosili kroz generacije i poboljšavali vođeni stečenim iskustvom tokom vremena. Većina ovih lekova se sastojala od smeše biljnih delova koje su konzumirane direktno ili obrađivane, na primer ekstrakcijom biljnih komponenti korišćenjem vode (čajevi), ili alkohola (tinkture) ili čak fermentacijom (Wright, 2019). Upotreba biljaka u ove svrhe datira još iz 2600. godine pre nove ere, govoreći o upotrebi oko 1000 različitih supstanci biljnog porekla u Mesopotamiji. One su uključivale ulja iz roda *Cedrus*, *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, vrste roda *Commiphora* i *Papaver somniferum* koji su i dan danas u upotrebi kada je reč o tradicionalnoj medicini, posebno za lečenje kašlja, prehlada i infekcija. Tokom 19. veka izolovan je morfijum, a kasnije i kokain, kodein, kinin koji su i danas u upotrebi. Prema SZO, oko 60 % populacije se oslanja i danas na tradicionalnu medicinu i upotrebu biljaka (Cragg i Newman, 2013). Često narod u nerazvijenim zemljama za lečenje koristi biljne proizvode obzirom da su oni deo njihove kulture i tradicije (Parasuraman, 2018).

Biljno carstvo je veoma bogato biljnim vrstama i procenjuje se da se širom sveta javlja oko 250.000 – 500.000 vrsta, od kojih se oko polovina nalazi u tropskim šumama. Kako naseljavaju najrazličitija staništa, biljke su suočene sa mnogim stresovima i izazovima okolne sredine, a uz sedentarni način života, razvile su mehanizme za sintezu brojnih molekula koji im obezbeđuju zaštitu. Danas su ti molekuli, odnosno sekundarni metaboliti osnova u potrazi novih jedinjenja za primenu u medicinske svrhe (Munro i sar., 2018). Sekundarni metaboliti su veoma heterogena grupa prirodnih jedinjenja, koja se koriste za lečenje raznih bolesti. Kvalitativni i kvantitativni sastav sekundarnih biomolekula zavisi od biljne vrste kao i staništa u kome biljka raste. Često su akumulirani u manjim količinama i u određenim, specijalizovanim biljnim organima (Jain i sar., 2019). Njihova klasifikacija se može zasnivati na hemijskom sastavu, hemijskoj strukturi, biosintetskom poreklu ili pak njihovoj rastvorljivosti. Ugrubo, podeljeni su u tri velike grupe i to alkaloidne, fenolne i terpenne. Do sada poznati sekundarni metaboliti sa jakom antibakterijskom ili antikancerskom aktivnošću uglavnom pripadaju nekoj od sledećih grupa: alkaloidi, polifenoli uključujući flavonoide, hinone, tanine, kumarine, zatim terpeni, polipeptidi, saponini (Anand i sar., 2019). Njihova aktivnost često zavisi i od interakcija sa drugim jedinjenjima u biljci, ali i od doze koja je primenjena te u zavisnosti od toga mogu imati blagotvorna ili toksična dejstva na druge organizme. Uopšteno gledano, sekundarni metaboliti često imaju prednost obzirom da pokazuju manju toksičnost od konvencionalnih lekova kao i manje neželjenih efekata (Manandahar i sar., 2019).

Biljni proizvodi zbog svega navedenog privlače veliku pažnju kada je reč o pronalasku novih terapeutika ili alternative postojećim. Veoma su dobri kandidati za nove antimikrobne, antibiofilm i antikancerske agense. Obzirom na njihovu raznovrsnost, mehanizmi njihovog delovanja su brojni. Kada je reč o njihovoj antibakterijskoj aktivnosti, uopšteno se može reći da deluju na funkciju i strukturu ćelijske membrane, interferiraju sa metabolizmom, prekidaju sintezu DNK/RNK molekula, prekidaju normalnu ćelijsku komunikaciju i indukuju koagulaciju citoplazmatskih sadržaja (Khameneh i sar., 2019). Važno je istaći da mogu delovati na mikroorganizme ne samo ubijajući ih, već uticanjem na ključne događaje u patogenezi. Iz tog razloga, veliko je interesovanje za antibiofilm agense među biljnim proizvodima. Sa druge strane, u pogledu antikancerskih agenasa značajna je i sposobnost sekundarnih metabolita da ometaju protein-protein interakcije, te da mogu biti modulatori imunog odgovora, modulatori ćelijskog ciklusa, apoptoze i signalne transdukcije (Anand i sar., 2019).

1.5.2. *Frangula alnus*

Frangula alnus Mill. (sinonim *Rhamnus frangula* L.) pripada porodici Rhamnaceae, a u narodu je poznata kao krušina, pasja leska, trušljika, krkovina, pasdren (Grdinić i Kremer, 2009). Poznato je oko 50 rodova i 500 vrsta ove porodice u svetu, dok su u flori Srbije zastupljene samo

dve vrste iz roda *Frangula* i to *Frangula alnus* i *Frangula rupestris* (Sajc i sar., 1999). Krušina predstavlja žbun ili nisko listopadno drvo. Kora mladih biljaka je glatka i sjajna, smeđe sive boje, uzdužno ispucala, sa unutrašnje strane žuta do crvenkasto smeđa, dok su grančice sivo smeđe sa lenticelama i retko dlakave (Slika 9). Njeni pupoljci su goli i bez ljusti, a listovi obrnuto jajasti, celog oboda dužine do 7 cm, a širine 4 cm, naspramno raspoređeni. Lice listova je tamnozeleno i sjajno, dok su sa naličja svetlija. Cvetovi su uglavnom sitni i neugledni, belo zelenkasti i mogu se javljati pojedinačno ili u cvasti. Period cvetanja je kraj proleća i početak leta. Plodovi krušine su nejestive, okrugle i mesnate koštunice koje su u početku zelene boje, potom crvenkaste dok su u zreлом stadijumu tamno ljubičaste do crne. Sazrevaju sukcesivno te se u isto vreme na biljci mogu naći plodovi različitih boja i stepena zrelosti. U plodu se nalaze 2 do 3 semena (Salopek i sar., 2016). Areal njenog rasprostranjenja je veliki, prostire se širom Evrope, severozapadne Afrike, zapadnog i istočnog Sibira, srednje Azije, severnog Irana, Kavkaza, dostižući nadmorske visine od 2000 m. Često se sreće na vlažnom zemljištu, na obodima močvara, obalama reka, potoka i jezera, kao i na rečnim ostrvima (Alimova i sar., 2017).

U narodnoj medicini, krušina je poznata po svom laksativnom dejstvu te se i danas često upotrebljava. Kao droga, koristi se osušena kora krušine (*Frangulae cortex*). Kora se sakuplja tokom zime i u rano proleće, pre listanja. Skida se sa mladih grana i stabala. Kora se može sakupljati od samoniklih biljaka, ali se krušina može i planski uzgajati. Vrlo je važno sušiti koru krušine oko 12 meseci, obzirom da su pojedine komponente kojim je bogata, a koje se gube stajanjem, vrlo iritirajuće za stomak, te mogu izazvati mučnine i povraćanje. Proces ubrzanja raspadanja iritirajućih materija se može postići zagrevanjem kore tokom jednog sata. Miris same sirovine je slab, dok je gorkog ukusa (Salopek i sar., 2016; Alimova i sar., 2017).

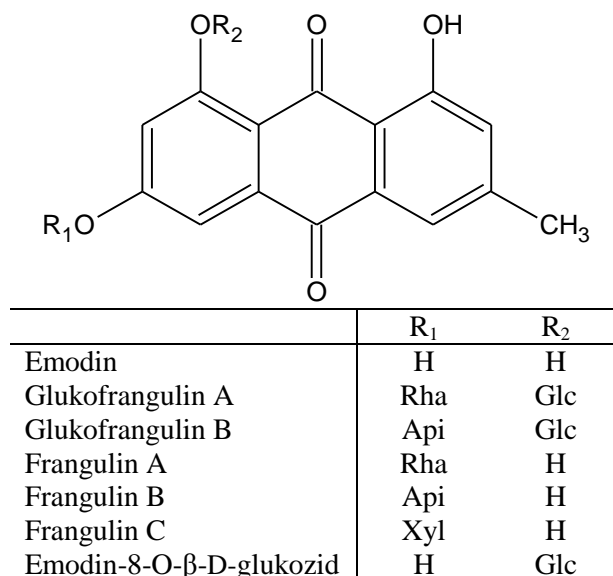


Slika 9. *Frangula alnus* (<https://florafinder.org/>)

Istraživanja su pokazala da je biljka u zavisnosti od rasprostranjenja, bogata raznim vrstama sekundarnih metabolita među kojima su polifenoli, flavonoidi, tanini i antrahinoni. Od antrahinona u krušini su naročito zastupljeni diglikozidi emodina i to prvenstveno glukofrangulin A i glukofrangulin B, zatim monoglikozidi frangulin A, frangulin B, frangulin C i emodin-8-O- β -D-glukozid (Slika 10), kao i manja količina diantrona, aglikona emodina i drugih antrahinonskih glikozida. S obzirom da dominantne komponente u kori krušine – glukofrangulini - imaju laksativni efekat, kvalitet droge vrednuje se prema Evropskoj farmakopeji na osnovu količine ovih komponenti (EMA, 2019). Pored antrahinona, u krušini se nalazi i manja količina antrona, koji ispoljavaju toksično delovanje, pa se kora krušine koristi tek godinu dana nakon sušenja, jer se prilikom sušenja antroni oksiduju do antrahinona.

Više od polovine do sada poznatih prirodnih antrahinona pronađeno je kod nižih gljiva, posebno *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta, i kod lišajeva, dok se ostatak nalazi kod biljaka. Familije

biljaka koje su posebno bogate ovom grupom jedinjenja su Rhamnaceae, Rubiaceae, Polygonaceae, Fabaceae, Verbenaceae i Liliaceae. Antrahinone karakteriše antracenski prsten (triciklični aromatični) sa dve ketonske grupe na položajima C9 i C10 (Izhaki, 2002). Ova grupa jedinjenja se odlikuje velikom raznovršnošću, a imaju primenu u industriji, posebno farmaceutskoj (Malik i Müller, 2016). Među najčešćim prirodnim antrahinonima javljaju se emodin, aloe-emodin, rein, hrizofanol (Li i Jiang, 2018).



Slika 10. Dominantni antrahinoni u krušini; Rha = α -L-ramnopiranoza, Glc = β -D-glukopiranoza, Api = β -D-apioza, Xyl = β -D-ksilozilpiranozid

Emodin (1,3,8-trihidroksi-6-metil-antrahinon, Slika 10) je osim u kori krušine vrlo čest i kod biljaka porodice Polygonaceae i Fabaceae (Izhaki, 2002). Takođe se može naći i kod biljaka koje naseljavaju tropske, subtropske i umerene krajeve. Javlja se u različitim životnim formama biljaka kao što drveće, žbunje, liane. Najzastupljeniji je u kori i korenju biljaka, ali je prisutan i u drugim vegetativnim organima, kao i u reproduktivnim organima biljaka. Pojedine studije ukazuju da njegova distribucija u biljkama zavisi od sezone i intenziteta svetlosti. Smatra se da kod porodice Rhamnaceae emodin nastaje preko poliketidnog biosintetskog puta (Sajc i sar., 1999).

Lekovita svojstva kore krušine datiraju još iz XIV veka kada je primećeno da kora ima laksativni efekat, a da purgativi doprinose izbacivanju žuči i da poseduju antiinflamatorna i diuretička svojstva (Alimova i sar., 2017). Takođe, upotreba emodina u tradicionalnoj Kineskoj medicini poznata je još od pre 2000 godina (Dong i sar., 2016). U etno medicini kora krušine se koristi kod stomaćnih tegoba, srčanog edema, bolesti štitaste žlezde, kod tahikardija, vrtoglavica, migrena pa čak i depresije. Tinkture se mogu upotrebljavati i za kožna oboljenja, a poznato je i da ima blagotvorno dejstvo kod zarastanja rana. Danas je kora krušine komponenta brojnih preparata u naučnoj medicini (Ramnil, Vicalinum, Vicairum, Roterum) koja poseduju od jakih do blagih purgativnih svojstva i koja se mogu koristiti za lečenje ulceroznih bolesti želuca i duodenuma (Alimova i sar., 2017). Sastojak su i raznih čajeva sa laksativnim i purgativnim efektom. Ukoliko se dugo konzumira može doći do navikavanja, slabljenja efekta, ali i pojave smeđe pigmentacije creva u medicini poznate kao *melanosis coli*. Prekomerna upotreba, odnosno upotreba visokih doza kore krušine može izazvati jake abdominalne bolove, dehidracijom i gubitkom elektrolita. Smatra se i da konstantno unošenje prekomernih količina može dovesti do toksičnog hepatitisa (Walker i sar., 1988; Salopek i sar., 2016). Sa druge strane, emodin ima blagotvoran efekat kod pankreatitisa, astme, miokarditisa, artritisa i hroničnih bolesti pluća. Dodatno, ima efekat i kod dijabetesa i neuroloških problema. Kao i sama kora krušine, pokazuje i neke nuspojave u vidu toksičnosti, mučnina i dijareja (Salopek i sar., 2016).

Ono što je zajedničko za koru krušine i emodin jeste laksativni efekat i način na koji ga ostvaruju. Oni se ubrajaju u grupu stimulišućih laksativa (Cirillo i Capasso, 2015). Nakon oralnog unosa, antrahinonski glikozidi nepromenjeni prolaze kroz želudac i tanko crevo, a sam mehanizam delovanja započinje u debelom crevu. Započinjanju delovanja pomaže bakterijska crevna flora, gde bakterijske glikozidaze cepaju glikozidne veze antrahinonskih glikozida. Oslobođeni antrahinon bez šećera (aglikon), emodin, se sada slabo apsorbuje u lumen creva te počinje da utiče na crevnu peristaltiku, apsorpciju i sekreciju creva što posledično vodi ka laksativnom efektu. Smatra se da emodin deluje na pokretljivost creva povećanjem lučenja motilina (hormona koji povećava pokretljivost), povećanjem oslobađanja endogenog acetilholina koji omogućava kontrakcije glatke muskulature i da smanjuje lučenje somatostatina (hormon koji inhibira rad probavnog sistema). Osim toga, emodin može povećati i volumen crevnog sadržaja i inhibirati aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze što će dovesti do smanjene apsorpcije hranljivih materija (Srinivas i sar., 2007). Hranljive materije koje se nakupljaju u crevima, povećavaju osmotski pritisak koji dovodi do difuzije vode i povećanog volumena creva što vodi laksativnom delovanju (EMA, 2019).

Pored navedene glavne upotrebe i aktivnosti krušine i emodina, brojne su i biološke aktivnosti koje poseduju (Salopek i sar., 2016). Krušina i emodin imaju antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, a mehanizam delovanja se i dalje istražuje. Dosadašnja istraživanja ukazuju na interakciju kore krušine i emodina sa ćelijskim strukturama kao i procesima unutar same ćelije. Poznato je da inače biljni ekstrakti mogu menjati permeabilnost membrane, a slično se pripisuje i emodinu (Srinivas i sar., 2007; Sadowska i sar., 2014; Yang i sar., 2015). Takođe, kao drugi način delovanja navodi se prooksidativna aktivnost sekundarnih metabolita i samim tim i emodina. Pokazano je i antivirusno delovanje kore krušine i emodina, ali se mehanizam i dalje istražuje. Ono što se za sada zna jeste da emodin deluje na virusni omotač i na replikaciju virusa (Sydiskis i sar., 1991; Hsiang i Ho, 2008). Utvrđena je i antioksidantna aktivnost ovih supstanci. Pored ovih bioloških aktivnosti, pokazana je i antikancerska aktivnost krušine i emodina i predloženi su potencijalni mehanizmi njihovog delovanja među kojima je najaktuelnije ostavriavanje efekta kroz prooksidativnost. Za emodin je pokazana i fotoprotektivna, imunosupresivna, antiinflamatorna i antialergijska aktivnost (Salopek i sar., 2016).

Iako su brojne primene i biološke aktivnosti poznate za koru krušine i emodin, postoji veliki prostor za istraživanje njihovih novih bioloških aktivnosti, modulacije već poznatih kao i ispitivanja potencijalnih novih mehanizama njihovog delovanja.

2. Ciljevi

Pojava rezistencije na antimikrobne agense, kao i na dostupne antikancerske agense predstavlja globalni problem današnjice sa kojim se suočavamo. Bakterije su postale izuzetno rezistentne na medikamente koji se upotrebljavaju, što posledično onemogućava uspešno lečenje i produžava sam tok lečenja. Pored toga, još veći problem predstavljaju bakterije u formi zajednica, odnosno bakterijskih biofilmova, koji su uzročnici teških bolničkih infekcija i u kojima su bakterije znatno rezistentnije. Sa druge strane, česta je i pojava rezistencije kancerskih ćelija na dostupne hemioterapeutike kao i pojava brojnih neželjenih efekata ovih medikamenata tokom terapije. Shodno tome, postoji konstantna je potreba za pronalaskom novih agenasa, ali i strategija u borbi sa navedenim problemom. S obzirom da mnoge biljke u tradicionalnoj medicini imaju dugu upotrebu u lečenju brojnih tegoba, opravdano je nove biološki aktivne agense tražiti u prirodi kao nepresušnom izvoru novih jedinjenja. Dodatno, prirodni proizvodi poreklom iz biljaka mogu smanjiti pojavu i jačinu neželjenih efekata, ali i povećati efikasnost medikamenata koji su u konvencionalnoj upotrebi. Obzirom na sve navedeno, kao i činjenicu da su pojedine biološke aktivnosti tradicionalno korišćene krušine slabo ispitane, postavljeni su glavni ciljevi disertacije kao i podciljevi preko kojih su glavni ostvareni.

Postavljeni ciljevi bili su sledeći:

- Priprema etil-acetatnog ekstrakta kore *F. alnus*
- Hemijska karakterizacija pripremljenog ekstrakta:
 - Kvalitativna analiza ekstrakta primenom GC×GC/MS metode
 - Kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja u dobijenom ekstraktu primenom LC-MS/MS
- Analiza antioksidantne aktivnosti etil-acetatnog ekstrakta kore *F. alnus* i emodina:
 - Sposobnost neutralizacije DPPH radikala u DPPH testu
 - Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije u TBA testu
- Ispitivanje antibakterijskog efekta etil-acetatnog ekstrakta kore *F. alnus* i emodina prema odabranim sojevima *Staphylococcus aureus*:
 - Primenom mikrodilucione metode radi utvrđivanja minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija testiranih sojeva, kao i dinamike njihovog preživljavanja u funkciji rastućih koncentracija test supstanci
 - Utvrđivanje tipa interakcija između test supstanci i antibiotika vankomicina primenom metode šahovske table
- Ispitivanje antibiofilm aktivnosti etil-acetatnog ekstrakta kore *F. alnus* i emodina na odabranim sojevima *S. aureus*:
 - Aktivnost na formiranje biofilma kvantifikacijom biomase biofilma kristal violetom
 - Aktivnost na već formirane biofilme kvantifikacijom biomase biofilma kristal violetom
 - Efekat na ekstracelularne polisaharide u matriksu formiranih biofilmova
 - Efekat na količinu eDNK u matriksu formiranih biofilmova
 - Efekat na broj ćelija perzistera u formiranim biofilmovima
 - Efekat na strukturu već formiranih biofilmova primenom SEM mikroskopije
 - Efekat na strukturu i hrapavost već formiranih biofilmova primenom AFM mikroskopije
- Ispitivanje antibiofilm aktivnosti kombinacije test supstanci sa antibiotikom vankomicinom na odabranim sojevima *S. aureus*:

- Aktivnost na formiranje biofilma kvantifikacijom biomase biofilma kristal violetom
- Aktivnost na već formirane biofilme kvantifikacijom biomase biofilma kristal violetom
- Ispitivanje efekta etil-acetatnog ekstrakta kore *F. alnus* i emodina na produkciju faktora virulencije, pigmenta stafiloksantina, kod *S. aureus* sojeva
- Utvrđivanje potencijalnog mehanizma antibiofilm delovanja etil-acetatnog ekstrakta kore *F. alnus* i emodina:
 - Praćenje efekta na aerobnu respiraciju sojeva *S. aureus* u planktonskoj i biofilm formi
 - Praćenje kombinovanog efekta test supstanci i antibiotika vankomicina na aerobnu respiraciju sojeva *S. aureus* u planktonskoj i biofilm formi
 - Praćenje efekta na ekspresiju *icaA*, *icaD*, *srrA* i *srrB* gena kao i na mikro RNK (RNA III)
- Analiza citotoksičnog potencijala etil-acetatnog ekstrakta kore *F. alnus* i emodina na HepG2, HCT 116 i MRC-5 ćelijskim linijama:
 - Praćenje efekta na vijabilnost primenom MTT testa
 - Praćenje efekta na ćelijski ciklus primenom protočne citometrije
 - Utvrđivanje tipa ćelijske smrti
 - Praćenje efekta na mitohondrijski membranski potencijal
 - Analiza genotoksičnog potencijala primenom komet testa

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Biljni materijal

Za potrebe dobijanja ekstrakta u ovoj doktorskoj disertaciji, korišćena je osušena i usitnjena kora *Frangula alnus*, komercijalno nabavljena sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd, Srbija.

3.1.2. Emodin

U doktorskoj disertaciji korišćena je čista supstanca emodin, poreklom iz kore *Frangula alnus* (Sigma Aldrich, SAD), čistoće ≥ 90 %. Prah emodina je rastvaran u DMSO-u (stok 5 mg/mL).

3.1.3. Rastvori za testiranje antioksidantne aktivnosti

DPPH test

DPPH reagens

DPPH	7,8 g
Metanol	100 mL

Vitamin C (askorbinska kiselina)

Stok 10 mg/mL, rastvaran u dH₂O.

TBA test

Rastvor lipozoma

L- α -fosfaditilholin	1 g
Bidestilovana H ₂ O	10 mL

0,01M Vitamin C (askorbinska kiselina)

Vitamin C	0,06 g
dH ₂ O	100 mL

Butil-hidroksitoluen (BHT)

Primarni stok 200 mg/mL, rastvaran u DMSO-u.

0,01M FeSO₄

FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,21 g
dH ₂ O	10 mL

0,067 M fosfatni pufer (pH 7,4)

KH ₂ PO ₄	1,75 g
Na ₂ HPO ₄	7,69 g
dH ₂ O	1000 mL

0,1M EDTA

EDTA	1,86 g
dH ₂ O	50 mL

TBA reagens

Tiobarbiturna kiselina (TBA)	3 g
Trihlorsirćetna kiselina (TCA)	120 g
Perhlorna kiselina (HClO ₄)	10,4 mL
dH ₂ O	800 mL

3.1.4. Biološki materijal

3.1.4.1. Bakterijski sojevi

U doktorskoj disertaciji testirani su sojevi *Staphylococcus aureus* osetljivi na meticilin (MSSA) i meticilin rezistentni (MRSA) iz ATCC kolekcije, kao i prethodno okarakterisani klinički izolati. Izolati, invazivni i neinvazivni, dobijeni su sa Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Univerziteta u Beogradu – Medicinskog fakulteta. Identifikacija kliničkih izolata je izvršena na osnovu morfologije kolonija, bojenja po Gramu, katalaza i koagulaza testova i primenom automatizovanog Vitek 2 sistema. Osetljivost sojeva prema meticilinu je određena prema EUCAST standardu. Sojevi, kao i njihove karakteristike, prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Testirani sojevi *S. aureus*

Sojevi	Poreklo	Osetljivost	Kolekcija
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ATCC	MSSA	Katedra za mikrobiologiju,
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	ATCC	MRSA	Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet
<i>S. aureus</i> Gp 41	hirurška rana	MSSA	Institut za mikrobiologiju i
<i>S. aureus</i> Gp 19	nos	MSSA	imunobiologiju, Univerzitet u
<i>S. aureus</i> Gp 29*	krv	MRSA	Beogradu – Medicinski fakultet
<i>S. aureus</i> Gp 7*	nos		

* Invazivni sojevi

3.1.4.2. Čelijske linije

U ovom radu korišćene su sledeće čelijske linije: normalni fetalni fibroblasti pluća (**MRC-5**, ECACC 84101801), ćelije karcinoma kolona (**HCT 116**, ECACC 91091005) i ćelije hepatokarcinoma (**HepG2**, ATCC HB-8065).

3.1.4.3. Hranljive podloge, rastvori i reagensi za rad sa bakterijskim kulturama

LB (Luria Bertani bujon)

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	1000 mL

LA (Luria Bertani agar)

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 mL

MHB (Mueller-Hinton bujon)

MHB prah	21 g
dH ₂ O	1000 mL

MHA (Mueller-Hinton agar)

MHB prah	21 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 mL

TSA (Tryptic Soy agar)

TSA prah	40 g
dH ₂ O	1000 mL

Nakon što su pripremljeni, svi medijumi su sterilisani u autoklavu 20 min, na 121 °C. U MHB medijum je, za potrebe antibiofilm testiranja, po autoklaviranju dodavan sterilni rastvor glukoze u finalnoj koncentraciji 0,5 %.

Vankomicin

Antibiotik vankomicin je rastvaran u koncentraciji 1 mg/mL u dH₂O.

Resazurin

Stok koncentracije 675 µg/mL u dH₂O.

0,1 % Kristal violet

Kristal violet prah	0,1 g
dH ₂ O	100 mL

1×PBS (eng. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*)

10×PBS	5 mL
dH ₂ O	45 mL

5 % fenol

Fenol	5 g
dH ₂ O	100 mL

3M Na-acetat (pH 5,0)

Na-acetat	7,4 g
dH ₂ O	30 mL

Nakon podešavanja pH vrednosti, rastvor je autoklaviran i čuvan na sobnoj temperaturi.

0,1M NaOH

10 M NaOH	1 mL
dH ₂ O	99 mL

TE pufer (pH 7,6)

10 mM TRIS	0,036 g
1 mM EDTA	60 µL 0,5 M rastvora EDTA
dH ₂ O	do 30 mL

Nakon podešavanja pH vrednosti, pufer je autoklaviran i čuvan na sobnoj temperaturi.

Stok Proteinaza K

Pripreman je primarni stok od 20 mg/mL u puferu iz DNA Fungal/Bactericidal DNA Miniprep Kit-a (Zymoresearch, USA), dok je radni stok od 1 mg/mL pripreman u 1×PBS.

Kit za ekstrakciju bakterijske DNK

Za ekstrakciju bakterijske DNK korišćen je komercijalni Quick-DNA Fungal/Bactericidal DNA Miniprep Kit (Zymoresearch, USA).

Rastvori i reagensi za PCR

PCR reakciona smeša

Fast Gene Taq PCR kit (Zymoresearch, USA)

5×TBE pufer

TRIS	54 g
Borna kiselina	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8)	40 mL
dH ₂ O	1 L

Iz ovog rastvora, razblaživanjem, pripreman je 0,5×TBE pufer.

1% agarozni gel

Agaroz	2,4 g
0,5×TBE pufer	240 mL
Etidijum-bromid (10 mM)	9,6 µL

Prajmeri

Prajmeri (Invitrogen Life Technologies, SAD) korišćeni za PCR i qRT-PCR dati su u Tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za PCR i qRT-PCR analize

Gen	Sekvenca prajmera (5'→3')	Produkt (bazni parovi)
<i>rpO</i>	F: CAGCTGACGAAGAAGATAGCTATGT R: ACTTCATCATCCATGAAACGACCAT	82
<i>icaA</i>	F: ACACTTGCTGGCGCAGTCAA R: TCTGGAACCAACATCCAACA	188
<i>icaD</i>	F: ATGGTCAAGCCCAGACAGAG R: AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA	198
<i>srrA</i>	F: TAATGTTGCCTGAAATGGATGG R: CAACACGGTTTGTTCCTCACCT	108
<i>srrB</i>	F: AGCCGGCTAAATAGTGTCGT R: ATGGCATTTCGGTTTCTTG	132
RNA III*	F: GCACTGAGTCCAAGGAACTAAC R: AAGCCATCCCACTTAATAACC	

* mikro RNK

3.1.4.4. Podloge i rastvori za humane ćelije

Ćelijske linije MRC-5 i HCT 116 gajene su u DMEM medijumu (eng. *Dulbecco's modified eagle's medium*) sa 2 mM L-glutaminom i dodatkom fetalnog govedeg seruma (FBS, eng. Fetal bovine serum). Za gajenje HepG2 ćelijske linije korišćen je Williams' medijum E sa 2 mM L-

glutaminom i FBS-om. U oba medijuma je dodavan i rastvor smeše antibiotika penicilina (100 U/mL) i streptomocina (100 µg/mL).

DMEM (zapremina 50 mL)

DMEM medijum	44,5 mL
FBS	5 mL
Penicilin/streptomycin	0,5 mL

Williams' medijum E (zapremina 50 mL)

Williams' medijum E	42 mL
FBS	7,5 mL
Penicilin/streptomycin	0,5 mL

Medijum za zamrzavanje (zapremina 1 mL)

Odgovarajući medijum	550 µl
FBS	350 µl
DMSO	100 µl

1×PBS (eng. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*)

10×PBS (komercijalni)	5 mL
dH ₂ O	45 mL

Tripsin (0,1%)

Tripsin	1 g
EDTA	0,1 g
NaCl	8 g
KCl	0,4 g
Glukozomonohidrat	1 g
NaHCO ₃	0,84 g
dH ₂ O	1000 mL

Nakon pripreme rastvor je filtriran filterom 0,22 µm i čuvan na -20 °C.

MTT (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid)

Pripreman je stok od 5 mg/mL u 1×PBS. Rastvor je potom profiltriran filterom 0,22 µm i čuvan na -20 °C.

Rastvor za lizu ćelija (pH 10)

NaCl	146,6 g
EDTA	37,2 g
TRIS	1,21 g
dH ₂ O	1000 mL

Po podešavanju odgovarajućeg pH rastvora, dodat je 1% Triton X-100.

Rastvor za denaturaciju i elektroforezu (pH 13)

10 M NaOH	40,5 mL
0,2 M EDTA	6,75 mL
dH ₂ O	1302,75 mL

Rastvor za neutralizaciju (pH 7,5)

TRIS	48,44 g
dH ₂ O	1000 mL

10 M NaOH

NaOH	200 g
dH ₂ O	500 mL

0,2 M EDTA

EDTA	37,2 g
dH ₂ O	500 mL

NMP (eng. *Normal melting point*) agaroza (0,5%)

NMP	0,5 g
1×PBS	99,5 mL

NMP agaroza (1%)

NMP	1 g
1×PBS	99 mL

LMP (eng. *Low melting point*) agaroza (1%)

LMP	1,4 g
1×PBS	99 mL

Akridin oranž

Pripreman je primarni stok od 10 mg/mL u dH₂O, dok je radni stok iznosio 2 µg/mL.

Propidijum jodid

Radni stok iznosio je 5 µg/mL.

Kit za detekciju apoptoze

Za praćenje apoptoze u ćelijskim linijama korišten je kit FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI for Flow Cytometry (ThermoFisher Scientific).

Mitohondrijski membranski potencijal

Za praćenje mitohondrijskog membranskog potencijala korišten je kit Mitochondria Membrane Potential Kit JC-10 Assay for Microplate Readers (Sigma-Aldrich, USA).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema etil-acetatnog ekstrakta *F. alnus*

Za dobijanje etil-acetatnog ekstrakta *F. alnus*, 25 g osušenog i usitnjenog biljnog materijala ekstrahovano je sa 250 mL 80 % etanola (v/v) maceracijom na sobnoj temperaturi uz stalno mućkanje. Odvajanje tečne frakcije od biljnog materijala je vršeno vakuum filtracijom u Bihnerovom levku (pore papira 2 µm) i maceracijom od 24 h, nakon čega je filtracija ponovljena još dva puta sa novim količinama svežeg rastvarača. Prikupljene su frakcije ekstrakta i uparene do suva na vakuum uparivaču (45 °C), a dobijen materijal je rastvoren u 50 mL mlake destilovane vode u ultrazvučnom kupatilu (Sonorex RK 10 317, Bandelin). Kako bi se uklonila nepolarna jedinjenja, ekstrakt je ispran više puta petrol-etrom (frakcija 40 – 60 °C) do obezbojavanja petrol-etarske frakcije. Petrol-etarska frakcija je odbačena, a vodena podvrgnuta daljoj ekstrakciji etil-acetatom i to četiri puta sa 50 mL rastvarača. Dobijene etil-acetatne frakcije su spojene, uparene do suva na vakuum uparivaču i dodatno osušene u vakuum eksikatoru do konstantne mase. Masa je potom rastvorena u DMSO-u u koncentraciji od 300 mg/mL i označena

kao primarni stok. Ovako proizveden etil-acetatni ekstrakt *F. alnus* (FA ekstrakt) je čuvan na -20 °C.

3.2.2. Hemijska karakterizacija etil-acetatnog ekstrakta *F. alnus*

Hemijska analiza ekstrakta je obuhvatila kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Kvalitativna analiza je urađena na sveobuhvatnom dvodimenzionalnom gasnom hromatogramu sa masenim detektorom (GC×GC/MS), koji zbog velike moći razdvajanja i osetljivosti, omogućava analizu velikog broja jedinjenja prisutnih u ekstraktu. Sa druge strane, kvantitativna analiza je podrazumevala tečnu hromatografiju sa tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), što je omogućilo detekciju masenih udela određenih fenolnih jedinjenja u ekstraktu.

3.2.2.1. Kvalitativna GC×GC/MS analiza

Ekstrakt je derivatizovan sa BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid) na 60 °C tokom 45 min i analiziran na GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japan) dvodimenzionalnom gasnom hromatogramu sa masenim spektrometrom i ZX2 termalnim sistemom modulacije (Zoex Corp). Ovaj sistem omogućava razdvajanje uzorka pomoću dve kolone: nepolarnoj RtxR-1 (Restek, CrossbondR 100 % dimetil polisiloksan, 30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 µm) i srednje polarnoj BPX50(SGE analytical Science, 1 m, 0,1 mm i.d., 0,1 µm). Obe kolone nalaze se u istoj rerni koja je podešena na temperaturu 40 °C tokom prvih 5 min, a potom podignuta na 300 °C brzinom od 5,2 °C/min. Modulacioni period je trajao 6 s. Opseg skeniranja bio je m/z 70 – 500. Dobijeni podaci su analizirani softverom GCImage R 2.8 (GCImage LLC) i jedinjenja su identifikovana poređenjem sa bibliotekom masenih spektara NIST17.

3.2.2.2. Kvantitativna LC-MS/MS analiza

Sadržaj hinske kiseline kao i 22 odabrana fenolna jedinjenja (11 fenolnih kiselina, 10 flavonoida, 2 kumarina, antrahinon emodin, izoflavon formononetin i triterpenoid ursolna kiselina) utvrđen je pomoću LC-MS/MS analize po prethodno opisanom protokolu Orčić i sar. (2014). Korišćeni standardi su kupljeni od sledećih proizvođača: ChromaDex (Santa Ana, SAD), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švajcarska), Extrasynthese (Lion, Francuska) i Sigma–Aldrich Chem (Steinheim, Nemačka). Za analizu je korišćen tečni hromatogram serije Agilent 1200, uparen sa elektrosprejom serije Agilent 6410B jonizacionim masenim spektrometrom i kontrolisan softverom MassHunter ver. B.03.01. Ekstrakt je razblažen smešom 0,5 % vodenog mravlje kiseline i metanola (odnos 7:3) kako bi se dobili stokovi od 20 mg/mL i 2 mg/mL za analizu. Po 5 µl uzorka je ubrizgano u sistem, a jedinjenja su potom razdvajana na obrnuto-faznoj koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 mm × 50 mm × 1,8 mm (Agilent Technologies). Podaci su prikupljeni tokom dinamičkog SMR režima, koristeći optimizovane i prethodno opisane parametre specifične za jedinjenja (Orčić i sar., 2014) sa dodatkom pet novih jedinjenja sa parametrima datim u Tabeli 4. Površine pikova su određene pomoću softvera MassHunter Workstation Software – Qualitative Analysis (ver. B.06.01). Napravljene su kalibracione krive i izračunata je koncentracija jedinjenja u uzorcima.

Tabela 4. Parametri jedinjenja korišćeni za LC-MS/MS analizu etil-acetatnog ekstrakta *F. alnus*

	Retenciono vreme	Prekursorski jon	Jon proizvoda	Napon fragmentora	Napon sudara
Elagična kiselina	2,23 min	m/z 301	m/z 301	152 V	0 V
Ursolna kiselina	9,44 min	m/z 455	m/z 455	300 V	12 V
Diosmetin	5,02 min	m/z 299	m/z 284	140 V	20 V
Emodin	8,14 min	m/z 269	m/z 225	160 V	25 V
Formononetin	5,49 min	m/z 267	m/z 252	100 V	16 V

3.2.3. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti

3.2.3.1. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala (DPPH test)

Sposobnost FA ekstrakta i njegove dominantne komponente emodina da neutrališu DPPH radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikal), procenjena je primenom DPPH testa. DPPH je stabilan radikal koji ima ljubičastu boju i maksimum apsorpcije na 517 nm. U reakciji DPPH radikala sa antioksidantom, dolazi do promene njegove boje iz ljubičaste u svetlo žutu.

Test je urađen po protokolu opisanom od strane Brand-Williams i sar. (1995) uz male modifikacije. Reagens je pripremljen rastvaranjem 7,8 mg praha DPPH u 100 mL metanola nakon čega je u epruvete dodavano 790 μ L metanola, 10 μ L test supstance odgovarajuće koncentracije i 200 μ L DPPH reagensa. Kontrola se sastojala od 800 μ L metanola i 200 μ L DPPH reagensa. Ovako pripremljene epruvete su inkubirane 30 min, u mraku, na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije, izmerena je apsorbanca na 517 nm na spektrofotometru (UV-6300 PC spectrophotometer, MRC Scientific instruments, Holon, Israel). Testirana koncentracija ekstrakta se kretala u opsegu od 3,125 – 400 μ g/mL, dok se opseg koncentracija emodina kretao između 1,56 μ g/mL i 100 μ g/mL. Kao pozitivna kontrola, u testu je korišćena askorbinska kiselina u koncentracijama od 0,31 μ g/mL – 10 μ g/mL. Procenat inhibicije DPPH radikala I (%) izračunat je prema sledećoj formuli:

$$I(\%) = 100 * \frac{A_k - A_u}{A_k}$$

gde A_k predstavlja vrednost apsorbance u kontroli, a A_u apsorbance u uzorku.

Određena je i EC_{50} vrednost, odnosno efektivna koncentracija test supstance koja ima sposobnost da inhibira 50% DPPH radikala.

3.2.3.2. Inhibicija lipidne peroksidacije (TBA test)

Kako bi se ispitaio efekat ekstrakta i emodina na inhibiciju procesa lipidne peroksidacije (LP) primenjen je TBA test prema protokolu Mitić-Ćulafić i sar. (2009). Tokom procesa lipidne peroksidacije dolazi do stvaranja produkata, a jedan od njih je malondialdehid (MDA), sposoban da gradi adukte sa molekulom DNK, narušavajući njegovu strukturu. MDA u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) ima sposobnost da daje obojeni produkt što se koristi kao marker u TBA testu. Za potrebe testa, korišćeni su komercijalni lipozomi (L- α -fosfaditilholin) kao model ćelijske membrane bogat nezasićenim masnim kiselinama. Za pokretanje procesa LP, epruvete su sadržale 10 μ L ekstrakta odgovarajuće koncentracije (ekstrakt je testiran u opsegu koncentracija 9 μ g/mL – 300 μ g/mL, dok je emodin testiran u opsegu 0,31 μ g/mL – 10 μ g/mL), 60 μ L lipozoma, 20 μ L 0,01 M $FeSO_4$, 20 μ L 0,01M vitamina C i 2,89 mL 0,067 M pufera i inkubirane na 37 °C, 1h. Postavljena je i serija epruveta, takozvane „korekcije“, koje su sadržale sve komponente osim lipozoma zamenjenih sa 60 μ L pufera. U kontrolne epruvete je umesto ekstrakta dodato 10 μ L odgovarajućeg rastvarača. Za pozitivnu kontrolu uzet je veštački antioksidant butil hidroksitoluen (BHT), testiran u istom opsegu koncentracija kao ekstrakt. Kako bi se zaustavio proces LP, u epruvete je dodavano 2 mL TBA reagensa i 0,2 mL 0,1 M EDTA, nakon čega su epruvete inkubirane u vodenom kupatilu na 100 °C, 15 minuta. Rastvor je ohlađen, a proteini uklonjeni centrifugiranjem na 4000 rpm, 10 min. Inhibicija LP je određena merenjem apsorbance dobijenog obojenog produkta na 532 nm (UV-6300 PC spectrophotometer, MRC Scientific instruments, Holon, Israel) i preračunavanjem prema sledećoj formuli:

$$I(\%) = \left(1 - \frac{(A_u - A_{kr})}{A_k}\right) * 100$$

gde je A_u srednja vrednost absorbanci uzorka, A_{kr} srednja vrednost absorbanci korekcija i A_k srednja vrednost absorbanci kontrole.

3.2.4. Ispitivanje bioloških aktivnosti na prokariotskim test sistemima

3.2.4.1. Održavanje i priprema bakterijskih kultura za rad

Svi bakterijski sojevi su čuvani u LB medijumu sa dodatkom 20 % glicerola, na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Čiste kulture sojeva održavane su na LA podlogama, na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i presejavane u određenim vremenskim intervalima. Prekonočne kulture zasejavane su u tečni LB medijum i inkubirane 18-24h, na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

3.2.4.2.1. Određivanje minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija – MIK test

Prekonočnim bakterijskim kulturama je izmerena optička gustina ($OD_{600\text{nm}}$) na spektrofotometru (UV-6300 PC spectrophotometer, MRC Scientific instruments, Holon, Israel), nakon čega su rablažene do željene optičke gustine (u $0,01\text{ M MgSO}_4$) određene na osnovu prethodno definisanih kalibracionih kriva (Kolarević i sar., 2016). Željena optička gustina iznosila je 0,3 što odgovara 1×10^8 ćel/mL.

MIK test se zasniva na pravljenju serije dvostrukih razblaženja test supstanci u mikrotitar pločama sa 96 bunara. Osim kolona sa test supstancama, mikrotitar ploča je sadržala i kontrolu sterilnosti (blank), kontrolu bakterijskog rasta (negativnu kontrolu), pozitivnu kontrolu (vankomicin testiran u opsegu koncentracija od $0,156 - 20\text{ }\mu\text{g/mL}$) i gradijent kontrole rastvarača. U kolonama sa test supstancama, pozitivnom kontrolom i kontrolom rastvarača napravljen je gradijent koncentracija, nakon čega su bunari cele ploče dopunjeni sa MHB medijumom i $20\text{ }\mu\text{L}$ bakterijske suspenzije (finalna koncentracija 10^5 ćel/bunaru) do zapremine od $200\text{ }\mu\text{L}$. Ploče su potom inkubirane 24 h, na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ekstrakt FA je testiran u opsegu koncentracija $0,0156 - 2\text{ mg/mL}$, dok je emodin testiran u opsegu od $1,56\text{ }\mu\text{g/mL}$ do $200\text{ }\mu\text{g/mL}$.

3.2.4.2.1.1. Dinamika preživljavanja sojeva u prisustvu FA ekstrakta/emodina

Po isteku inkubacije mikrotitar ploča, očitana je apsorbancija na 600 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (Multiscan FC, Thermo Scientific, Šangaj, Kina).

3.2.4.2.1.2. Određivanje MIK vrednosti preko metaboličke aktivnosti ćelija

Nakon očitavanja optičke gustine, u mikrotitar ploče je dodato $22\text{ }\mu\text{L}$ resazurina, koncentracije $675\text{ }\mu\text{g/mL}$. Ploče su potom inkubirane 3 h na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i očitana je MIK vrednost. Resazurin je plava, nefluorescentna boja koja se pod dejstvom oksidoreduktaza živih ćelija redukuje do svoje fluorescentne forme – rezorufina (jedinjenja roze boje). Upravo prelazak resazurina u fluorescentnu formu predstavlja indikator rasta. MIK vrednost predstavlja najnižu koncentraciju test supstanci na kojoj nije došlo do vidljive promene boje.

3.2.4.2.1.3. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije

Kako bi se utvrdilo da li test supstance imaju baktericidni efekat, određena je minimalna baktericidna koncentracija (MBK) odnosno najniža koncentracija pri kojoj je ubijeno 99,9 % bakterijskih ćelija. Sterilnom ezom je iz bunara mikrotitar ploče, u kojima nije bilo rasta, zasejan

uzorak na MHA podlogu. Nakon inkubacije od 24 h, na 37 °C praćeno je prisustvo, odnosno odsustvo rasta. Najniža koncentracija na kojoj nije bilo vidljivog rasta oznaćena je kao MBK.

3.2.4.2.2. Ispitivanje kombinovanog efekta test supstanci i vankomicina primenom metode šahovske table (eng. checkerboard assay)

Metoda šahovske table predstavlja dvodimenzionalnu mikrodilucionu metodu kojom je moguće utvrditi tip interakcije između test supstanci. Eksperiment je raćen u mikrotitar ploći sa 96 bunara u zapremini od 200 µL pri ćemu je gradijent test supstanci pravljjen u dva pravca – vertikalno i horizontalno. Vertikalna serija razblaženja (antibiotik) je pravljena u samoj ploći, dok je horizontalna (ekstrakt/emodin) pripremana u ependorficama i naknadno dodata bunarima. Test supstance su ispitivane u opsegu koncentracija 1/32×MIK – 4×MIK, a ploća je punjena prema shemi datoj na Slici 11.

				Gradijent ekstrakt/emodin →								Gradijent antibiotika →	
Kontrola	Blank	Vankomicin	Ekstrakt/emodin	Kontrola rastvaraća									
								4×MIK	4×MIK	4×MIK	4×MIK	4×MIK	4×MIK
				4×MIK	2×MIK	MIK	1/2×MIK	1/4×MIK	1/8×MIK	1/16×MIK	1/32×MIK		
				2×MIK	2×MIK	2×MIK	2×MIK	2×MIK	2×MIK	2×MIK	2×MIK	2×MIK	
				4×MIK	2×MIK	MIK	1/2×MIK	1/4×MIK	1/8×MIK	1/16×MIK	1/32×MIK		
				MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	
				4×MIK	2×MIK	MIK	1/2×MIK	1/4×MIK	1/8×MIK	1/16×MIK	1/32×MIK		
				1/2×MIK	1/2×MIK	1/2×MIK	1/2×MIK	1/2×MIK	1/2×MIK	1/2×MIK	1/2×MIK	1/2×MIK	
				4×MIK	2×MIK	MIK	1/2×MIK	1/4×MIK	1/8×MIK	1/16×MIK	1/32×MIK		
				1/4×MIK	1/4×MIK	1/4×MIK	1/4×MIK	1/4×MIK	1/4×MIK	1/4×MIK	1/4×MIK	1/4×MIK	
				4×MIK	2×MIK	MIK	1/2×MIK	1/4×MIK	1/8×MIK	1/16×MIK	1/32×MIK		
				1/8×MIK	1/8×MIK	1/8×MIK	1/8×MIK	1/8×MIK	1/8×MIK	1/8×MIK	1/8×MIK	1/8×MIK	
				4×MIK	2×MIK	MIK	1/2×MIK	1/4×MIK	1/8×MIK	1/16×MIK	1/32×MIK		
				1/16×MIK	1/16×MIK	1/16×MIK	1/16×MIK	1/16×MIK	1/16×MIK	1/16×MIK	1/16×MIK	1/16×MIK	
				4×MIK	2×MIK	MIK	1/2×MIK	1/4×MIK	1/8×MIK	1/16×MIK	1/32×MIK		
				1/32×MIK	1/32×MIK	1/32×MIK	1/32×MIK	1/32×MIK	1/32×MIK	1/32×MIK	1/32×MIK	1/32×MIK	
				4×MIK	2×MIK	MIK	1/2×MIK	1/4×MIK	1/8×MIK	1/16×MIK	1/32×MIK		

Slika 11. Shema za punjenje mikrotitar ploće

Ploće su sadržale i kontrolu sterilnosti, kontrolu rasta, kontrolu rastvaraća kao i gradijent pojedinaćnih supstanci. U sve bunare je dodato 20 µL bakterijske suspenzije (finalna koncentracija 10⁵ ćel/bunaru) kako bi zapremina po bunaru bila 200 µL. Ploće su inkubirane 24 h na 37 °C nakon ćega je u celu ploću dodato 22 µL resazurina. Nakon inkubacije od 3 h na 37 °C praćena je metabolićka aktivnost ćelija i traćene su kombinacije test supstanci koje nisu dovele do promene boje resazurina. Za odabrane kombinacije izraćunata je FICI (indeks frakcione inhibitorne koncentracije) vrednost prema sledećoj formuli:

$$FICI = \left(\frac{MIC_{ak}}{MIC_a} \right) + \left(\frac{MIC_{bk}}{MIC_b} \right)$$

pri ćemu MIC_{ak} predstavlja koncentraciju prve supstance kojom je dostignuta MIK vrednost u kombinaciji, MIC_a – minimalnu inhibitornu koncentraciju prve supstance pojedinaćno, MIC_{bk} – koncentraciju druge supstance kojom je dostignuta MIK vrednost u kombinaciji i MIC_b – minimalnu inhibitornu koncentraciju druge supstance pojedinaćno. Izraćunate FICI vrednosti su uporećene sa vrednostima datim u Tabeli 5, te je odrećen tip interakcije između test supstanci.

Tabela 5. FICI vrednosti i tipovi interakcija test supstanci

FICI vrednost	Tip interakcije
$FICI \leq 0,5$	sinergizam
$0,5 < FICI \leq 1,5$	aditivni efekat
$1,5 < FICI \leq 4$	indiferentan efekat
$FICI > 4$	antagonizam

3.2.4.3. Ispitivanje *antibiofilm* aktivnosti

3.2.4.3.1. Efekat na sprečavanje formiranja biofilma

Prekonočne bakterijske kulture su razblažene kao što je opisano u odeljku 3.2.4.2.1, a eksperiment je rađen u mikrotitar pločama sa 96 bunara sa ravnim dnom. MHB medijum je obogaćen glukozom u finalnoj koncentraciji 0,5 %. U prvi red bunara dodati su medijum i test supstanca u željenoj koncentraciji ($1/64 \times \text{MIK} - \text{MIK}$), napravljena su serijska razblaženja, nakon čega su svi bunari dopunjeni do zapremine od 200 μL bakterijskom suspenzijom (finalno 2×10^5 ćel/bunaru). Svaka test supstanca postavljena je u heksaplikatu. Dodatno, ploče su sadržale i kontrolu netretiranih bakterija i kontrolu sterilnosti. Ploče su potom inkubirane 24 h, na 37 °C. Kvantifikacija biomase biofilma urađena je bojenjem kristal violetom po protokolu Stepanović i sar. (2000) uz male modifikacije.

3.2.4.3.1.1. Određivanje ukupne biomase biofilмова bojenjem kristal violetom

Bojenje biomase biofilma kristal violetom predstavlja standardnu metodu za kvantifikaciju bakterijskih biofilмова. Kristal violet je boja koja se vezuje za negativno naelektrisane površinske molekule, polisaharide ekstracelularnog matriksa i ekstracelularnu DNK te samim tim neselektivno boji i žive i mrtve ćelije u biofilmu, kao i ekstracelularni matriks.

Po isteku inkubacije, iz ploča je pažljivo izvučen medijum, bunari su isprani destilovanom vodom, a nakon sušenja dodato je 200 μL 0,1% kristal violeta. Ploče su potom inkubirane na sobnoj temperaturi 15 min i isprane vodom kako bi se uklonio višak boje. Kada su osušene, u ploče je dodato 150 μL apsolutnog etanola kako bi rastvorio vezani kristal violet. Absorbanca rastvorenog kristal violeta je izmerena na čitaču mikrotitarskih ploča (Multiscan FC, Thermo Scientific, Šangaj, Kina) na talasnoj dužini od 570 nm.

3.2.4.3.2. Efekat na već formirani biofilm

Eksperiment je rađen u mikrotitar pločama sa 96 bunara sa ravnim dnom u zapremini od 200 μL . Prvog dana eksperimenta, u ploče je dodato 200 μL bakterijske suspenzije u finalnoj koncentraciji 2×10^5 ćel/bunaru u MHB medijumu sa 0,5 % glukoze. Nakon inkubacije od 24 h, na 37 °C medijum sa planktonskim bakterijama je uklonjen, dodat je svež sa dodatkom test supstanci u opsegu koncentracija $1/2 \times \text{MIK} - 4 \times \text{MIK}$ i nastavljena je inkubacija narednih 24 h. Sledećeg dana, uklonjen je medijum, ploče su isprane vodom i biomasa je kvantifikovana kao što je opisano u odeljku 3.2.6.3.1.1.

3.2.4.3.3. Ekstrakcija ekstracelularnih polisaharida (EPS) iz bakterijskog biofilma

Kako bi se ekstrahovali ekstracelularni polisaharidi bakterijskog biofilma, 1 mL bakterijske suspenzije (10^6 ćel/mL) u MHB medijumu (0,5 % glukoza) je zasejano u ploče sa 12 bunara i inkubirano 24 h, na 37 °C. Sledećeg dana, medijum je zamenjen novim sa dodatkom tretmana u koncentraciji $4 \times \text{MIK}$ i nastavljena je inkubacija još 24 h. Narednog dana, uklonjen je medijum, dodat je 1 mL destilovane vode i biofilm je oguljen sa dna bunara. Dobijena masa je prebačena u ependorfice i centrifugirana 10 min na 12 000 rpm. Supernatant je prebačen u nove epruvete za centrifugiranje, a preostala masa još jednom centrifugirana i ponovo je sakupljen supernatant. Na ovaj način odvojeni su glukani rastvorni u vodi. Potom dobijeni talog je resuspendovan u 1 mL 0,1 M NaOH i centrifugiran kako bi se ekstrahovali glukani nerastvorni u vodi, a supernatant odvojen u nove epruvete za centrifugiranje. U sve epruvete sa supernatantom dodato je 3 zapremine ledeno hladnog 96% EtOH i inkubirane su na 4 °C, tokom 24 h kako bi se glukani istaložili. Narednog

dana, epruvete su centrifugirane 10 min, na 5000 rpm, a dobijeni talog resuspendovan u 2 mL dH₂O.

3.2.4.3.3.1. Kvantifikacija dobijenog EPS

Za kvantifikaciju EPS-a u epruvete je dodat uzorak (EPS), koncentrovana H₂SO₄ i ohlađeni 5% vodeni rastvor fenola u zapreminskom odnosu 1:5:1. Epruvete su potom inkubirane 5 min, na 90 °C u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja, izmerena je apsorbancija na 492 nm.

3.2.4.3.4. Izolacija ekstracelularne DNK (eDNK) iz bakterijskog biofilma

Eksperiment je postavljen po opisanom protokolu u odeljku 3.2.4.3.3. Biofilmovi su takođe tretirani koncentracijama 4×MIK, a nakon inkubacije zguljeni su sa 100 µL 1×PBS. Masa je prebačena u ependorfice u koje je dodata proteinaza K u finalnoj koncentraciji 5 µg/mL i inkubirane su 2 h, na 37 °C. Po isteku inkubacije, ependorfice su centrifugirane na 12 000 rpm, 10 min i supernatant je prebačen u novu ependorficu. eDNK je ekstrahovana etanolnom precipitacijom dodavanjem 2,5 volumena 100% EtOH i 1/10 volumena 3M Na-acetata i centrifugiranjem. Dobijeni supernatant je uklonjen, ependorfice osušene na sobnoj temperaturi, a talog resuspendovan u 15 µL TE pufera. Ekstrahovana eDNK je vizuelizovana i kvantifikovana.

3.2.4.3.4.1. Vizuelizacija i kvantifikacija eDNK

Nakon etanolne ekstrakcije, uzorci su analizirani horizontalnom gel elektroforezom, na 1% agaroznom gelu u 0,5×TBE puferu, 1h i 30 minuta na 90V, 300 mA. Agarozni gel je vizuelizovan na UV transiluminatoru (2011 MACROVUE, LKB Bromma, Sweden), a koncentracija eDNK određena je spektrofotometrijski na BioSpec-nano (Schimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

3.2.4.3.5. Izolacija ćelija perzistera iz bakterijskih biofilмова

Da bi se ispratio efekat test supstanci na brojnost ćelija perzistera u biofilmu, biofilmovi su postavljeni po protokolu iz odeljka 3.2.4.3.3. U ovom eksperimentu, za tretman su korišćene koncentracije test supstanci 100×MIK. Biofilm je sa dna bunara skinut dodavanjem 500 µL 1×PBS-a i guljenjem mase. Zguljena masa je prebačena u ependorfice koje su potom centrifugirane na 12 000 rpm, 5 min. Uklonjen je supernatant, a dobijeni talog resuspendovan u 500 µL 1×PBS. Od suspenzije su napravljena serijska razblaženja i po 100 µL željenog razblaženja je utrljano na čvrstu LA podlogu, u duplikatu i inkubirano 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, prebrojane su kolonije i izračunat je broj ćelija/mL. Broj perzistera iz tretiranog biofilma je poređen sa brojem ćelija iz netretiranog biofilma.

3.2.4.3.6. Ekstrakcija karotenoidnog pigmenta stafiloksantina

Prekonočne kulture bakterija su razblažene do 10⁸ ćel/mL i 100 µL inokuluma utrljano je na čvrstu TSA podlogu koja je sadržala 1/2×MIC test supstanci, kao i na podloge bez tretmana. Podloge su inkubirane tri dana na 37 °C, potom dva dana na 20 °C i praćena je pojava pigmenta odnosno prisustvo ili odsustvo žute/narandžaste boje. Nakon inkubacije, sve kolonije su ezom skinute i resuspendovane u 1 mL destilovane vode, a potom su površine agra dodatno isprane sa 2 mL dH₂O koja je dodata prethodno resuspendovanim kolonijama. Epruvete su centrifugirane 15 minuta na 5000 rpm, odliven je supernatant, a talog resuspendovan u novih 1 mL dH₂O i centrifugiranje je ponovljeno. Talog koji je dobijen je resuspendovan u 3 mL metanola i epruveta je zagrevana 5 min, na 55 °C. Ohlađene epruvete su ponovo centrifugirane 15 min, na 5000 rpm. Za supernatant (ekstrahovana smeša karotenoida) izmeren je apsorpcioni spektar u opsegu talasnih

dužina od 300 – 600 nm na spektrofotometru (UV-1280, Shimadzu, Japan). Poznato je da je maksimum apsorpcije stafiloksantina na 460 nm.

3.2.4.3.7. Mikroskopska analiza efekta ekstrakta i emodina na biofilmove

3.2.4.3.7.1. Priprema preparata za mikroskopiranje

Uzorci su pripremljeni dodavanjem 1 mL bakterijske suspenzije (10^6 ćel/mL) u MHB medijumu sa dodatkom 0,5 % glukoze, u ploče sa 6 bunara na čije dno su postavljena sterilna pokrovna stakla. Po isteku inkubacije od 24 h na 37 °C, medijum je zamenjen svežim, sa dodatkom test supstanci u koncentracijama 4×MIK. Narednog dana, pokrovna stakla su izvađena iz bunara, isprana sa 1×PBS i osušena na vazduhu. Ovako pripremljeni preparati su korišćeni za dalju analizu.

3.2.4.3.7.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. *Scanning Electron Microscopy*) – SEM

Uzorci su za skenirajuću elektronsku mikroskopiju zalepljeni na dvostranu provodnu ugljeničnu pločicu i presvučeni zlatom (debljina 15-20 nm) koristeći aparat BALTEC-SCD-005. Morfološka analiza biofilma izvršena je na elektronskom mikroskopu, model JEOL JSM-6610LV opremljenim sa EDS, Oxford X-Max disperzivnim spektrofotometrom. Proces se odvijao pod visokim vakuumom, sa naponom ubrzanja od 20 kV.

3.2.4.3.7.3. Mikroskopija atomskih sila (eng. *Atomic Force Microscopy*) – AFM

Efekat supstanci na morfologiju, strukturu i hrapavost biofilma analizirana je pomoću AFM uređaja NTEGRA Prima (NT-MDT, Moscow, Russia). Merenja su izvršena primenom tapkajućeg AFM režima za koji su korišćene NT-MDT NSGO1 gređice izrađene od silicijuma n-tipa sa nanetim refluktujućim slojem od zlata. Nominalna konstanta sile mernih gređica je iznosila 5,1 N/m dok je radna frekvencija tokom samih merenja iznosila 150 kHz. AFM mikrografije su analizirane i obrađene u softveru Image Analysis 2.2.0 (NT-MDT) za tretmane emodinom i u Gwyddion 2,60 (Free and Open Source software, Department of Nanometrology, Czech Metrology Institute) za tretmane FA ekstraktom.

3.2.4.4. Praćenje aerobne respiracije bakterija

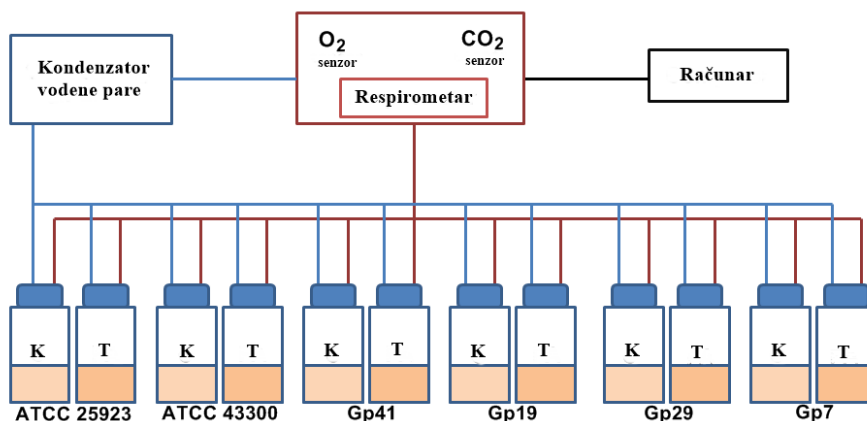
Efekat ekstrakta i emodina na aerobnu bakterijsku respiraciju praćen je kroz zatvoreni 12-kanalni sistem Micro-Oxymax respirometra (Columbus Instruments, USA) povezanog sa računarnom (Slika 12). Kroz zatvoreni sistem praćena je kumulativna potrošnja kiseonika (O_2) preko paramagnetnog senzora i kumulativna produkcija ugljen-dioksida (CO_2) preko infracrvenog senzora. Sam eksperiment je izvođen u Micro-Oxymax nepropusnim staklenim bocama od 500 mL koje su prethodno sterilisane u autoklavu. Početna koncentracija gasova je izražena kao nula, a kumulativna potrošnja O_2 i produkcija CO_2 su izražavane u odnosu na nju.



Slika 12. Micro-Oxymax respirometar

3.2.4.4.1. Praćenje aerobne respiracije u planktonskom obliku

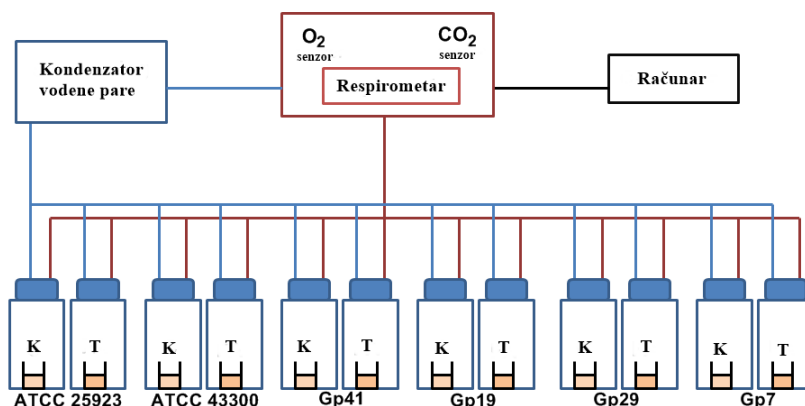
Za praćenje efekta test supstanci na respiraciju u planktonskom obliku, u boce je dodavano 100 mL MHB medijuma sa dodatkom 0,5% glukoze i bakterijskom suspenzijom u finalnoj koncentraciji 10^4 ćel/mL. Bakterije su tretirane subinhibitornim koncentracijama test supstanci ($1/2 \times \text{MIK}$), dok su u slučaju praćenja kombinovanog efekta test supstanci i vankomicina korišćene koncentracije odabrane u checkerboard testu kako kombinacija tako i pojedinačnih test supstanci. Koncentracija gasova je merena tokom 24 h, u intervalu od 2 h. Shematski prikaz postavke eksperimenta je prikazan na slici 13.



Slika 13. Shematski prikaz postavke eksperimenta za praćenje efekta test supstanci na aerobnu respiraciju bakterija u planktonskom obliku. K – netretirani uzorci; T – tretirani uzorci

3.2.4.4.2. Praćenje aerobne respiracije u bakterijskom biofilmu

Kako bi se ispratio efekat test supstanci i njihovih kombinacija na respiraciju bakterija u formiranom biofilmu, u boce su postavljene sterilne plastične posude zapremine 50 mL koje su sadržale 30 mL MHB medijuma sa dodatkom 0,5% glukoze i bakterijsku suspenziju (10^6 ćel/mL). Ovako postavljene boce su inkubirane 24 h kako bi se formirao biofilm. Narednog dana, medijum sa planktonskim bakterijama je pažljivo izvučen i zamenjen novim sa tretmanom. Biofilmovi su tretirani sa $4 \times \text{MIK}$ test supstanci, a u slučaju kombinovanog efekta koncentracijama odabranim u checkerboard testu kako kombinacija tako i pojedinačnih test supstanci. Koncentracija gasova je merena tokom 48 h, u intervalima od 2h i 4h. Shematski prikaz postavke eksperimenta dat je na slici 14.



Slika 14. Shematski prikaz postavke eksperimenta za praćenje efekta test supstanci na aerobnu respiraciju bakterija u planktonskom obliku. K – netretirani uzorci; T – tretirani uzorci

3.2.4.5. Molekularne analize

3.2.4.5.1. Ekstrakcija genomske DNK bakterija

Sa petri šolja na kojima su gajene bakterije, ezom je zahvaćena što veća količina bakterijskih kolonija i ekstrakcija je izvršena kitom Quick-DNA Fungal/Bactericidal DNA Miniprep Kit (Zymoresearch, SAD) prema protokolu proizvođača.

3.2.4.5.2. Umnožavanje fragmenata DNK PCR metodom

Kako bi se utvrdilo prisustvo odabranih gena (*icaA*, *icaD*, *srrA*, *srrB* i *rpO*) primenjena je metoda amplifikacije DNK fragmenata (PCR). PCR reakciona smeša (ukupne zapremine 25 μ L) je sadržala komponente ($MgCl_2$, dNTP smeša, Taq polimeraza) iz kita FastGene TAQ PCR Kit (Nippon Genetics, Europe), prajmere (Tabela 3) i 1 μ g genomske DNK. Uslovi pod kojima se odvijala reakcija bili su: inicijalna denaturacija u trajanju od 5 min na 94 °C koja je praćena sa 35 ciklusa denaturacije na 94 °C 1 min, vezivanja prajmera na 56 °C 1 min, elongacije na 72 °C 1 min i finalne elongacije na 72 °C 10 min (Kot i sar., 2018).

3.2.4.5.3. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza izolovane DNK kao i amplifikovanih DNK fragmenata urađena je horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznom gelu u 0,5 \times TBE puferu u trajanju od 1h i 30 min, na 90V, 300 mA. Gel je pripreman otapanjem agaroze u 0,5 \times TBE puferu uz dodavanje etidijumbromida (0,5 μ g/mL). U bunariće gela nanošeno je 5 μ L uzorka pomešanih sa 1,5 μ L 0,25 % bromfenol plavog. Za procenu veličine amplifikovanih fragmenata, na gel je nanošen i standardni marker od 50bp (DNA Ladder, Nippon Genetics, Europe GmbH). Gelovi su po završenoj elektroforezi vizuelizovani na UV transiluminatoru (2011 MACROVUE, LKB Bromma, Sweden).

3.2.4.5.4. Praćenje ekspresije odabranih gena u bakterijskim biofilmovima primenom kvantitativne RT-PCR metode (qRT-PCR)

3.2.4.5.4.1. Ekstrakcija RNK iz biofilmova i njeno prevođenje u cDNK

Za potrebe eksperimenta, 1 mL bakterijske suspenzije (10^6 ćel/mL) u MHB medijumu sa dodatkom 0,5% glukoze je dodato u ploče sa 6 bunara. U cilju formiranja biofilma, ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, medijum je uklonjen i zamenjen svežim koji je sadržao ekstrakt/emodin u koncentraciji 4 \times MIK. Sledećeg dana, medijum je uklonjen, ploče isprane sa 1 \times PBS, a ukupna RNK ekstrahovana trizolom (Invitrogen Life Technologies TM, Carlsbad, CA, SAD). U svaki bunar je dodato 500 μ L trizola, biofilm je zguljen nastavkom i prenet u ependorfice. Nakon vorteksovanja, ependorfice su inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi i dodato im je 100 μ L hloroforma. Ependorfice su mućkane i inkubirane 2-3 min na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirane 15 min na 12000 rpm, na 4 °C. Gornja, bistra faza koja se izdvojila, prenet je u nove tubice kojima je dodato 250 μ L izopropanola, što je ispraćeno vorteksovanjem i inkubacijom od 10 min, na sobnoj temperaturi. Tubice su centrifugirane 10 min, na 12000 rpm, supernatant je pažljivo uklonjen, talogu je dodato 500 μ L 75% EtOH i ponovo su centrifugirane 5 min, na 7500 rpm. Supernatant je uklonjen i proces je ponovljen, nakon čega su tubice sušene na vazduhu. Talog je resuspendovan u 15 μ L PCR vode, inkubiran 5 min, na 60 °C. Podaci o čistoći ekstrahovane RNK dobijeni su merenjem apsorbanci na 260 nm, kao i odnosom apsorbanci 260/280 i 260/230 (BioSec-nano, Shimadzu Corporation, Kjoto, Japan).

Reverzna transkripcija dobijene RNK u cDNK izvršena je u 20 μ L zapremine sa 2 μ g RNK, pomoću kita Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, SAD).

Reakcija je izvršena inkubacijom reakcione smeše u Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) pri sledećim uslovima: 10 min 25 °C, 15 min 50 °C i 5 min na 85 °C.

3.2.4.5.4.2. Kvantitativni qRT-PCR

Ekspresija odabranih gena (*icaA*, *icaD*, *srrA*, *srrB*) kao i mikro RNK – RNA III, pod tretmanom ekstraktom/emodinom kvantifikovana je qRT-PCR metodom na Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Nemačka). Svaka reakciona smeša je imala zapreminu od 12,5 µL i sadržala je cDNA (30 ng), 500 nM prajmera (Tabela3) i master miks (Power SYBR Green PCR Master Mix reagent). Uslovi pod kojim je reakcija izvođena bili su: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 40 ciklusa na 95 °C 15 s i 60 °C tokom 1 min. Kao endogena kontrola u odnosu na koju su normalizovani dobijeni rezultati, korišćena je ekspresija *rpO* gena (eng. *housekeeping gene*). Relativna ekspresija gena izračunata je na osnovu vrednosti praga ciklusa (eng. *cycle threshold*, Ct) prema načinu koji su opisali Tenji i sar. (2020).

3.2.5. Ispitivanje biološke aktivnosti na ćelijskim kulturama

3.2.5.1. Čuvanje i zamrzavanje ćelijskih kultura

Korišćene ćelijske linije čuvane su zamrznute na -196 °C u 10% DMSO/FCS, u tečnom azotu. Ovo omogućava čuvanje i održavanje vijabilnosti ćelija skoro neograničeno. Takođe, ćelijske linije je moguće čuvati i određen vremenski period (do 6 meseci) na -80 °C u Deep Freez-u.

Ćelije su gajene u odgovarajućim uslovima na malim (25 cm²) ili srednjim (75 cm²) flaskovima u inkubatoru (Binder, Holandija) uz 100 % vlažnosti, na 37 °C, sa 5 % zasićenosti CO₂. Pri konfluentnosti kulture od 80% ćelije su tripsinizovane i zamrznute (broj zamrznutih ćelija je iznosio 5×10⁶/mL). Zamrzavanje je teklo postepeno, kriotube su prvo hladene u frižideru na 4 °C, zatim prebačene na -20 °C i na kraju na -80 °C ili u tečni azot.

3.2.5.2. Oživljavanje zamrznutih ćelijskih kultura i njihovo gajenje

Kriotube sa zamrznutim ćelijama su otopljene, a sadržaj prebačen u epruvete za centrifugiranje sa 3 mL odgovarajućeg medijuma i centrifugirano je 10 minuta na 1000 rpm. Dobijeni supernatant je uklonjen, a ćelije su resuspendovane u 1 mL medijuma. Sadržaj epruvete je prebačen u mali flask (25cm²) i ćelije su gajene do pojave monosloja. Ćelijama je, po potrebi, menjan medijum i ispirane su 1×PBS-om. Po dostizanju 80 % konfluentnosti (utvrđeno posmatranjem na invertnom svetlosnom mikroskopu (Boeko, Nemačka), ćelije su pripremane za tripsinizaciju i dalje presejavanje.

3.2.5.3. Tripsinizacija ćelija

Tripsinizacija ćelija je obuhvatala uklanjanje medijuma iz flaskova i ispiranje sa 1×PBS-om, nakon čega je dodavana određena količina 0,1 % rastvora tripsina. Flaskovi su inkubirani 2-3 min, na 37 °C nakon čega su ravnomerno lupkani kako bi se ćelije odlepile. Reakcija tripsinizacije je zaustavljena dodavanjem duplo veće zapremine medijuma, sadržaj je sakupljen u epruvete koje su potom centrifugirane 10 min na 1000 rpm. Supernatant je uklonjen, a talog je resuspendovan u 1-2 mL odgovarajućeg medijuma. U zavisnosti od potreba, ćelije su prebacivane na nove flaskove ili korišćene za eksperimente.

3.2.5.4. Procena broja i vijabilnosti ćelija

Kako bi se odredio broj ćelija, korišćen je hemocitometar (Bürker komora) i 0,4 % rastvor tripan plavog. Tripan plavo je boja koja ne prolazi kroz ćelijsku membranu, te su žive ćelije

nebojene, dok mrtve primaju plavu boju. Hemocitometar se sastoji iz dve komore podeljene na 9 velikih kvadrata, a svaki od njih je dalje podeljen na 16 manjih. Broj i vijabilnost ćelija su određivani mešanjem 10 μL ćelijske suspenzije i 20 μL tripan plavog, a broj ćelija je izračunat prema formuli:

$$\text{Broj ćelija/mL} = \text{broj ćelija u 4 vidna polja} \times 4 \times 3 \times 10^4.$$

Broj ćelija u 4 vidna polja pomnožen je sa 4 zbog broja kvadratića na hemocitometru (16). Kako je suspenzija ćelija pomešana sa bojom u odnosu 1:2, množi se sa 3, a usled toga što u polje sa 16 kvadratića staje 0,1 mm^3 , tj. 10^{-4} , množi se sa 10^4 .

3.2.5.5. *Određivanje citotoksičnosti supstanci primenom MTT testa*

Za određivanje citotoksičnog potencijala ekstrakta krušine i emodina primenjen je MTT test, kolorimetrijska metoda za procenu metaboličke aktivnosti ćelija. MTT (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid) je žuta tetrazolijum boja koja se rastvara u vodi. Ova boja se u metabolički aktivnim ćelijama, pod dejstvom mitohondrijskih reduktaza redukuje do ljubičastih kristala formazana, nerastvornih u vodi. Za rastvaranje kristala primenjuju se odgovarajući rastvarači, najčešće DMSO, a rezultati se očitavaju spektrofotometrijski. Intenzitet boje je proporcionalan broju metabolički aktivnih ćelija.

Nakon tripsinizacije i određivanja broja ćelija, u mikrotitar ploče sa 96 bunarića sa ravnim dnom, zasejano je 2×10^4 ćelija po bunariću. Ploče su inkubirane 24 h, na 37 °C, u prisustvu 5 % CO_2 kako bi se formirao monosloj. Sledećeg dana, medijum je uklonjen iz bunarića, ćelije su isprane PBS-om, dodat je svež medijum sa test supstancama u odgovarajućim koncentracijama i ploče su ostavljene na dalju inkubaciju od 24 h. Svaka ploča sadržala je bunariće sa test supstancama, sa kontrolom rastvarača gde je bilo potrebe (2 % DMSO), sa kontrolom rasta ćelija i kontrolom sterilnosti. Nakon inkubacije, u bunare je dodat rastvor MTT boje (20 μL rastvora MTT u 200 μL medijuma) i dodatna inkubacija trajala je 3 h. Po isteku inkubacije, medijum je pažljivo izvučen i formirani kristali formazana su rastvoreni dodavanjem DMSO. Apsorbanca rastvorenih kristala očitana je spektrofotometrijski (Multiscan FC, Thermo Scientific, Šangaj, Kina) na talasnoj dužini od 570 nm i izračunati su procenti preživljavanja (P) prema sledećoj formuli:

$$P(\%) = 100 * \left(\frac{OD_{570} \text{ test supstance}}{OD_{570} \text{ kontrole rastvarača}} \right)$$

Citotoksičnost je ispitana na MRC-5, HepG2 i HCT 116 ćelijskim linijama i to u opsegu koncentracija 0,0312 – 1 mg/mL za FA ekstrakt, odnosno 3,125 $\mu\text{g/mL}$ – 100 $\mu\text{g/mL}$ za emodin.

3.2.5.6. *Analiziranje efekta test supstanci na ćelijski ciklus*

Ćelije su za analizu pripremljene po protokolu Kim i Sederstrom, 2015. Za potrebe eksperimenta, 5×10^4 cel/mL je zasejano u ploče sa 24 bunara i inkubirane su naredna 24 h na 37 °C. Sledećeg dana, medijum je uklonjen i dodat svež medijum sa test supstancama u dvostruko opadajućim koncentracijama od 250 $\mu\text{g/mL}$ do 3 $\mu\text{g/mL}$ za FA ekstrakt i 50 $\mu\text{g/mL}$ do 3 $\mu\text{g/mL}$ za emodin. Po isteku inkubacije u trajanju od 24 sata, u epruvete za protočnu citometriju, sakupljen je medijum u kojem su ćelije kultivisane, a zatim su ćelije u bazenima tripsinizovane i prebačene u iste epruvete. Nakon dva ispiranja centrifugiranjem na 1800 rpm tokom 10 min sa 2mL 1xPBS, ćelije su fiksirane tako što je na talog dodavan ledeno-hladan 70 % etanol, kap po kap, uz neprestano mešanje na vorteksu. Ovako fiksirane ćelije su čuvane 2 h na -80 °C (ukoliko su korišćene istog dana za eksperiment) ili do 6 meseci. Pre analize, fiksirane ćelije su isprane sa 1xPBS dva puta, a potom resuspendovane u 500 μL 1xPBS. Ovako pripremljenim ćelijama je dodat rastvor propidijum jodida (PI) u finalnoj koncentraciji 2 $\mu\text{g/mL}$. PI je fluorescentna boja koja se vezuje za molekul DNK i omogućava razdvajanje ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Distribucija

ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (subG1, G0/G1, S i G2/M) analizirana je na protočnom citometru (BD LSRII). Rezultati procentualne zastupljenosti ćelija u subG1, G0/G1, S i G2/M prikazani su kao srednje vrednosti \pm SD, iz tri nezavisna eksperimenta.

3.2.5.7. Efekat test supstanci na apoptozu u ćelijskim linijama

Da bi se utvrdila zastupljenost apoptotičnih i nekrotičnih ćelija ćelijskih linija nakon tretmana odgovarajućim koncentracijama test supstanci, ćelije su obojene aneksin V-fluorescein-izotiocijanatom (Annexin V-FITC) i 7-amino-aktinomicinom D (7-amino-actinomycin D, 7AAD), prema uputstvima proizvođača (ThermoFisher Scientific i BioLegend, redom), a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru (BD LSRII). Aneksin V je protein mase 35-36 kDa sa visokim afinitetom vezivanja za fosfatidilserin na spoljnoj strani ćelijske membrane. 7AAD je fluorescentna boja koja difunduje u ćelije narušenog integriteta ćelijske membrane. Simultanim bojenjem sa aneksin V-FITC i 7AAD i analizom na protočnom citometru, mogu se razlikovati populacije u različitim stupnjevima bolesti i to: vijabilne ćelije (Annexin V-FITC-/7AAD-), rano apoptotične (Annexin V-FITC+/7AAD-), kasno apoptotične (Annexin V-FITC+/7AAD+) i primarno nekrotične ćelije (Annexin V-FITC-/7AAD+). Ukratko, 5×10^4 ćelija je zasejano u bazene ploča sa 24 mesta preko noći da adheriraju. Narednog dana, medijum je uklonjen i dodat svež medijum sa test supstancama u dvostruko opadajućim koncentracijama od 250 μ g/mL do 3 μ g/mL za FA i 50 μ g/mL do 3 μ g/mL za emodin. Po isteku inkubacije u trajanju od 24 sata u prisustvu test supstanci, u epruvete za protočnu citometriju sakupljen je medijum u kojem su ćelije kultivisane, a zatim su ćelije u bazenima tripsinizovane i prebačene u iste epruvete u cilju sakupljanja i živih i mrtvih ćelija. Nakon centrifugiranja 8 min na 1800 rpm, ćelije su resuspendovane u 1 mL radnog rastvora aneksin-vezujućeg pufera i ponovo isprane centrifugiranjem. Ćelijski pelet je resuspendovan u 100 μ L aneksin-vezujućeg pufera kome su dodati 10 μ L Annexin V-FITC i 5 μ L vijabilne 7-AAD boje. Nakon inkubacije (30 min na sobnoj temperaturi, u mraku), ćelije su još jednom isprane u 1 mL pufera, resuspendovane u 400 μ L pufera i odmah analizirane na protočnom citometru. Dobijeni rezultati su prikazani kao reprezentativni tačkasti dijagrami i kao srednja vrednost zastupljenosti odgovarajućih ćelijskih populacija \pm SD, iz tri nezavisna eksperimenta. Analizirano je najmanje 5000 ćelija po uzorku, a deo ćelija je bio obojen samo sa Annexin V-FITC ili 7AAD u cilju kompenzacije preliivanja signala u susedne kanale. Softver korišćen za obradu rezultata je FlowJo VX (BD Biosciences).

3.2.5.8. Mitohondrijski membranski potencijal

Kako bi se utvrdila promena mitohondrijalnog membranskog potencijala ćelija nakon tretmana odgovarajućim koncentracijama test supstanci, analiza je rađena uz pomoć JC-10, katjonske, lipofilne boje, derivata 5,5,6,6'-tetrahloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimi-dazoilkarbocianin jodid (JC-1) boje, prema uputstvu proizvođača (SigmaAldrich), a zatim analizirane na čitaču mikrotitarskih ploča (Perkin Wallac Victor 2V Multilabel Microplate Reader 1420, Boston Industries Inc). U ćelijama sa normalnim membranskim potencijalom mitohondrija, JC-10 formira reverzibilne agregate sa maksimalnim pikom emisije na 590 nm (crveni agregat), dok u uslovima narušenog membranskog potencijala, JC-10 se nalazi u formi monomera sa maksimalnom emisijom na 530 nm (zeleni monomer). U zavisnosti od statusa depolarizacije membrane mitohondrija, dolazi do promene u intenzitetima emisionog spektra zelenog monomera i crvenog agregata, što je detektovano simultanim merenjem spektara emisije. Ukratko, ćelije (2×10^4 /100 μ L) su zasejane u triplikatu, u tamne ploče sa 96 bunara sa ravnim dnom (ThermoFisher Scientific) i ostavljene preko noći u inkubatoru (37 °C) da adheriraju. Narednog dana, medijum je uklonjen i dodat svež medijum sa test supstancama (u 100 μ L po bunaru) u dvostruko opadajućim koncentracijama od 250 μ g/mL do 3 μ g/mL za FA ekstrakt i 50 μ g/mL do 1,5 μ g/mL za emodin i inkubirane naredna 24 h. Po isteku inkubacije u svaki bunar je dodato 50 μ L radnog razblaženja JC-10 boje pripremljene u

puferu A i ploče su zaštićene od svetlosti i inkubirane na 37°C još 60 min. Nakon toga, u bunare je dodato 50 µL pufera B i izmerena je fluorescencija na čitaču mikrotitarskih ploča. Rezultati merenja su prikazani kao odnos 590 nm/525nm, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja relativna vrednost promene membranskog potencijala mitohondrija u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije (100%) ±SD, iz tri nezavisna eksperimenta.

3.2.5.9. Ispitivanje genotoksičnosti primenom alkalnog komet testa

Alkalna verzija komet testa primenjena je za ispitivanje genotoksičnog potencijala ekstrakta i emodina. Komet test (eng. *Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE) je metoda koja omogućava detektovanje oštećenja DNK molekula na nivou pojedinačnih eukariotskih ćelija. Testom je moguće detektovati jednolančane i dvolančane prekide i alkalno labilna mesta (Singh i sar., 1988). Zasniva se na sposobnosti negativno naelektrisanih fragmenata DNK da putuju kroz agarozni gel (od katode ka anodi), pri čemu oštećena jedra formiraju „komete“. Neoštećena DNK zadržava svoju kompaktnu formu i ostaje u glavi komete, dok prekinuti lanci formiraju rep komete krećući se ka pozitivnoj elektrodi.

3.2.5.9.1. Priprema ćelija za ispitivanje genotoksičnosti

Ćelije su u koncentraciji 3×10^5 ćelija/mL zasejane u ploče sa 12 bunara i inkubirane (37 °C) preko noći kako bi se formirao monosloj. Narednog dana, medijum je izvučen iz bunara, ćelije su isprane 1×PBS-om i dodat je medijum sa ili bez test supstanci odgovarajuće koncentracije. Svaka ploča je sadržala bunare sa test supstancama, kontrolom rasta ćelija, kontrolom rastvarača gde je bilo potrebno (2 % DMSO) i pozitivnom kontrolom (H₂O₂, 75µM). Koncentracije su odabrane u odnosu na rezultate dobijene u MTT. Tretman test supstancama je vršen na 37 °C, u prisustvu 5% CO₂, tokom 24 h, dok je tretman H₂O₂ vršen na dan eksperimenta tokom 10 min na 4 °C. Nakon tretmana ćelije su korišćene za alkalni komet test.

Radni protokol

Priprema ćelija

Nakon tretmana, medijum je izvučen iz bunara, ćelije isprane sa 1×PBS-om i dodato je 600 µL 0,1% tripsina. Reakcija tripsinizacije je prekinuta dodatkom 600 µL odgovarajućeg medijuma, a sadržaj je prebačen u ependorfice koje su potom centrifugirane na 1000 rpm, 10 minuta. Supernatant je uklonjen, a talog resuspendovan u medijumu.

Priprema mikroskopskih pločica i fiksacija ćelija

Dan pre samog eksperimenta, pločice su dobro oprane vodom i deterdžentom i ostavljene da se osuše. Potom su pločice uronjene u 0,5% NMP, obrisane s jedne strane, obeležena je strana na kojoj je nanet prvi sloj agaroze i ostavljene da se osuše preko noći. Na dan eksperimenta, 80 µL 1 % NMP je naneto na pločice u duplikatu i prekriveno pokrovnim stakalcem. Pločice su držane u frižideru 5-10 minuta kako bi se gel stegao, a zatim su pokrovna stakalca pažljivo skinuta. Potom je 30 µL prethodno pripremljene ćelijske suspenzije pomešano sa 70 µL 1% LMP, naneto u duplikatu na pločice i prekriveno pokrovnim stakalcima. Nakon 5-10 minuta u frižideru, pokrovna stakalca su skinuta i ćelije su bile spremne za liziranje.

Proces lize ćelija

Liza ćelija je obavljena stavljanjem pločica u pufer za lizu ćelija (pH 10). Pufer dovodi do uklanjanja membrana, narušavanja citoplazme i nukleoplazme, oslobađajući DNK. Proces liziranja se odvijao u mraku na 4 °C, 1 h, nakon čega su pločice izvađene, osušene i stavljene u kadice za elektroforezu.

Denaturacija i elektroforeza

Oba procesa su obavljena u puferu za elektroforezu (pH 13), pri čemu je denaturacija trajala 20 minuta, u mraku na 4 °C, što je dovelo do raskidanja vodoničnih veza u DNK molekulu. Nakon denaturacije vršena je elektroforeza u mraku, na 4 °C pri voltaži od 25 V i struji od 300 mA, u trajanju od 20 minuta.

Neutralizacija i čuvanje pločica

Neutralizacija se odvijala u mraku na 4 °C, tokom 15 minuta, stavljanjem pločica u pufer za neutralizaciju (pH 7,5). Pločice su čuvane preko noći u vlažnoj posudi na 4 °C i analizirane narednog dana.

Vizuelizacija i kvantifikacija komete

Gelovi na mikroskopskim pločicama su bojeni fluorescentim interkalirajućim agensom akridin oranžom. Po 20 µL akridin oranža (koncentracija 2 µg/mL) je naneto na gelove i prekriveno pokrovnim stakalcem. Po 50 nasumično odabranih nukleusa (25 po gelu) je analizirano pomoću fluorescentnog mikroskopa (ekscitacioni filter 510 – 560 nm, emisioni filter 590 nm, uveličanje 400x, Leica, DMLS, Austrija) i softvera Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). Za nivo oštećenja DNK molekula, korišćen je parametar intezitet repa komete (eng. *Tail intensity*, TI) koji predstavlja procenat DNK prisutne u repu komete.

3.2.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata svih testova, osim komet testa, urađena je u softverskom programu GraphPad Prism 6.01 (Software, Inc., SAD). Podaci su podvrgnuti jednosmernoj analizi varijanse (one-way ANOVA) i to primenom Dunnet-ovog i Tukey-ovog testa. Prag statističke značajnosti je određen na $p < 0,05$, $p < 0,01$; $p < 0,001$. U slučaju komet testa, analiza je izvršena u softverskom programu Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., SAD). Kako bi se ispitala normalnost raspodele podataka urađen je Kolmogorov-Smirnov test. Kako podaci dobijeni u komet testu nemaju normalnu raspodelu, za analizu je primenjen neparametrijski Mann-Whithney U test, a pragovi statističke značajnosti su definisani na: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

4. Rezultati

4.1. Hemijska karakterizacija etil-acetatnog ekstrakta *F. alnus*

Etil-acetatni ekstrakt *F. alnus* je hemijski okarakterisan kvalitativno i kvantitativno. Kvalitativna analiza je izvršena primenom GC×GC/MS, dok je kvantitativna urađena primenom LC-MS/MS (Đukanović i sar., 2020).

4.1.1. Kvalitativna GC×GC/MS analiza

Hemijski profil etil-acetatnog ekstrakta određen je primenom GC×GC/MS analize. Lista najzastupljenijih jedinjenja na osnovu relativne zapremine svake tačke data je u Tabeli 6. Ova jedinjenja su identifikovana poređenjem sa bazom podataka i najdominantnija od njih bila su: benzoeva kiselina, 4-etoksi-, etil estar; benzen, 1-metil-3,5-bis[(trimetilsilil)oksi]- trimetil (2,6 ditert-butilfenoksi) silan; azelainska kiselina i 2-metilanthraninon (2D hromatogram gde su ova jedinjenja obeležena je prikazan u Prilogu, Slika 8.1).

Tabela 6. Kvalitativni hemijski sastav etil-acetatnog ekstrakta *F. alnus* primenom GC×GC/MS analize

Komponenta	Rt1	Rt2	Relativni iznos (%)*
Benzoeva kiselina, 4-etoksi-, etil estar	33,00	3,60	18,6
Benzen, 1-metil-3,5-bis[(trimetilsilil)oksi]- Trimetil (2,6 ditert-butilfenoksi) silan	31,50	4,80	14,6
Azelainska kiselina, bis(trimetilsilil) estar	34,10	2,55	12,61
1-[(Trimetilsilil)oksi]-2-metilanthraninon	39,60	2,67	2,156
2',4'-Dimetoksi-3'-metilpropiofenon	43,00	3,45	1,048
2,4,6-Tri-t-butilbenzentiol	34,30	3,48	0,980
3,4,4'-Triaminodifenilsulfon	34,10	3,72	0,669
4,5,6,7-Tetrametilftalid	34,10	5,31	0,653
Trimetilsilil 3,5-dimetoksi-4-(trimetilsililoksi)benzoate	32,50	3,15	0,605
Benzoeva kiselina trimetilsilil estar	41,70	3,03	0,578
1,2-Benzendikarboksilna kiselina, bis(8-metilnonil) estar	25,60	2,88	0,401
Benzoeva kiselina, 4-[(trimetilsilil)oksi]-, trimetilsilil estar	42,60	3,81	0,385
1,4,5,7-Tetrametil-furo[3,4-d]piridazin	35,90	2,70	0,366
2-[4-(4-Metoksifenil)-3-fenilpirazol-1-il]-4-feniltiazol	37,80	3,09	0,359
2-propanska kiselina, 2-metil-, oksibis(2,1-etandiloksi-2,1-etandiil) estar	50,30	3,12	0,351
Benzoeva kiselina, 3,4-bis[(trimetilsilil)oksi]-, trimetilsilil estar	21,30	3,66	0,345
2H-1-Benzopiran, 3,4-dihidro-2-[3,4-bis[(trimetilsilil)oksi]fenil]-3,5,7-tris[(trimetilsilil)oksi]-, (2R-trans)-	40,40	2,64	0,256
Benzensirćetna kiselina, 4-[(trimetilsilil)oksi]-, trimetilsilil estar	58,20	3,09	0,244
Heksandiolna kiselina, bis(2-etilheksil) estar	36,10	2,79	0,206
Dodekanska kiselina, trimetilsilil estar	50,60	3,09	0,185
3-Vanil-1,2-bis(trimetilsililoksi)propan	36,50	2,52	0,181
2-propanska kiselina, 3-metoksi-3-[(trimetilsilil)oksi]-, metil estar	43,50	2,58	0,164
α-N-Normetadol	23,30	2,82	0,147
Benzoeva kiselina, 3-metoksi-4-[(trimetilsilil)oksi]-, trimetilsilil estar	36,10	2,64	0,130
2-[4-(4-Metoksifenil)-3-fenilpirazol-1-il]-4-feniltiazol	38,90	2,88	0,116
Orcinol, trimetilsilil etar	50,30	3,33	0,098
Pirimidin, 5-metil-2,4-bis[(trimetilsilil)oksi]-	30,60	3,06	0,0860
	36,40	2,91	0,0746

Rt1-retenciono vreme (min); Rt2-retenciono vreme (s)

* odnos zapremine pika koji odgovara jedinjenju i zbira zapremine svih pikova prisutnih u hromatogramu izražen kao procenat

4.1.2. Kvantitativna LC-MS/MS analiza

Kvantitativna analiza, odnosno detekcija masenih udela određenih fenolnih jedinjenja u FA ekstraktu urađena je primenom LC-MS/MS metode. Rezultati ove analize prikazani su u Tabeli 7. Dobijeni podaci ukazuju da je ekstrakt veoma bogat fenolnim jedinjenjima. Najzastupljenije jedinjenje bio je antrahinon emodin kog je pratio flavonoid katehin. Kada su u pitanju fenolne kiseline najdominantnije bile su: *p*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska i vanilinska kiselina. SRM hromatogram jedinjenja prikazan je u Prilogu, Slika 8.2. Kako se pokazalo da je emodin u velikoj meri zastupljen u ekstraktu ($15126 \pm 907 \mu\text{g/g}$) on je izabran za dalja ispitivanja uporedo sa ekstraktom.

Tabela 7. Kvantitativni udeo odabranih fenolnih jedinjenja u etil-acetatnom ekstraktu *F. alnus* analiziran LC-MS/MS metodom

Komponenta	Koncentracija ($\mu\text{g/g sm}$)*
Fenolne kiseline	
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	3378 \pm 203
Protokatehinska kiselina	414 \pm 33
2,5-Dihidroksibenzoeva kiselina	36,7 \pm 2,9
Vanilinska kiselina	738 \pm 2,2
Galna kiselina	69,5 \pm 1,1
Elagična kiselina	527 \pm 42
Kafena kiselina	48,2 \pm 3,4
Ferulna kiselina	264 \pm 0,26
Siringinska kiselina	1962 \pm 3,9
<i>p</i> -kumarinska kiselina	88,1 \pm 7,9
5- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina	<LOD**
Flavonoidi	
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	<LOD
Luteolin -7- <i>O</i> -glukozid	6,3 \pm 0,19
Katehin	11361 \pm 11
Kvercetin	153 \pm 9,2
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	299 \pm 9,0
Daidzein	<LOD
Diosmetin	1,6 \pm 0,05
Viteksin	<LOD
Kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	157 \pm 6,3
Rutin	63 \pm 1,9
Ostali fenoli	
Eskuletin	75 \pm 4,5
Emodin	15126 \pm 907

sm- masa suvog ekstrakta

*rezultati su prikazani kao koncentracija ($\mu\text{g/g sm}$) \pm standardna greška ponovljivosti

** koncentracija niža od limita kvantifikacije

4.2. Antioksidantna aktivnost etil-acetatnog ekstrakta *F. alnus*

Imajući u vidu da većina biljaka, odnosno njihovih sekundarnih metabolita, ostvaruje svoju aktivnost upravo preko antioksidantog efekta, u radu je ispitana antioksidantna aktivnost FA ekstrakta i emodina. Ispitana je sposobnost test supstanci da neutrališu slobodne radikale, tačnije DPPH radikala. Takođe, ispitana je i njihova sposobnost da inhibiraju proces lipidne peroksidacije.

4.2.1. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala

Potencijal etil-acetatnog ekstrakta kao i emodina da inhibiraju slobodne radikale, ispitana je u DPPH testu. Procenat inhibicije DPPH radikala test supstancama prikazan je u Tabeli 8.1 (prilog) dok su EC₅₀ vrednosti date u Tabeli 8. EC₅₀ vrednosti predstavljaju one koncentracije supstanci na kojima dolazi do neutralizacije 50% slobodnih radikala. Što je ova vrednost niža to je antioksidantna aktivnost test supstance jača i obrnuto.

FA ekstrakt je pokazao snažnu antioksidantnu aktivnost čija je EC₅₀ iznosila 7 µg/mL, a procenat inhibicije se kretao između 2,5% i 73%. S druge strane, emodin nije pokazao antioksidantnu aktivnost u opsegu testiranih koncentracija.

Tabela 8. EC₅₀ vrednosti dobijene u DPPH testu

	EC ₅₀ (µg/mL)
FA ekstrakt	7±1,2
Emodin	nd
Askorbinska kiselina	1±0,9

nd- nije detektovano

4.2.2. Potencijal inhibicije lipidne peroksidacije (LP)

Potencijal ekstrakta i emodina da inhibiraju proces lipidne peroksidacije ispitan je primenom TBA testa i to korišćenjem komercijalnih lipozoma kao modela ćelijske membrane. Na osnovu određivanja koncentracije obojenog produkta procesa LP (MDA), uočeno je da ekstrakt znatno jače inhibira LP u odnosu na čistu supstancu emodin. Testirane koncentracije test supstanci kretale su se u opsegu od 9 – 300 µg/mL za ekstrakt i od 0,31 µg/mL do 10 µg/mL za emodin. Ekstrakt je uspešno inhibirao proces LP od 24% do 58,9% (Tabela 8.2, prilog) u dozno-zavisnom maniru pri čemu je njegova EC₅₀ vrednost iznosila 120 µg/mL (Tabela 9). Nasuprot ekstraktu, emodin je ispoljio dosta slabiji efekat sa maksimumom inhibicije od 23% (Tabela 8.2, prilog). Kako je procenat inhibicije LP emodinom bio nizak nije bilo moguće odrediti njegovu EC₅₀ vrednost.

Tabela 9. EC₅₀ vrednosti dobijene u TBA testu

	EC ₅₀ (µg/mL)
Etil-acetatni ekstrakt <i>F. alnus</i>	120±3,4
Emodin	Nd
BHT	36±1,1

4.3. Ispitivanja efekta FA ekstrakta i emodina na prokariotskim test sistemima

4.3.1. Antibakterijska aktivnost ekstrakta i emodina

Primenom mikrodilucionog testa ispitana je antibakterijska aktivnost ekstrakta i emodina prema odabranim sojevima *S. aureus* (Tabela 2) i određene su minimalne inhibitorne koncentracije (Đukanović i sar., 2020; Đukanović i sar., 2021). Dodatno, praćenjem optičke gustine ispitan je efekat testiranih supstanci na rast bakterija. Takođe ispitan je i kombinovani efekat test supstanci sa antibiotikom vankomicinom primenom metode šahovske table.

4.3.1.1. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija ekstrakta i emodina

Kako bi se ispitala antibakterijska aktivnost ekstrakta i emodina, primenjena je mikrodiluciona metoda. Najpre je nivo rasta procenjen spektrofotometrijski, nakon čega je

dodavana indikatorska boja resazurin, radi određivanja MIK vrednosti. Dobijene MIK i MBK vrednosti prikazane su u Tabeli 10.

Tabela 10. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta i emodina

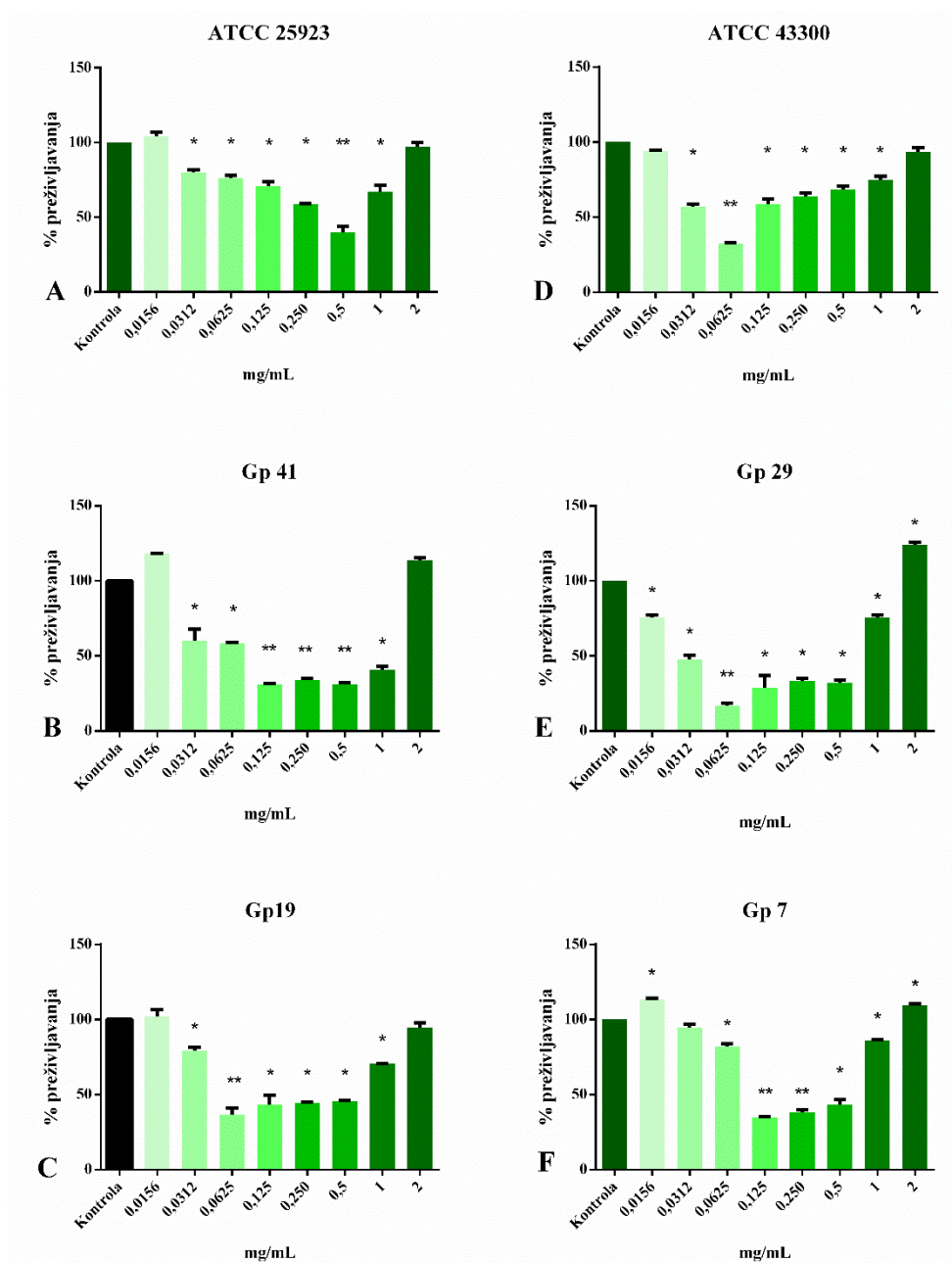
Sojevi <i>S. aureus</i>	Ekstrakt		Emodin		Vankomicin	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
	µg/mL					
ATCC 25923	500	nd	25	nd	1,25	5
ATCC 43300	62,5	nd	12,5	nd	2,5	5
Gp41	125	nd	12,5	nd	0,625	2,5
Gp19	62,5	nd	6,25	nd	2,5	10
Gp29	62,5	nd	3,125	nd	1,25	5
Gp7	125	nd	3,125	nd	1,25	5

nd – nije detektovano u opsegu testiranih koncentracija

Ekstrakt i emodin su pokazali izrazitu antibakterijsku aktivnost na svim testiranim sojevima. Klinički izolati pokazali su se osetljivijim na delovanje test supstanci u poređenju sa ATCC sojevima. Kao najosetljiviji sojevi na delovanje ekstrakta pokazali su se ATCC 43300, Gp19 i Gp29 sa MIK vrednostima 62,5 µg/mL. Sa druge strane, emodin je ispoljio najsnažniji efekat na MRSA sojeve i to Gp29 i Gp7 sa MIK vrednostima od 3,125 µg/mL. Iako je pokazana snažna inhibitorna aktivnost ispitivanih supstanci, MBC vrednosti nisu detektovane. Kao pozitivna kontrola korišćen je vankomicin.

4.3.1.2. Efekat ekstrakta i emodina na preživljavanje testiranih sojeva

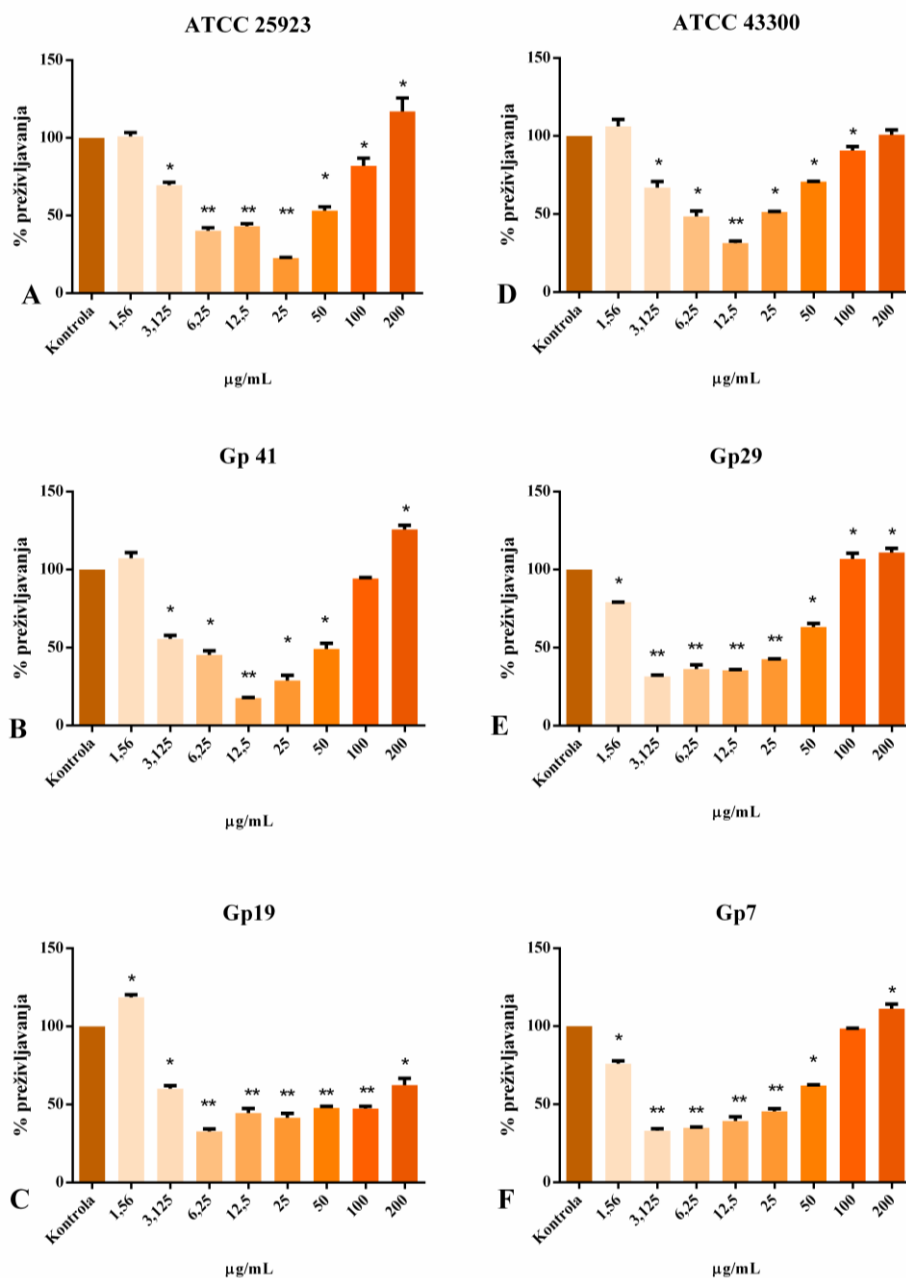
Merenjem optičke gustine, određene su MIK vrednosti, ali je takođe ispraćen i efekat test supstanci na preživljavanje sojeva *S. aureus* koji je prikazan na Slikama 15 i 16. Uočava se da ekstrakt na svim testiranim koncentracijama dovodi do inhibicije bakterijskog rasta, osim kod sojeva ATCC 25923, ATCC 43300 i Gp19, gde najveća i najniža koncentracija ne utiču značajno na preživljavanje. Efekat na ATCC sojeve je bio nešto manji nego kada su u pitanju klinički izolati i kod njih se procenat inhibicije kretao od 2 % do 67 %. Kod kliničkih izolata procenat inhibicije rasta bio je od 3 % do 87 %, a najveća inhibicija (87 %) uočena je kod soja Gp29.



Slika 15. Efekat ekstrakta na preživljavanje sojeva *S. aureus* A) ATCC 25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29, F) Gp7.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Emodin je takođe pokazao dobar inhibicioni efekat na svim testiranim sojevima i koncentracijama, a rezultati su prikazani na Slici 16. Procenat inhibicije rasta emodinom bio je u opsegu od 1 % do 77 %. Najveća inhibicija (77 %) je uočena kod soja ATCC 25923 na MIK koncentraciji. Neobično, dobijena je U forma odgovora, tj. najveća inhibicija je dobijena primenom srednjih koncentracija, a efekat se prividno gubio sa daljim rastom koncentracija.



Slika 16. Efekat emodina na preživljavanje sojeva *S. aureus* A) ATCC 25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29, F) Gp7.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.3.2. Kombinovani efekat test supstanci i vankomicina na sojeve *S. aureus*

Kako bi se ispitao kombinovani efekat test supstanci sa antibiotikom vankomicinom, primenjena je metoda šahovske table. S obzirom da su svi sojevi bili osetljivi na delovanje ekstrakta i emodina, ispitivanje kombinovanog efekta vršeno je na svim sojevima. Izračunavanjem FICI indeksa određen je tip interakcije dve supstance koji može biti: sinergistički ($FICI \leq 0,5$), aditivni ($0,5 < FICI \leq 1,5$), indiferentni ($1,5 < FICI \leq 4$) i antagonistički ($FICI > 4$).

Rezultati dobijeni kombinovanjem FA ekstrakta i antibiotika nisu pokazali postojanje pozitivnih interakcija među test supstancama, već je efekat ostajao isti kao i u slučaju pojedinačnih tretmana. U slučaju emodina, odsustvo rasta uočeno je na nižim koncentracijama kod sojeva Gp41 i Gp29 i izračunate su FICI vrednosti prikazane u Tabeli 11.

Tabela 11. Vrednosti odabranih koncentracija i izračunate FICI vrednosti

Sojevi	Emodin μg/mL	Vankomicin	FICI vrednost	Tip interakcije
Gp41	3,125	0,156	0,50	Sinergizam
Gp29	3,125	0,078	1,12	Aditivni

Kod soja Gp41 uočen je sinergistički efekat dve supstance koji omogućava smanjenje koncentracije antibiotika prilikom kombinovanja supstanci, što se i može uočiti. MIK vrednost vankomicina je iznosila 2,5 μg/mL, dok je ta vrednost u kombinaciji bila 0,156 μg/mL. Kod soja Gp29 zapaža se aditivni efekat koji ukazuje da je efekat supstanci u kombinaciji jednak sumi efekata koje supstance ostvaruju pojedinačno.

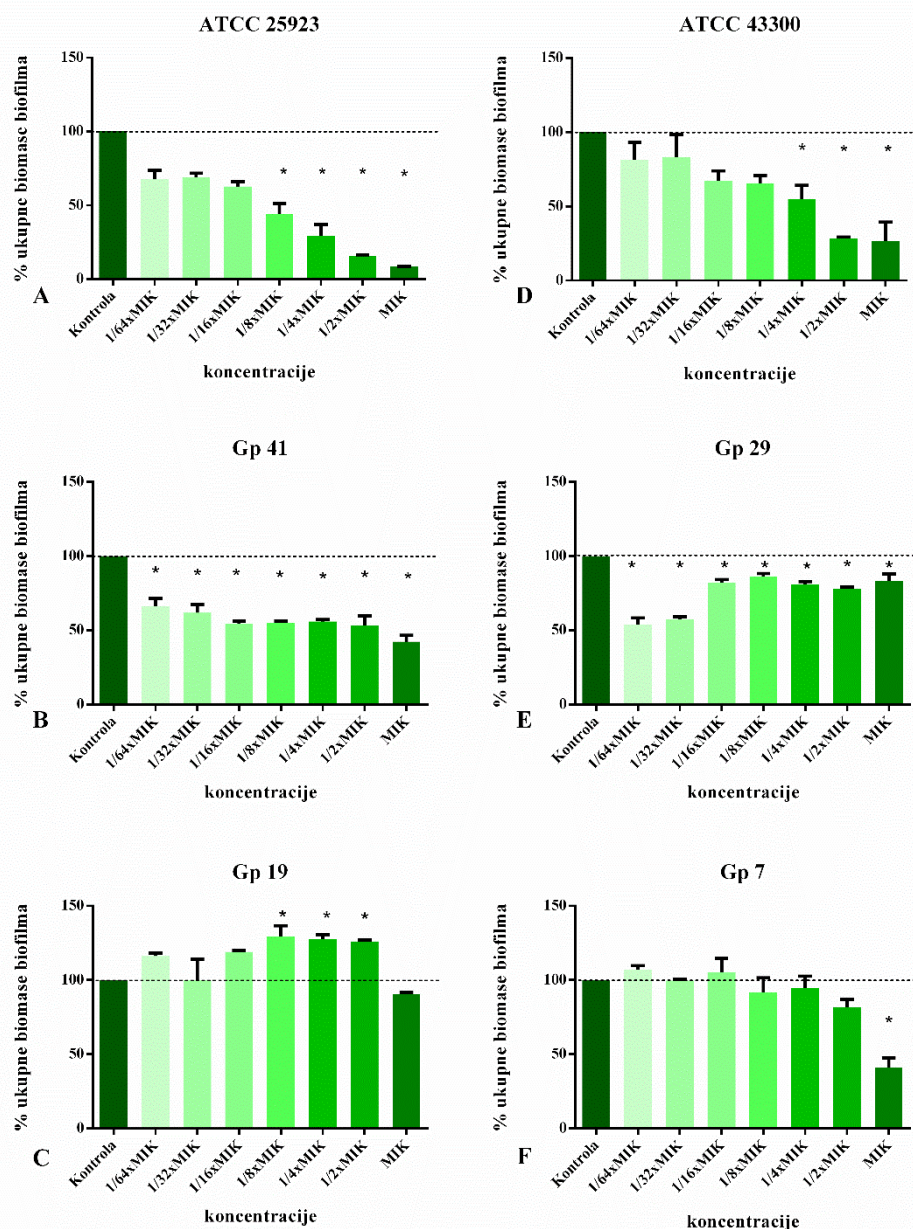
Ove kombinacije odabrane su za dalja testiranja.

4.3.3. Antibiofilm aktivnost ekstrakta i emodina

Imajući u vidu da su bakterije u formi biofilma dosta rezistentnije na antimikrobne agense, u okviru ove celine ispitan je efekat FA ekstrakta i emodina, kao i njihovih kombinacija, na formiranje biofilma i destrukciju već formiranog biofilma bojenjem ukupne biomase kristal violetom. Efekat je potvrđen primenom SEM i AFM mikroskopije, pri čemu je i ispraćen efekat na morfologiju i hrapavost biofilma (Đukanović i sar., 2020; Đukanović i sar., 2021). Dodatno, ispitan je efekat test supstanci na komponente ekstracelularnog matriksa biofilma, broj ćelija perzistera u biofilmovima i produkciju pigmenta stafiloksantina.

4.3.3.1. Efekat FA ekstrakta i emodina na formiranje biofilma *S. aureus*

Kvantifikacijom ukupne biomase biofilma kristal violetom ispraćen je inhibitorski efekat test supstanci na formiranje biofilma *S. aureus*. Testirane koncentracije odabrane su na osnovu prethodno dobijenih MIK vrednosti (Tabela 10) i bile su u opsegu od $1/64 \times \text{MIK}$ – MIK. Rezultati su prikazani na Slici 17 i 18.



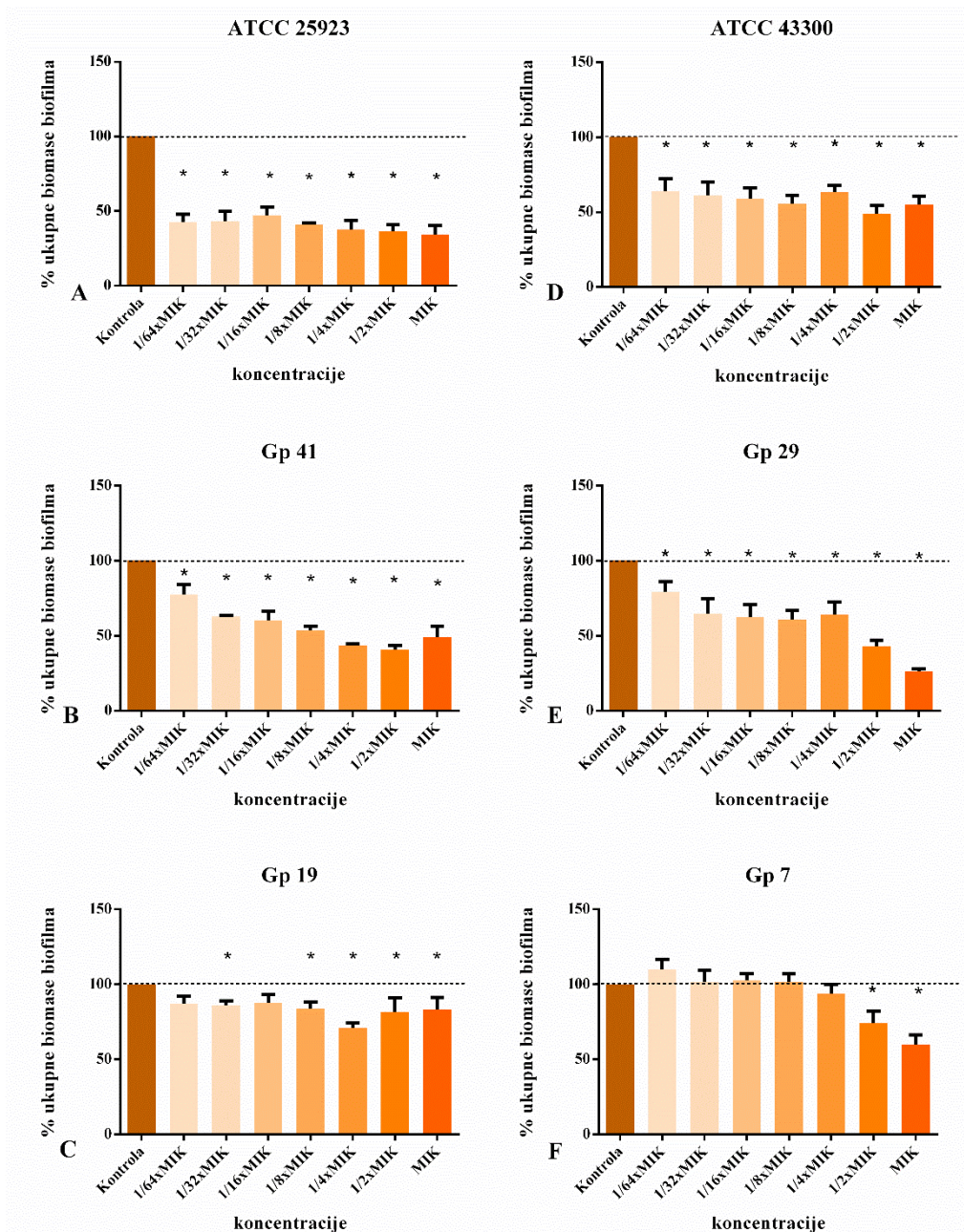
Slika 17. Efekat FA ekstrakta na sprečavanje formiranja biofilma *S. aureus*: A) ATCC 25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29, F) Gp7.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$;

Sa priložene slike, može se uočiti da FA ekstrakt ispoljava snažan dozno-zavisan inhibicioni efekat na formiranje biofilma oba ATCC soja (Slika 17A i D). Biomasa biofilma soja ATCC 25923 bila je značajno smanjena, u opsegu od 51 % do 91 % inhibicije, na koncentracijama 1/8xMIK – MIK, dok je kod soja ATCC 43300 inhibicija bila od 45 % do 73 % na koncentracijama 1/4xMIK – MIK. Sa druge strane, FA ekstrakt je ispoljio nešto slabiji inhibicioni efekat na kliničkim izolatima (Slika 17B, C, E, F). Značajan inhibicioni efekat uočen je kod sojeva Gp41 (33 – 57 %) i Gp29 (30 – 50 %). dok se kod soja Gp7 inhibicija uočava samo na najvišoj koncentraciji i iznosi 59 %. Nasuprot svim ostalim sojevima, kod soja Gp19 može se videti da ekstrakt dovodi do značajne produkcije biomase na koncentracijama 1/8xMIK – 1/2xMIK.

Efekat emodina na formiranje biofilma prikazan je na Slici 18. Emodin je takođe imao snažan efekat na oba ATCC soja (Slika 18A i D). Kod soja ATCC 25923 inhibicija je bila od 57 %

do 65 % dok je kod ATCC 43300 inhibicija bila nešto slabija i kretala se od 35 % do 45 %. Na kliničkim izolatima efekat emodina je bio slabiji osim na soju Gp29, gde je došlo do inhibicije od 73 % na MIK koncentraciji. U slučaju drugog MRSA izolata (Gp7) inhibicija je bila 25 % i 40 % na koncentracijama 1/2×MIK i MIK. Na Slici 18B uočava se inhibitorni efekat emodina na formiranje biofilma MSSA soja Gp41 na svim testiranim koncentracijama (22 – 51 %). Na drugom soju, Gp19, efekat bio dosta slabiji (12 % i 28 %) i to samo na koncentracijama 1/2×MIK i MIK.

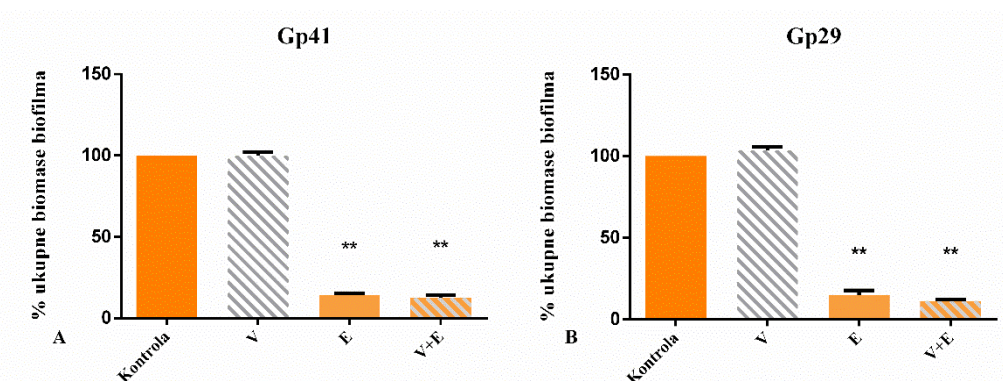


Slika 18. Efekat emodina na sprečavanje formiranja biofilma *S. aureus*: A) ATCC 25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29, F) Gp7.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije. * p<0,05;

4.3.3.2. Efekat odabranih kombinacija emodina i vankomicina na formiranje biofilмова *S. aureus*

Na osnovu dobijenih rezultata primenom metode šahovske table, odabrane su koncentracije i kombinacije za testiranje efekta na formiranje biofilмова izolata Gp41 i Gp29 (Tabela 11). Na Slici 19 može se uočiti da je efekat kombinacije supstanci bio nešto jači nego efekat pojedinačne supstance – emodina. Kod soja Gp41 procenat biomase biofilma, koji je uspeo da se formira pod tretmanom emodinom, bio je oko 15 %, dok je u kombinaciji bio oko 14 %. Odabrana subinhibitorna koncentracija vankomicina nije imala efekta na formiranje biofilma, s obzirom da je procenat biomase bio kao u kontroli. U slučaju drugog izolata, efekat kombinacije bio je malo izraženiji; procenat biomase iznosio je 11 %, dok je u tretmanu emodinom biomasa iznosila 14 %.



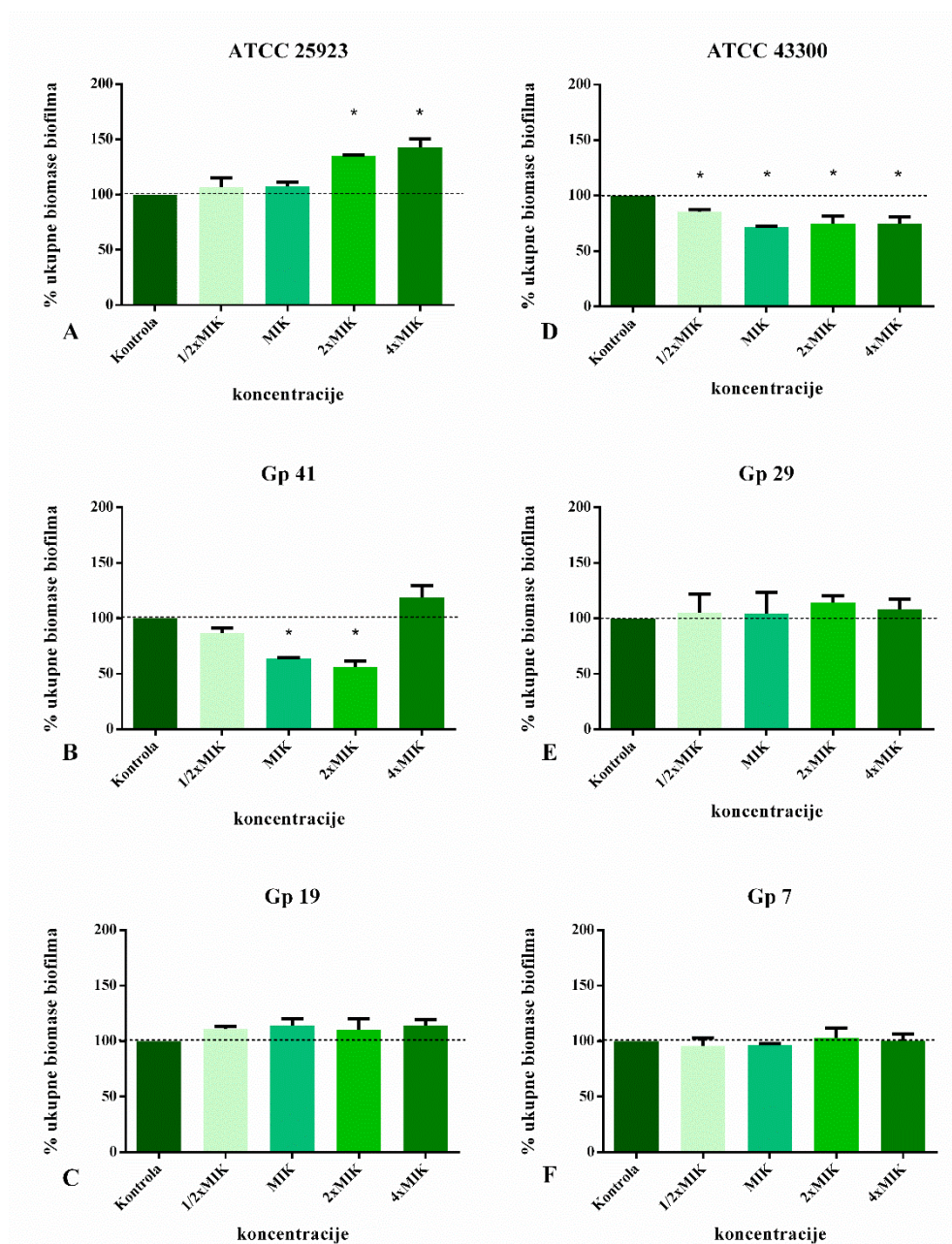
Slika 19. Efekat odabranih kombinacija emodina i vankomicina na formiranje biofilмова *S. aureus* A) Gp41 i B) Gp29.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.3.3.3. Efekat FA ekstrakta i emodina na već formirane biofilmove *S. aureus*

Efekat test supstanci na već formirane biofilmove takođe je ispraćen kvantifikacijom ukupne biomase biofilмова, bojenjem kristal violetom. Testirane koncentracije bile su u opsegu od $1/2 \times \text{MIK}$ – $4 \times \text{MIK}$, a odabrane su na osnovu dobijenih MIK vrednosti (Tabela 10).

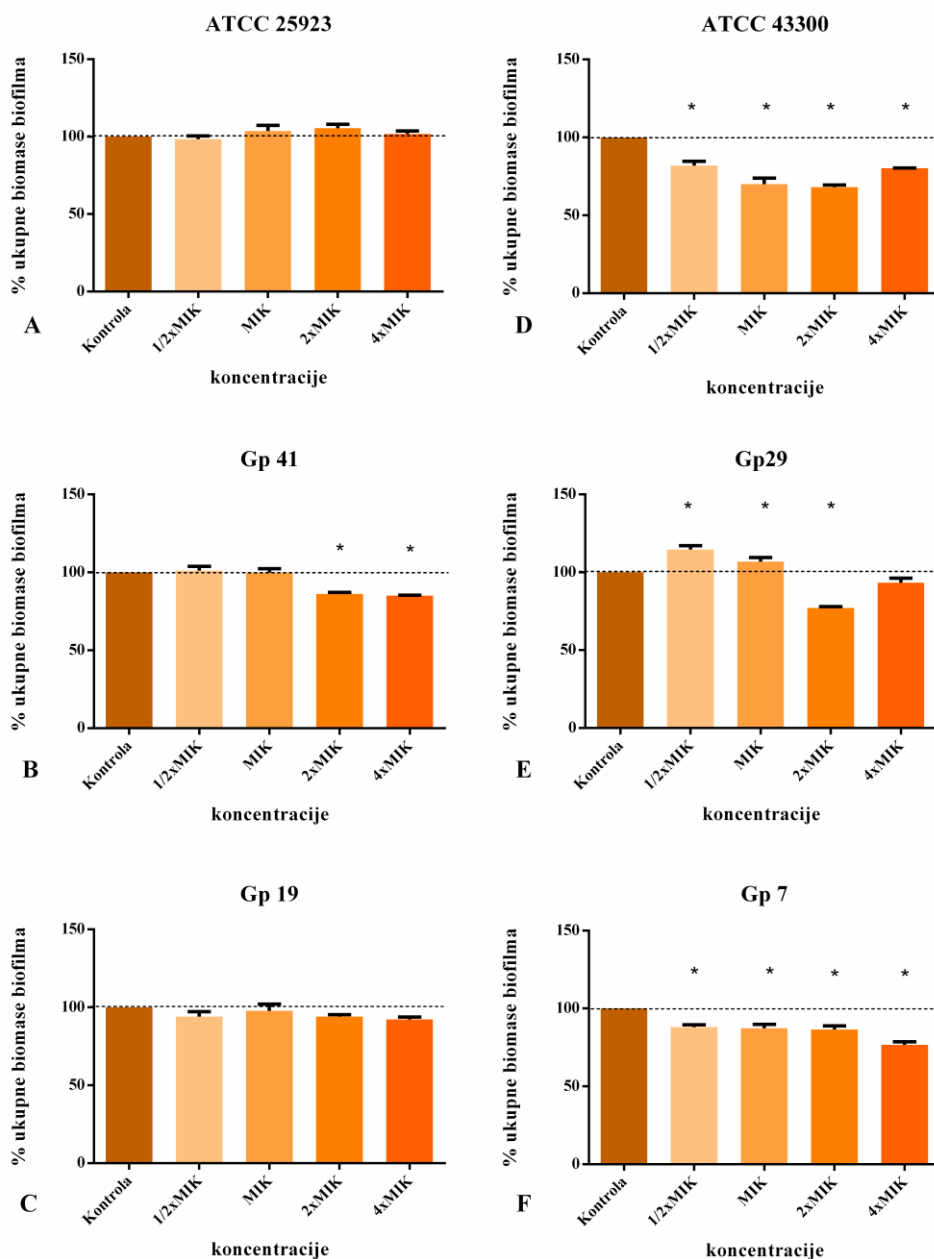
Značajna destrukcija biofilma ekstraktom uočena je kod soja ATCC 43300 na svim testiranim koncentracijama, sa najvećim procentom destrukcije od 28 % na koncentraciji $4 \times \text{MIK}$ (Slika 20D). Posmatrajući kliničke izolate, značajna disrupcija se uočava samo kod soja Gp41 i to na koncentraciji MIK i $2 \times \text{MIK}$ (36, 5% i 44,5 %, Slika 20B). FA ekstrakt je kod soja ATCC 25923 doveo do značajnog povećanja ukupne biomase biofilma na koncentracijama $2 \times \text{MIK}$ i $4 \times \text{MIK}$ (Slika 20A).



Slika 20. Efekat FA ekstrakta na već formirane biofilme *S. aureus*: A) ATCC 25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29, F) Gp7.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$;

Sa druge strane, emodin je ispoljio efekat na biofilme više sojeva (Slika 21). Snažan efekat uočen je kod soja ATCC 43300 na svim testiranim koncentracijama, a najveća inhibicija iznosila je 31 % (2xMIK). Kod drugog ATCC soja, biomasa biofilma je ostala nepromenjena. Emodin je ispoljio slabiji efekat na MSSA izolat Gp41, gde je došlo do destrukcije od 14 % na koncentraciji 4xMIK, dok na soju Gp19 nije bilo efekta. Kada su u pitanju MRSA klinički izolati, na soju Gp29 došlo je do destrukcije od 22 % na koncentraciji 2xMIK, odnosno 23 % na 4xMIK kod soja Gp7. Dodatno, niže koncentracije kod soja Gp29 dovode do stimulacije biomase biofilma.

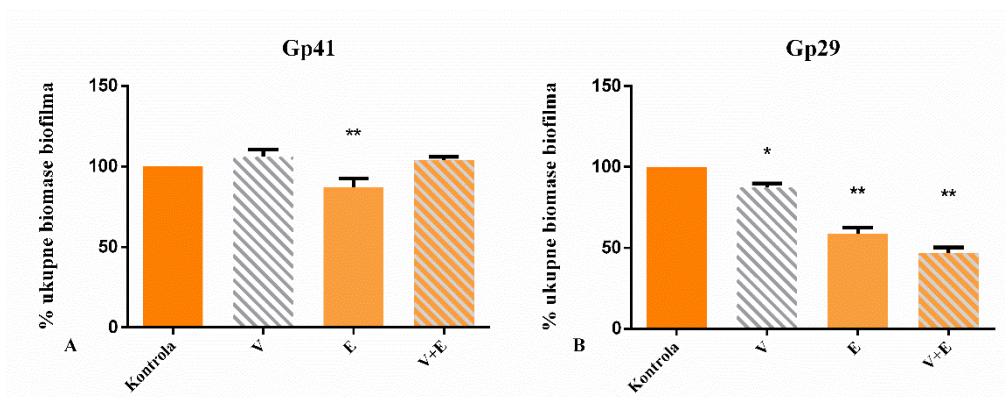


Slika 21. Efekat FA ekstrakta na već formirane biofilmove *S. aureus*: A) ATCC 25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29, F) Gp7.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$;

4.3.3.4. Efekat odabranih kombinacija emodina i vankomicina na već formirane biofilmove *S. aureus*

Koncentracije korišćene u odeljku 4.3.2. (testiranje antibakterijskog potencijala kombinacija emodina i vankomicina) odabrane su i za testiranje na već formirane biofilmove sojeva Gp41 i Gp29, koji su odabrani kao najosetljiviji. Ono što se može uočiti na Slici 22 jeste da je efekat kombinacija bio izraženiji na MRSA soju – Gp29. Kod ovog soja, subinhibitorna koncentracija vankomicina dovela je do blage destrukcije biofilma, dok je u slučaju emodina destrukcija iznosila do 41,7 %, a u slučaju kombinacije emodina i vankomicina čak do 53,7 % (Slika 22B). Biomasa biofilma soja Gp41 ostala je nepromenjena u tretmanu kombinacijom.



Slika 22. Efekat odabranih kombinacija emodina i vankomicina na već formirane biofilmove *S. aureus* A) Gp41 i B) Gp29.

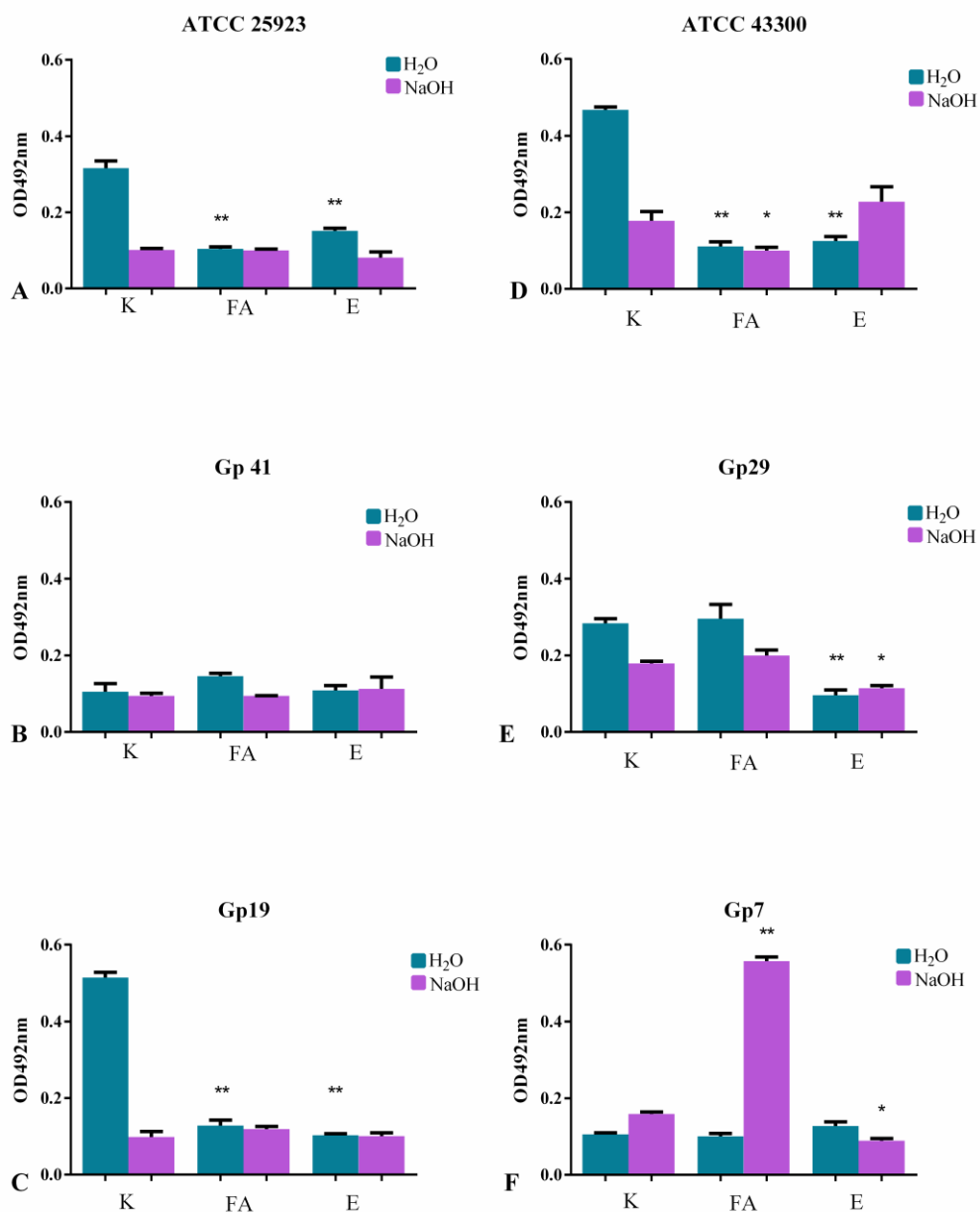
Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.3.3.5. Efekat test supstanci na ekstracelularne polisaharide biofilmova *S. aureus*

Uticaj test supstanci na produkciju ekstracelularnih polisaharida u matriksu biofilmova praćen je merenjem apsorbance polisaharida rastvornih i nerastvornih u vodi (resuspendovanih u NaOH). Testirane koncentracije ekstrakta i emodina bile su $4 \times \text{MIK}$.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se uočiti da ekstrakt FA, kao i emodin, inhibiraju produkciju polisaharida rastvornih u vodi kod oba ATCC soja i izolata Gp19 (Slika 23A, C, D). Najveći procenat inhibicije ekstrakt je ostvario kod soja ATCC 43300 i to 76 %, dok je kod soja ATCC 25923 taj procenat iznosio 69 %, a kod Gp19 75 %. Sa druge strane, emodin je naj snažniju inhibiciju pokazao na soju Gp19 i to 79,9 %, dok je inhibicija kod soja ATCC 25923 bila 52,2 % i kod soja ATCC 43300 73,3 % (Tabela 8.11 prilog). Takođe, kod soja Gp29 emodin je inhibirao produkciju polisaharida matriksa za 66 %. Ekstrakt FA i emodin nisu pokazali značajan efekat kod sojeva Gp41 i Gp7 gde je produkcija ostala nepromenjena (Slika 23B i F).

Kada su u pitanju polisaharidi nerastvorni u vodi, obe test supstance ne dovode do značajnih promena, ili dovode do stimulacije njihove sinteze. Ekstrakt FA je doveo do inhibicije produkcije polisaharida nerastvornih u vodi od 43 % kod soja ATCC 43300 (Slika 23D), a kod soja Gp7 do veoma značajnog povećanja produkcije (Slika 23F), dok kod ostalih sojeva nije bilo promena. Kada je emodin u pitanju, do blage inhibicije sinteze je došlo kod izolata Gp29 i Gp7 (Slika 23E i F).

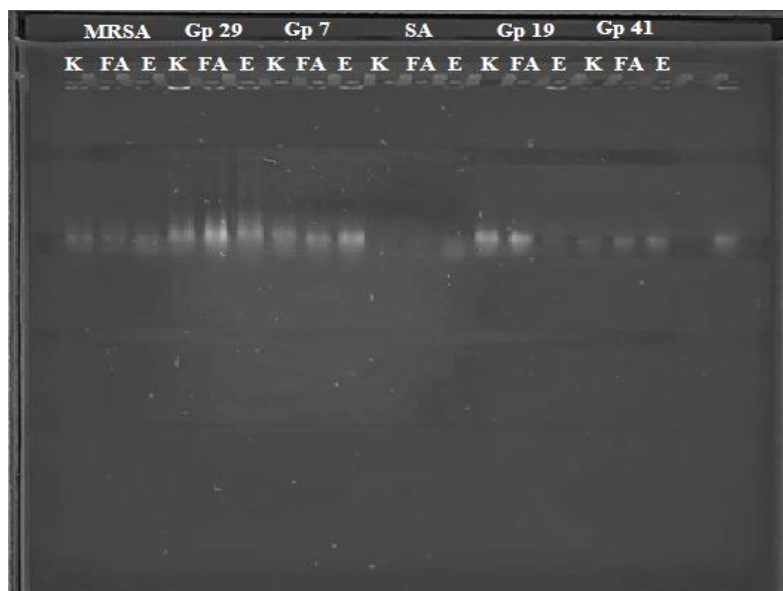


Slika 23. Efekat FA ekstrakta i emodina na ekstracelularne polisaharide matriksa biofilмова *S. aureus*: A) ATCC 25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29, F) Gp7.

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$;

4.3.3.6. Efekat FA ekstrakta i emodina na količinu eDNK u matriksu biofilmova sojeva *S. aureus*

U cilju praćenja efekta test supstanci na količinu eDNK u matriksu biofilma, biofilmovi su tretirani koncentracijama 4×MIK, eDNK je izolovana i potom vizuelizovana i kvantifikovana. Izolovana eDNK je vizuelizovana na agaroznom gelu, što je prikazano na Slici 24, dok je količina dobijene eDNK bez i sa tretmanom data u Tabeli 12.



Slika 24. Izolovana eDNK iz matriksa biofilmova sojeva *S. aureus* i vizuelizovana na agaroznom gelu na UV transiluminatoru

Dobijeni rezultati pokazuju da FA ekstrakt i emodin kod sojeva ATCC 25923 i Gp41 dovode do povećanja količine eDNK u matriksu, dok kod Gp19 (MSSA) soja dovode smanjenja. Sa druge strane, kod MRSA sojeva obe test supstance dovode do smanjenja količine eDNK samo kod soja ATCC 43300. FA ekstrakt kod soja Gp29 povećava količinu eDNK, dok je kod soja Gp7 smanjuje u poređenju sa kontrolom. Nasuprot tome, emodin smanjuje koncentraciju kod Gp29 soja, a povećava je kod soja Gp7. Uopšteno gledano, kada su u pitanju MSSA sojevi, količina eDNK u kontrolama je znatno manja u odnosu na kontrole MRSA sojeva.

Tabela 12. Koncentracije dobijene eDNK u matriksu biofilmova *S. aureus*

	ATCC25923	Gp41	Gp19	ATCC43300	Gp29	Gp7
			eDNK (ng/μL)			
Kontrola	1,98	12,9	39,3	26,00	43,4	20,2
FA ekstrakt	3,39	16,9	36,7	17,3	56,00	14,4
Emodin	6,87	26,2	16,7	13,4	39,5	28,7

4.3.3.7. Efekat FA ekstrakta i emodina na broj ćelija perzistera u biofilmu

Efekat test supstanci na broj ćelija perzistera ispraćen je indirektno, prebrojavanjem kolonija formiranih na čvrstim podlogama, a potom je rezultat izražen kao broj ćelija/mL i prikazan u Tabeli 13. Dobijene vrednosti pokazuju da FA ekstrakt i emodin u većini slučajeva dovode do smanjenja broja ćelija perzistera u biofilmu. FA ekstrakt kod soja Gp19 dovodi do blagog porasta broja ćelija perzistera, dok kod soja Gp7 se ne uočavaju promene u brojnosti. Emodin je kod svih testiranih sojeva, sa izuzetkom Gp29, doveo do pada broja ćelija perzistera. Iako FA i emodin dovode do smanjenja broja ćelija perzistera u biofilmu, ovo smanjenje nije bilo statistički značajno.

Tabela 13. Broj ćelija perzistera u netretiranim i tretiranim biofilmovima sojeva *S. aureus*

	Kontrola		FA ekstrakt		Emodin	
	kolonije	ćelija/mL	Kolonije	ćelija/mL	kolonije	ćelija/mL
ATCC 25923	64	$6,4 \times 10^8$	10	1×10^8	9	9×10^7
Gp41	78	$7,8 \times 10^8$	7	7×10^7	9	9×10^7
Gp19	25	$2,5 \times 10^8$	29	$2,9 \times 10^8$	12	$1,2 \times 10^8$
ATCC 43300	194	$1,94 \times 10^9$	28	$2,8 \times 10^8$	37	$3,75 \times 10^8$
Gp29	60	6×10^8	24	$2,4 \times 10^8$	50	5×10^8
Gp7	54	$5,4 \times 10^8$	54	$5,4 \times 10^8$	28	$2,8 \times 10^8$

*br.kolonija predstavlja srednju vrednost broja kolonija sa dve Petri šolje

4.3.3.8. Efekat FA ekstrakta i emodina na produkciju pigmenta stafiloksantina

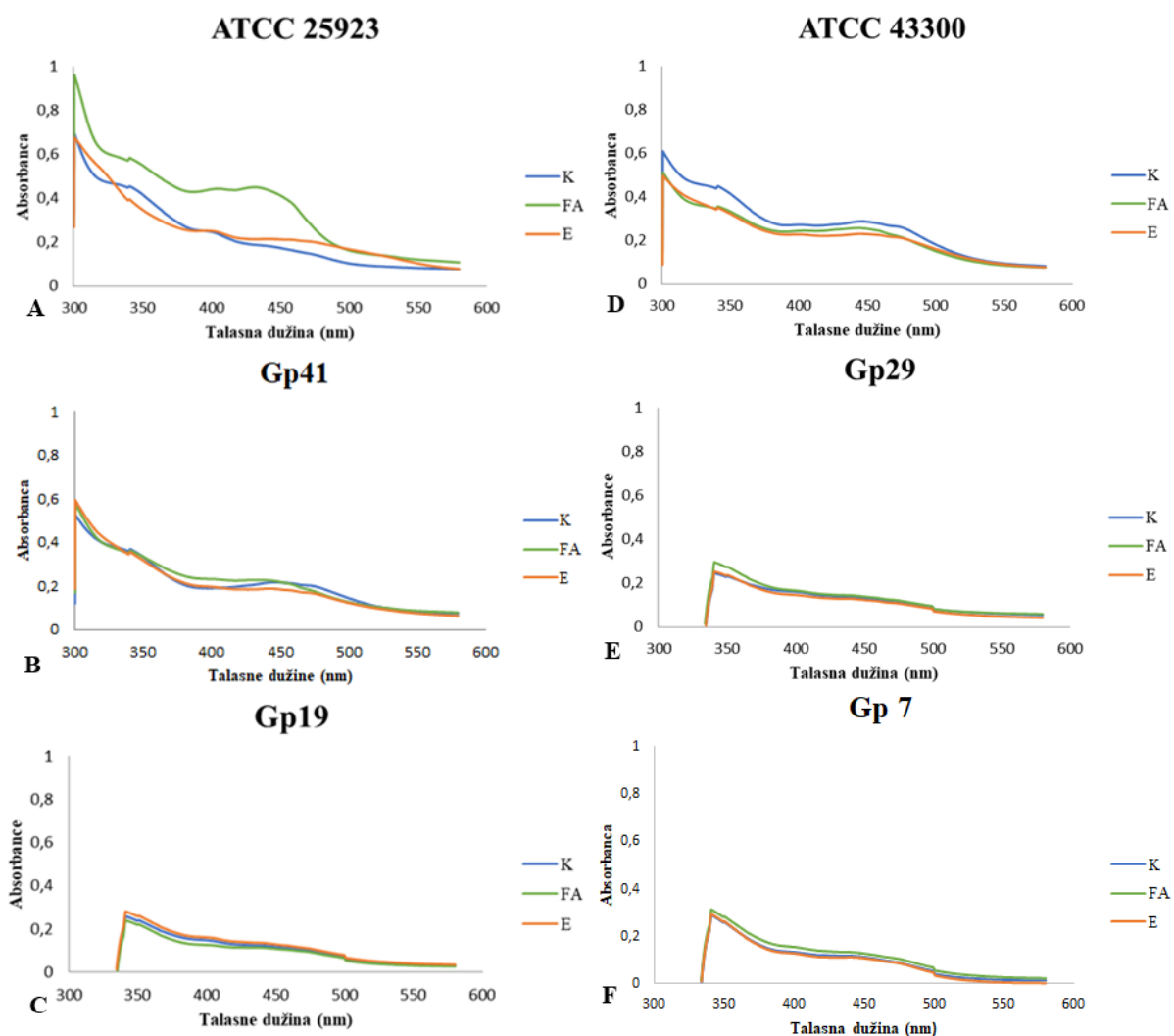
Stafiloksantin predstavlja karotenoidni pigment *S. aureus* čija se biosinteza može ispratiti spektrofotometrijski. Kako bi se ispitaio uticaj FA ekstrakta i emodina na produkciju ovog pigmenta kod sojeva *S. aureus* tretiranih subinhibitornim koncentracijama, izmeren je apsorpcioni spektar pigmenta u opsegu talasnih dužina od 300 nm do 600 nm i rezultati su dati na Slici 25. Dodatno, s obzirom da je poznato da stafiloksantin ima maksimum apsorpcije na 450 nm, na ovoj talasnoj dužini izračunat je procenat inhibicije sinteze pigmenta koji je dat u Tabeli 14.

Tabela 14. Procenat inhibicije produkcije stafiloksantina kod sojeva *S. aureus* pod tretmanom FA ekstraktom i emodinom

	FA ekstrakt	Emodin
	% inhibicije	
ATCC 25923	Nd	nd
Gp41	Nd	14,42
Gp19	7,64	nd
ATCC 43300	11,39	19,97
Gp29	Nd	6,88
Gp7	Nd	13,72

nd – inhibicija nije detektovana ili je došlo do povećanja biomase biofilma

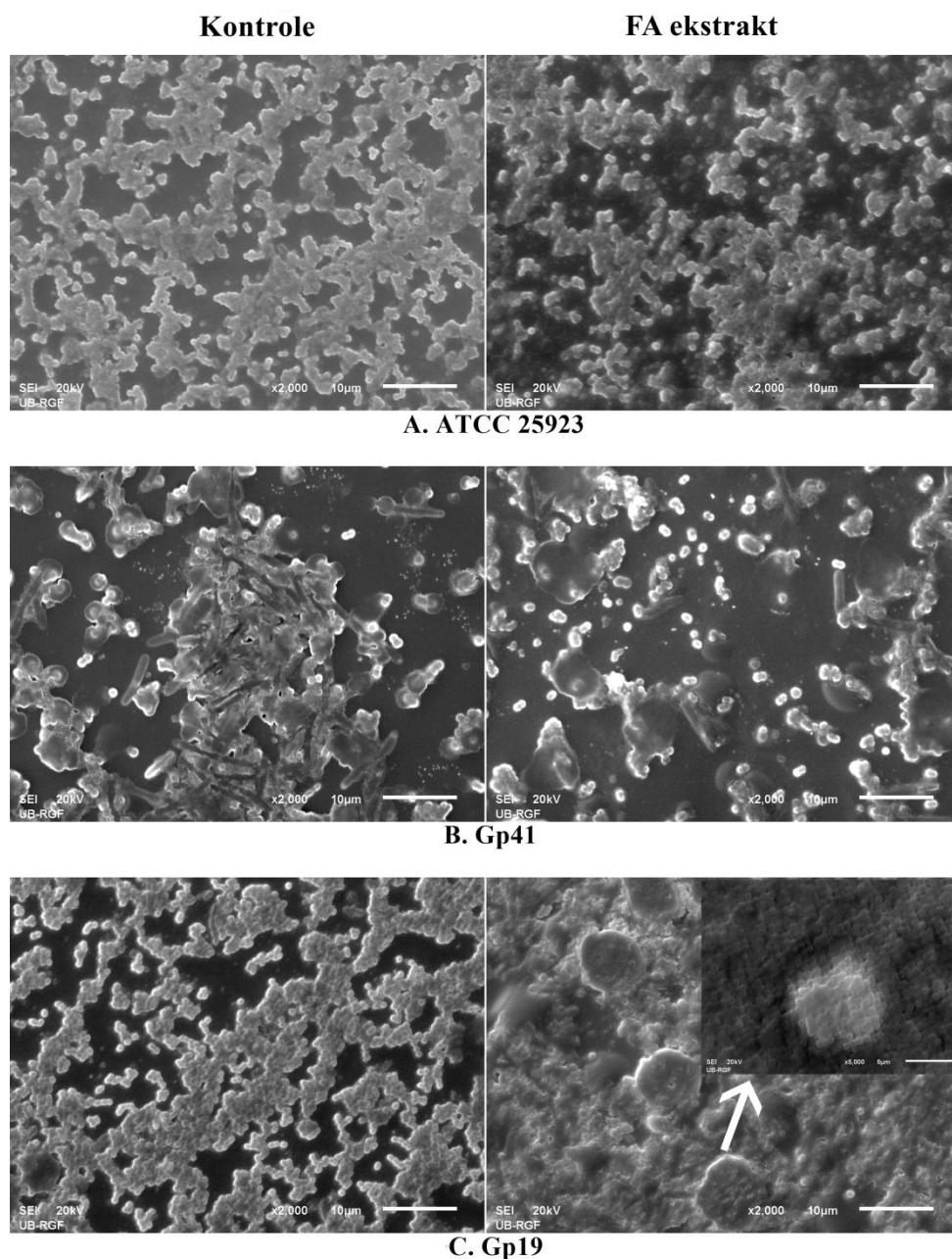
Dobijeni apsorpcioni spektri su pokazali da obe test supstance imaju slab efekat na sintezu pigmenta stafiloksantina, što se vidi i u Tabeli 14. Najveći % inhibicije, od oko 20 %, zabeležen je kod soja ATCC 43300 tretiranog emodinom. Suprotno inhibiciji, FA ekstrakt je kod soja ATCC 25923 doveo do značajne stimulacije sinteze pigmenta što se vidi na Slici 25A. Kod sojeva Gp19, Gp29 i Gp7 nije bilo razlike u produkciji pigmenta kada su sojevi tretirani test supstancama, a takođe se primećuje da su njihovi apsorpcioni spektri dosta niži u odnosu na ostale sojeve.



Slika 25. Absorpcioni spektri stafiloksantina pod uticajem FA ekstrakta i emodina kod sojeva *S. aureus* A) ATCC25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29 i F) Gp7. K-kontrola; FA-tretman FA ekstraktom; E-tretman emodinom.

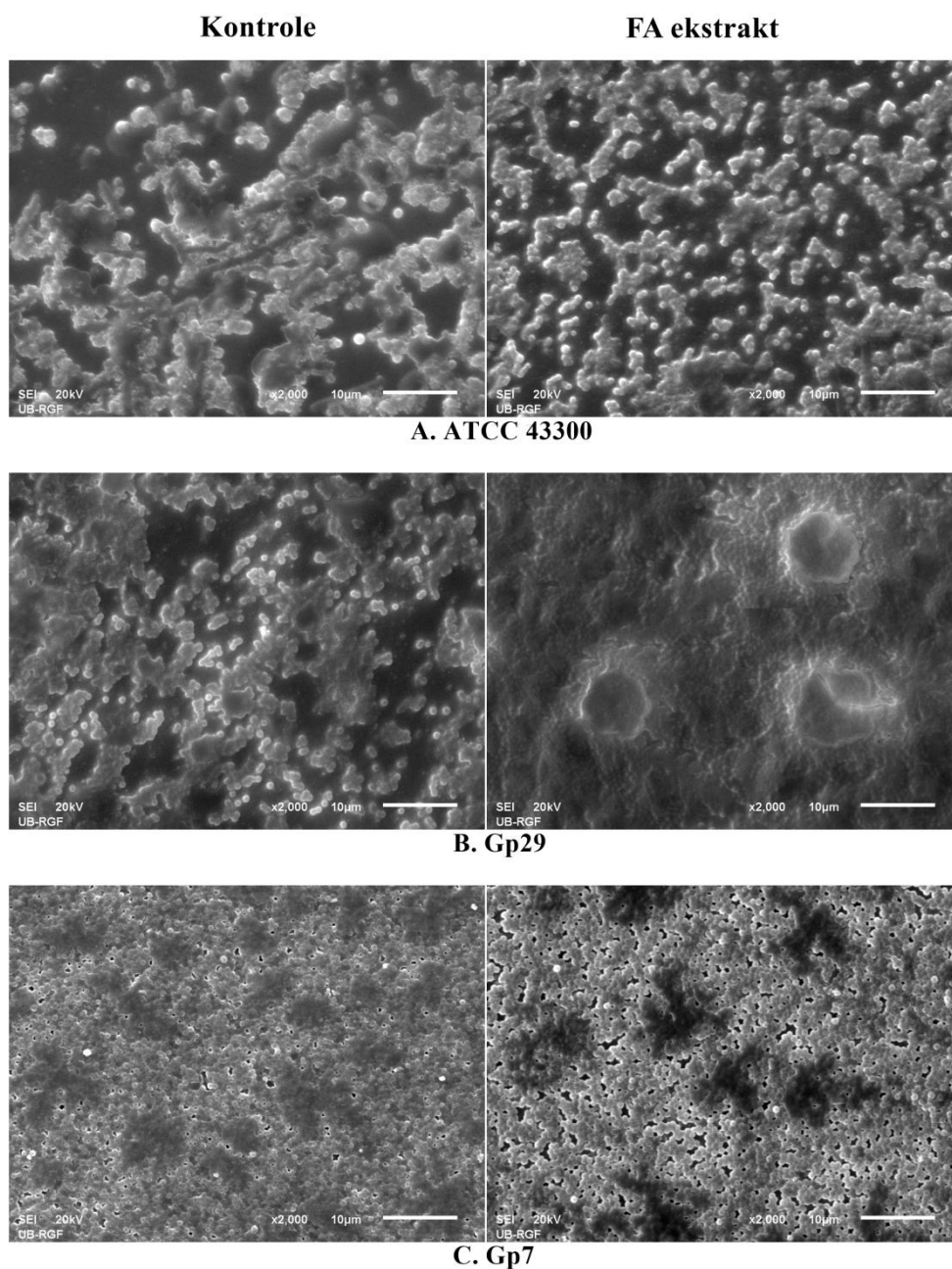
4.3.3.9. SEM mikroskopija biofilmova tretiranih FA ekstraktom

Preformirani biofilmovi, testirani dozama ekstrakta od $4 \times \text{MIK}$ su analizirani skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Posmatrajući dobijene mikrografije kod MSSA sojeva, može se uočiti da FA ekstrakt nije doveo do značajne disrupcije biofilmova, ali je uticao napromene u gustini i strukturi matriksa kod sojeva Gp41 i Gp19 (Slika 26). Dodatno, kod soja Gp19 može se primetiti da je ekstrakt doveo i do formiranja grupacija ćelija, odnosno ćelijskih klastera (Slika 26C).



Slika 26. SEM mikrografije efekta FA ekstrakta na preformirane biofilme MSSA sojeva *S. aureus* A) ATCC25923, B) Gp41 i C) Gp19. Sa leve strane prikazane su mikrografije netretiranih biofilмова dok su sa desne strane biofilmovi tretirani sa 4×MIK (uveličanje ×2000). Umetnuta mikrografija na slici C predstavlja klasterе ćelija na uveličanju ×5000. Skala na mikrografijama je podešena na 10 µm odnosno 5 µm na umetnutoj mikrografiji.

Kod meticilin rezistentnog ATCC soja može se primetiti blaga destrukcija biomase biofilma (Slika 27A). Sa druge strane, kod biofilмова sojeva Gp19 i Gp7 nije došlo do destrukcije, ali su vidljive jasne promene u trodimenzionalnoj strukturi i morfologiji njihovih biofilмова pod uticajem FA ekstrakta. Kod soja Gp29 se takođe pojavljuju klasteri ćelija nakon tretmana FA ekstraktom.



Slika 27. SEM mikrografije efekta FA ekstrakta na preformirane biofilme MRSA sojeva *S. aureus* A) ATCC 43300, B) Gp29 i C) Gp7. Sa leve strane prikazane su mikrografije netretiranih biofilмова dok su sa desne strane biofilmovi tretirani sa 4×MIK (uveličanje ×2000). Skala na mikrografijama je podešena na 10 μm.

4.3.3.10. AFM mikroskopija biofilмова tretiranih FA ekstraktom i emodinom

Primenom atomske mikroskopije analizirana je morfologija i hrapavost preformiranih biofilмова, tretiranih 4×MIK koncentracijama FA ekstrakta i emodina. Na osnovu dobijenih slika izračunate su i dobijene vrednosti hrapavosti površine biofilмова prikazane u Tabelama 15 i 16. Promene u morfologiji biofilмова, do kojih dovodi FA ekstrakt, ali i emodin, mogu se uočiti kod većine testiranih sojeva.

Tabela 15. Efekat FA ekstrakta na hrapavost biofilмова sojeva *S. aureus*

	Srednja kvadratna (RMS- root mean square) vrednost hrapavosti Rq [nm]					
	ATCC 25923	Gp41	Gp19	ATCC 43300	Gp29	Gp7
Netretirani biofilmovi	129,1	134,1	147,1	7,44	10,8	81,9
Biofilmovi tretirani FA	30,7	238,7	102,4	26,2	184,4	94,8

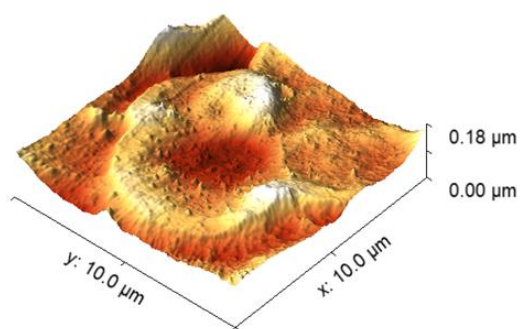
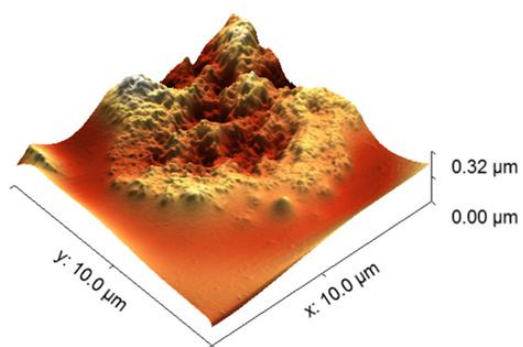
Tabela 16. Efekat emodina na hrapavost biofilмова sojeva *S. aureus*

	Srednja kvadratna (RMS- root mean square) vrednost hrapavosti Rq [nm]					
	ATCC 25923	Gp41	Gp19	ATCC 43300	Gp29	Gp7
Netretirani biofilmovi	31,8	105,5	116	109,4	182,1	157,8
Biofilmovi tretirani emodinom	84,6	230,7	99,9	66,4	117,1	133,1

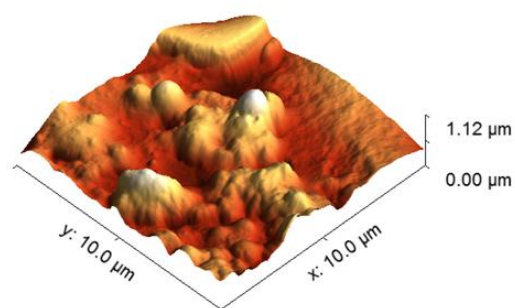
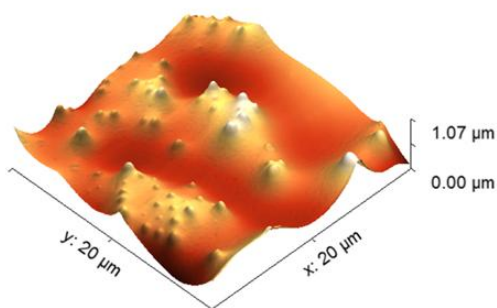
Razlike u topografiji tretiranih i netretiranih biofilмова oba referentna soja su evidentne, pod tretmanima obe test supstance. Naročito se promene uočavaju u tretmanu FA ekstraktom kod ATCC 25923 soja i kod soja ATCC 43300 pod tretmanom emodinom (Slika 28A i 31A). Ono što se takođe može uočiti kod tretiranih biofilмова ovih sojeva jeste sporadična pojava depresija koje sadrže ostatke biomase i ćelija. Ove rezultate podržavaju i podaci o hrapavosti površine biofilмова gde je kod MSSA referentnog soja hrapavost smanjena u tretmanu FA ekstraktom, a povećana u tretmanu emodinom, dok je kod MRSA referentnog soja situacija obrnuta (Tabela 15). Sličan efekat se može primetiti i na biofilmu MSSA Gp41 izolata, gde FA ekstrakt dovodi do pojave grupacija ali i udubljenja sa ostacima ćelija u njima, dok je hrapavost znatno povećana. Kada su u pitanju biofilmovi MRSA izolata tretiranih FA ekstraktom, vidljive su promene u morfologiji samih biofilмова. Naime, tretman kod soja Gp29 dovodi do pojave većeg broja grupacija ćelija uronjenih u veću količinu matriksa, dok se kod Gp7 može uočiti reorganizacija samog biofilma kao i veći broj ostataka ćelija i komponenata matriksa po obodima grupacija ćelija. Ove promene ogledaju se i u izmenjenoj hrapavosti tretiranih biofilмова ovih sojeva.

Kontrole

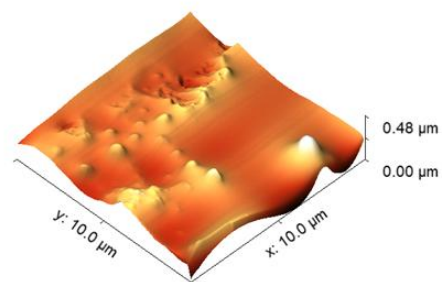
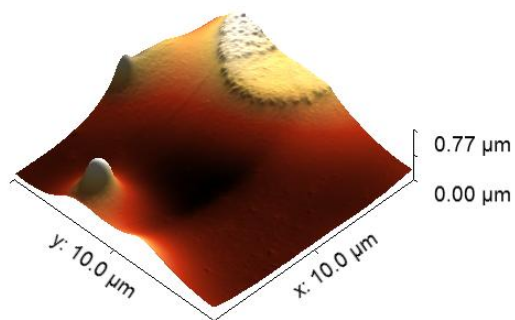
FA ekstrakt



A. ATCC 25923



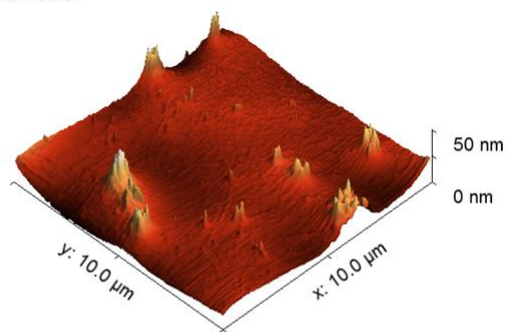
B. Gp41



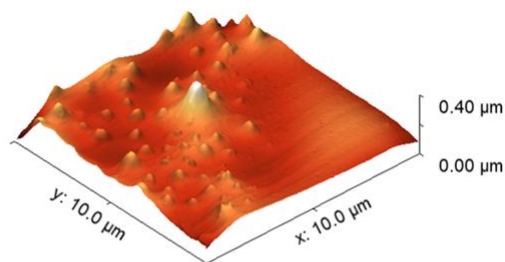
C. Gp19

Slika 28. AFM 3D topografije biofilmova MSSA sojeva *S. aureus* dobijene snimanjem polja $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Netretirani biofilmovi su prikazani sa leve strane, a sa desne strane biofilmovi tretirani sa $4 \times \text{MIK}$ koncentracijama FA ekstrakta.

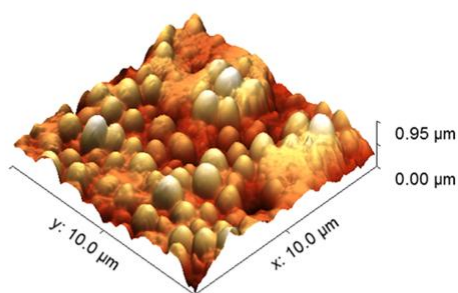
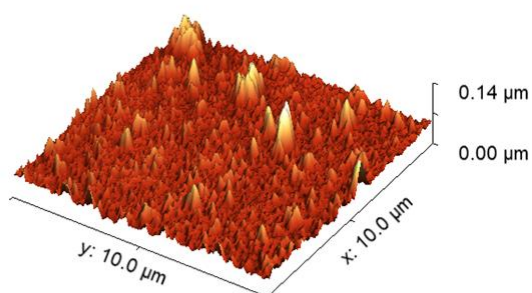
Kontrole



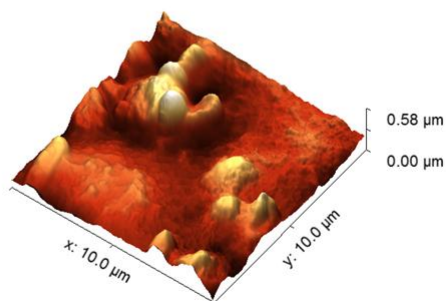
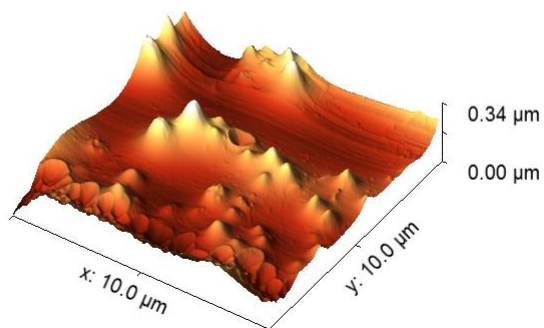
FA ekstrakt



A. ATCC 43300



B. Gp 29

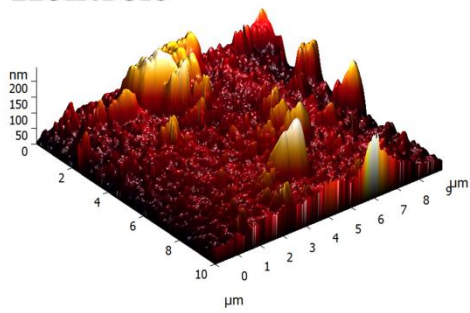


C. Gp7

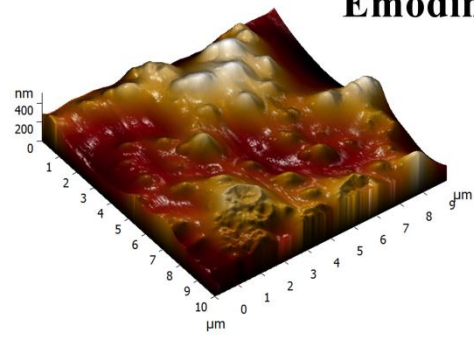
Slika 29. AFM 3D topografije biofilmova MRSA sojeva *S. aureus* dobijene snimanjem polja $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. Netretirani biofilmovi su prikazani sa leve strane, a sa desne strane biofilmovi tretirani sa $4\times\text{MIK}$ koncentracijama FA ekstrakta.

Sa druge strane, kod oba MSSA izolata, naročito soja Gp41, dosta manje ćelija se može uočiti kod emodinom tretiranih biofilmova nego u netretiranim biofilmovima. Osim toga, emodinom tretirani biofilm soja Gp41 se karakteriše sa samo nekoliko ćelijskih agregata uronjenih u matriks i ravnim domenima između njih (Slika 30B). Takođe, hrapavost biofilma ovog soja je skoro duplo veća u odnosu na netretirani biofilm. Slika tretiranog biofilma soja Gp19 ukazuje na razliku u morfologiji površine biofilma kao i znatno manji broj ćelija, dok je hrapavost skoro nepromenjena. 3D topografija tretiranog biofilma soja Gp29 pokazuje dosta manje ćelijskih agregata koji su okruženi ostacima biomase, a takođe je i hrapavost površine dosta manja. Nasuprot svim sojevima, tretirani biofilm izolata Gp7 je ostao nepromenjen.

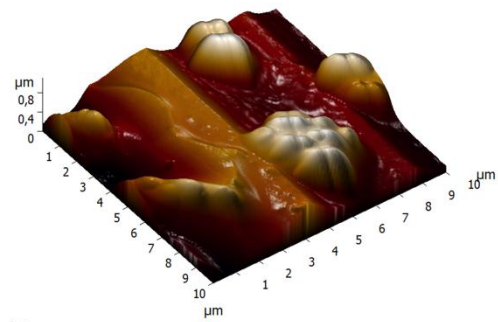
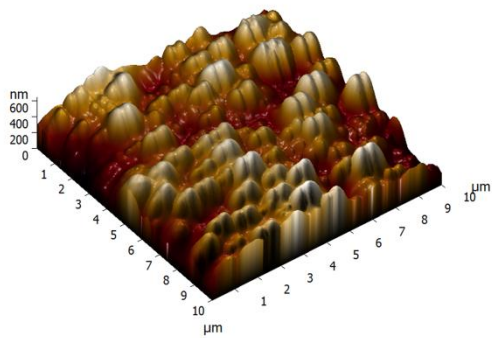
Kontrole



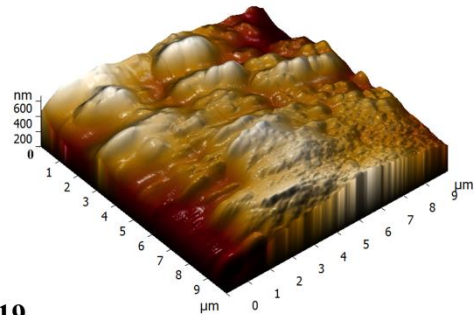
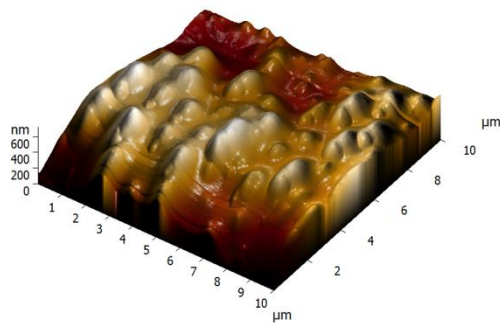
Emodin



A. ATCC 25923

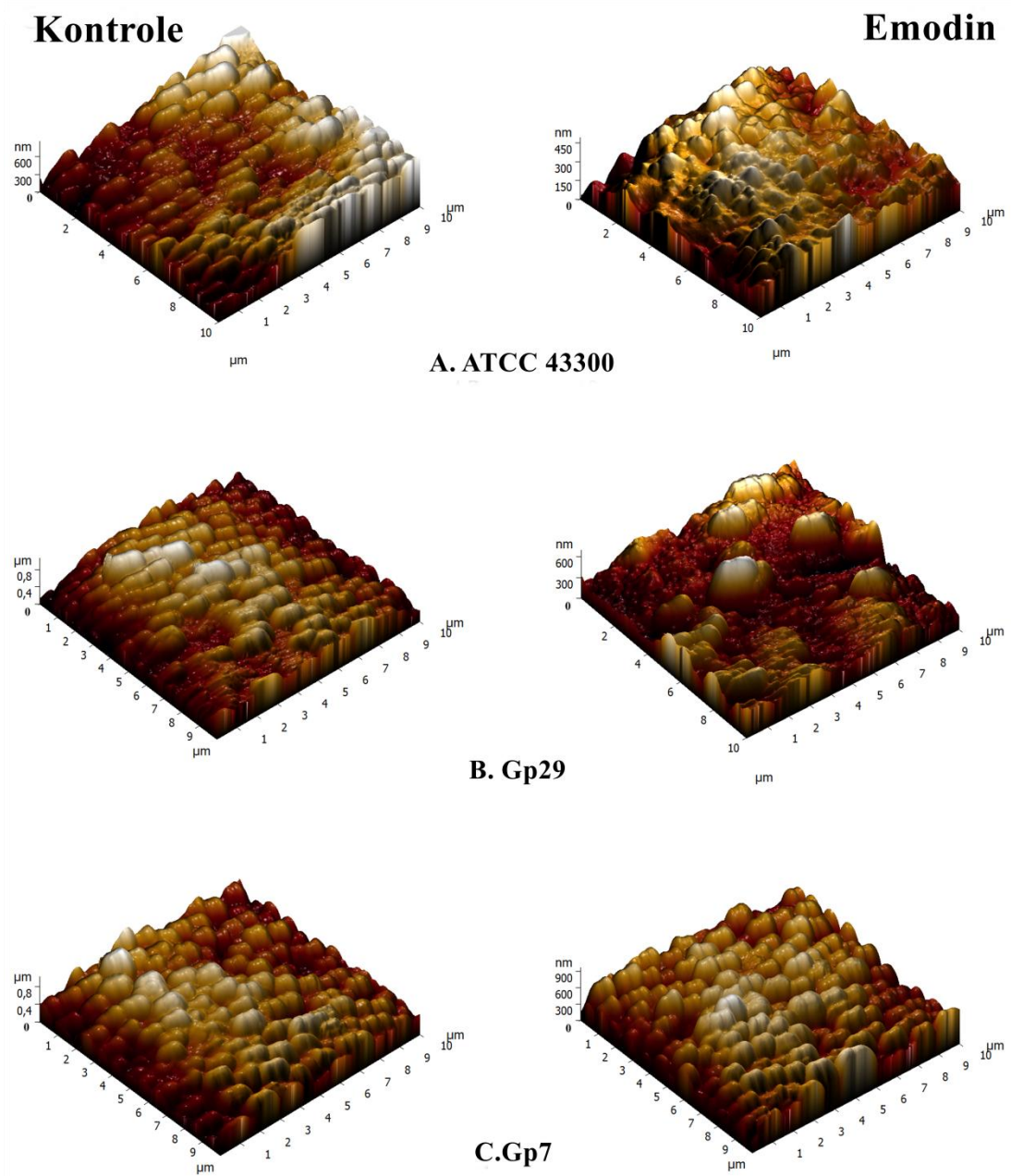


B. Gp41



C. Gp19

Slika 30. AFM 3D topografije biofilmova MSSA sojeva *S. aureus* dobijene snimanjem polja $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Netretirani biofilmovi su prikazani sa leve strane, a sa desne strane biofilmovi tretirani sa $4 \times \text{MIK}$ koncentracijama emodina.



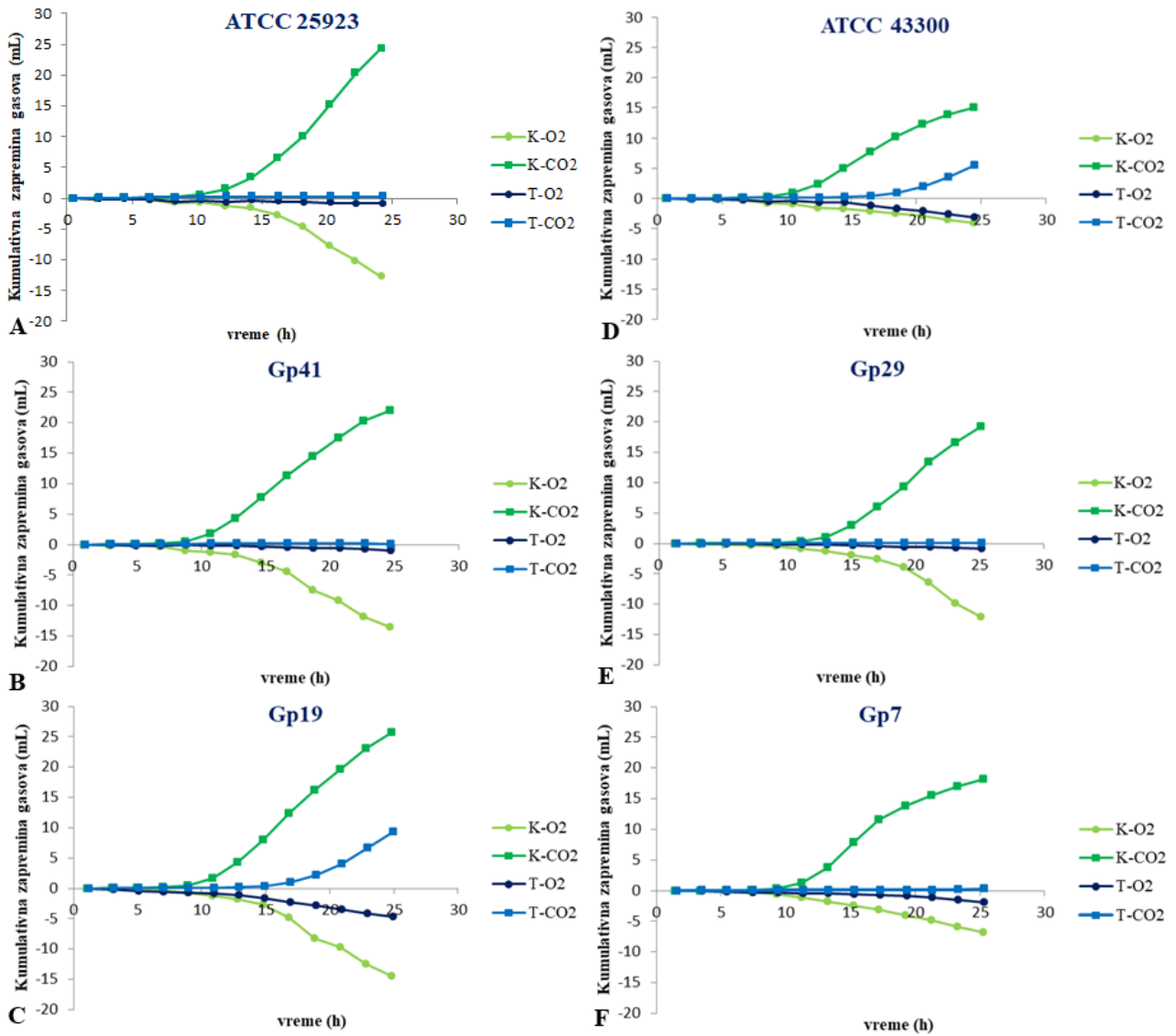
Slika 31. AFM 3D topografije biofilmova MRSA sojeva *S. aureus* dobijene snimanjem polja $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. Netretirani biofilmovi su prikazani sa leve strane, a sa desne strane biofilmovi tretirani sa $4\times\text{MIK}$ koncentracijama emodina.

4.3.4. Praćenje aerobne respiracije u planktonskoj i biofilm životnoj formi sojeva *S. aureus*

U cilju otkrivanja potencijalnog mehanizma delovanja test supstanci kao i veza između bakterijskog biofilma i metabolizma, praćena je aerobna respiracija kod sojeva *S. aureus* na zatvorenom 12-kanalnom sistemu Micro-Oxymax respirometra (Columbus Instruments, USA) povezanog sa računarom. Respiracija je praćena u planktonskom obliku i u već formiranim bakterijskim biofilmovima (Đukanović i sar., 2020; Đukanović i sar., 2021).

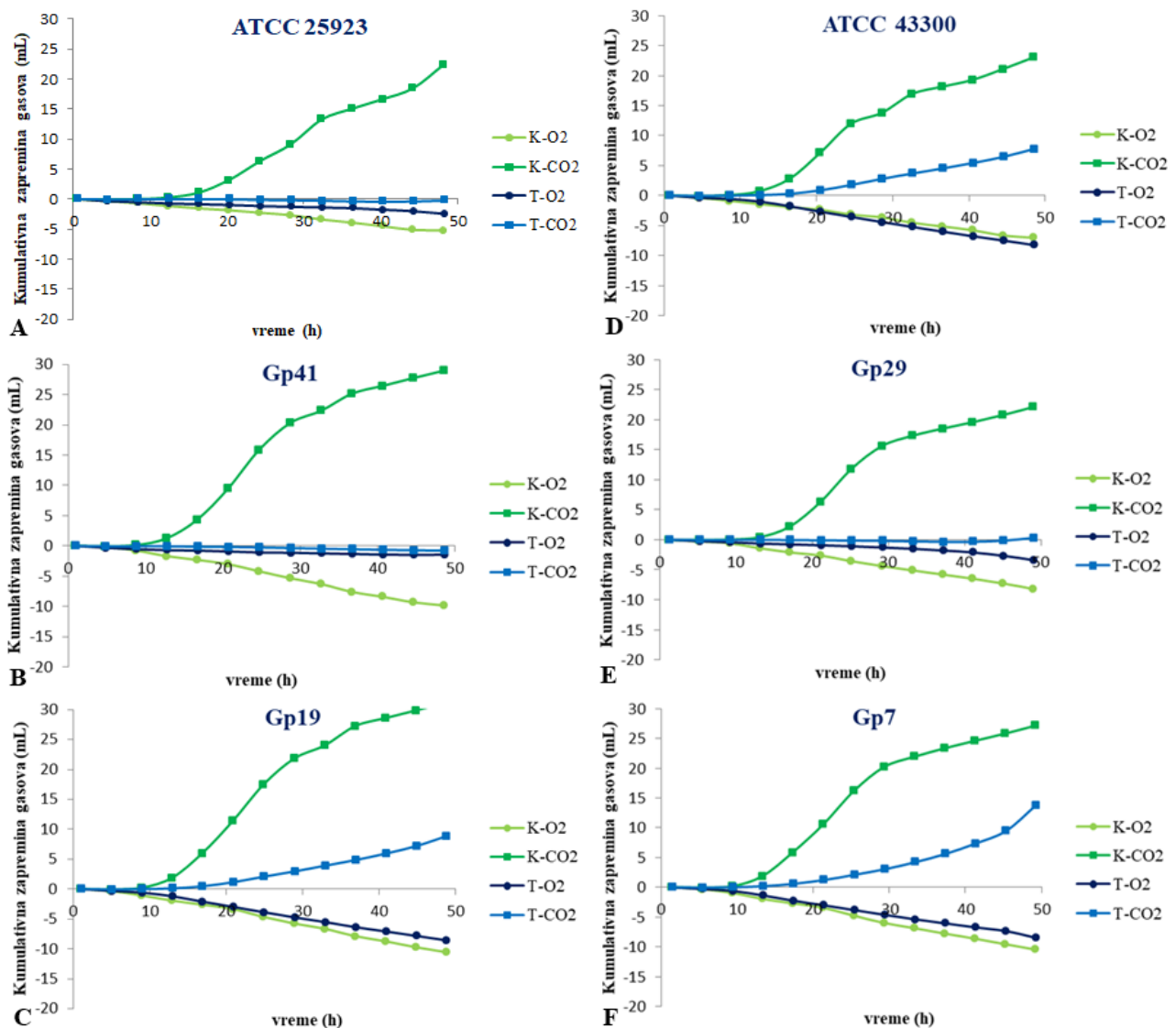
4.3.4.1. Uticaj FA ekstrakta, emodina i odabranih kombinacija na aerobnu respiraciju u planktonskom obliku

Kumulativna potrošnja O₂ i produkcija CO₂ pod uticajem subinhibitornih koncentracija test supstanci, praćena je na Micro-Oxymax respirometru tokom 24 h, u intervalu od 2 h, a rezultati su prikazani na Slici 32 i 33 i Tabeli 8.12 (prilog). FA ekstrakt je pokazao snažno delovanje na respiraciju svih testiranih sojeva, bilo da su u pitanju referentni sojevi, bilo klinički izolati (Slika 32). Najsnažniji efekat uočen je kod sojeva ATCC 25923, Gp41, Gp29 i Gp7, gde je inhibicija respiracije nakon 24 h bila preko 90 % (Tabela 8.12, prilog). Kod soja ATCC 43300, potrošnja kiseonika je ostala približno ista u kontroli i tretmanu, dok je produkcija ugljen-dioksida smanjena pri tretmanu FA ekstraktom.



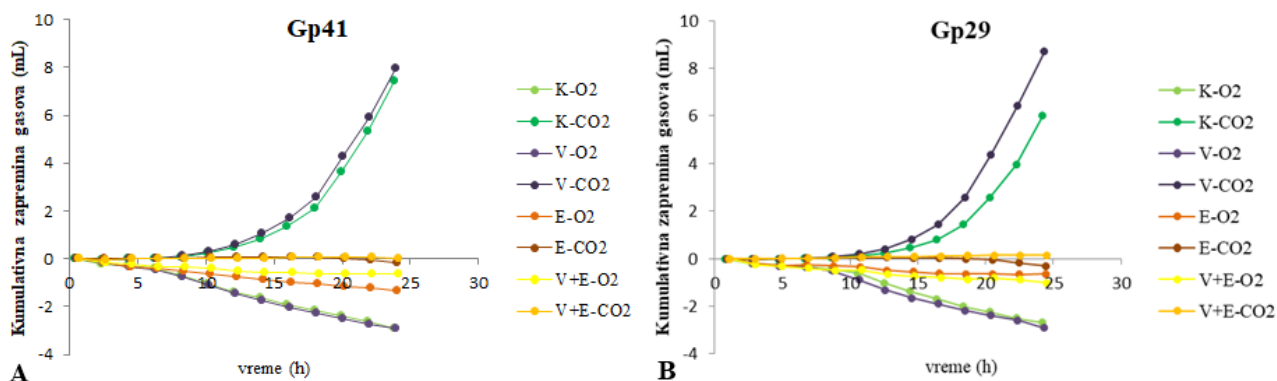
Slika 32. Efekat FA ekstrakta na kumulativnu potrošnju O₂ i produkciju CO₂ sojeva *S. aureus* A) ATCC25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29 i F) Gp7 u planktonskom obliku. K-O₂-kontrola kumulativne potrošnje O₂; K-CO₂-kontrola kumulativne proizvodnje CO₂; T-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u tretmanu; T-CO₂- kumulativna potrošnja CO₂ u tretmanu.

Za razliku od ekstrakta, emodin je pokazao nešto slabiji efekat na respiraciju u planktonskom obliku (Slika 33). Do skoro potpune inhibicije respiracije došlo je kod sojeva ATCC 25923, Gp41 i Gp29 sa najvećom inhibicijom kod Gp41 (85 % za O₂ i 100 % za CO₂). Kod sojeva ATCC 43300, Gp19 i Gp7, potrošnja kiseonika je neznatno smanjena dok je produkcija CO₂ smanjena u odnosu na netretirane sojeve.



Slika 33. Efekat emodina na kumulativnu potrošnju O₂ i produkciju CO₂ sojeva *S. aureus* A) ATCC25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29 i F) Gp7 u planktonskom obliku. K-O₂-kontrola kumulativne potrošnje O₂; K-CO₂-kontrola kumulativne proizvodnje CO₂; T-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u tretmanu; T-CO₂- kumulativna potrošnja CO₂ u tretmanu.

Prema dobijenim rezultatima u *checkerboard* testu, odabrano je da se efekat kombinacije emodina i vankomicina na aerobnu respiraciju u planktonskoj formi pratina sojevima Gp41 i Gp29. Posmatranjem Slike 34 može se uočiti da subinhibitorna koncentracija vankomicina nije dovela do promene u količini gasova, dok su sam emodin kao i kombinacija emodina i vankomicina uspešno inhibirali proces respiracije kod oba soja. Nakon 24 h, inhibicija gasova je kod soja Gp41 u kombinovanom tretmanu iznosila 77 % za O₂ i 100 % za CO₂ (Tabela 8.12, prilog, Slika 34A). Kod soja Gp29 najuspešniji je bio tretman emodinom gde je potrošnja O₂ inhibirana za 76% (Tabela 8.13 prilog).



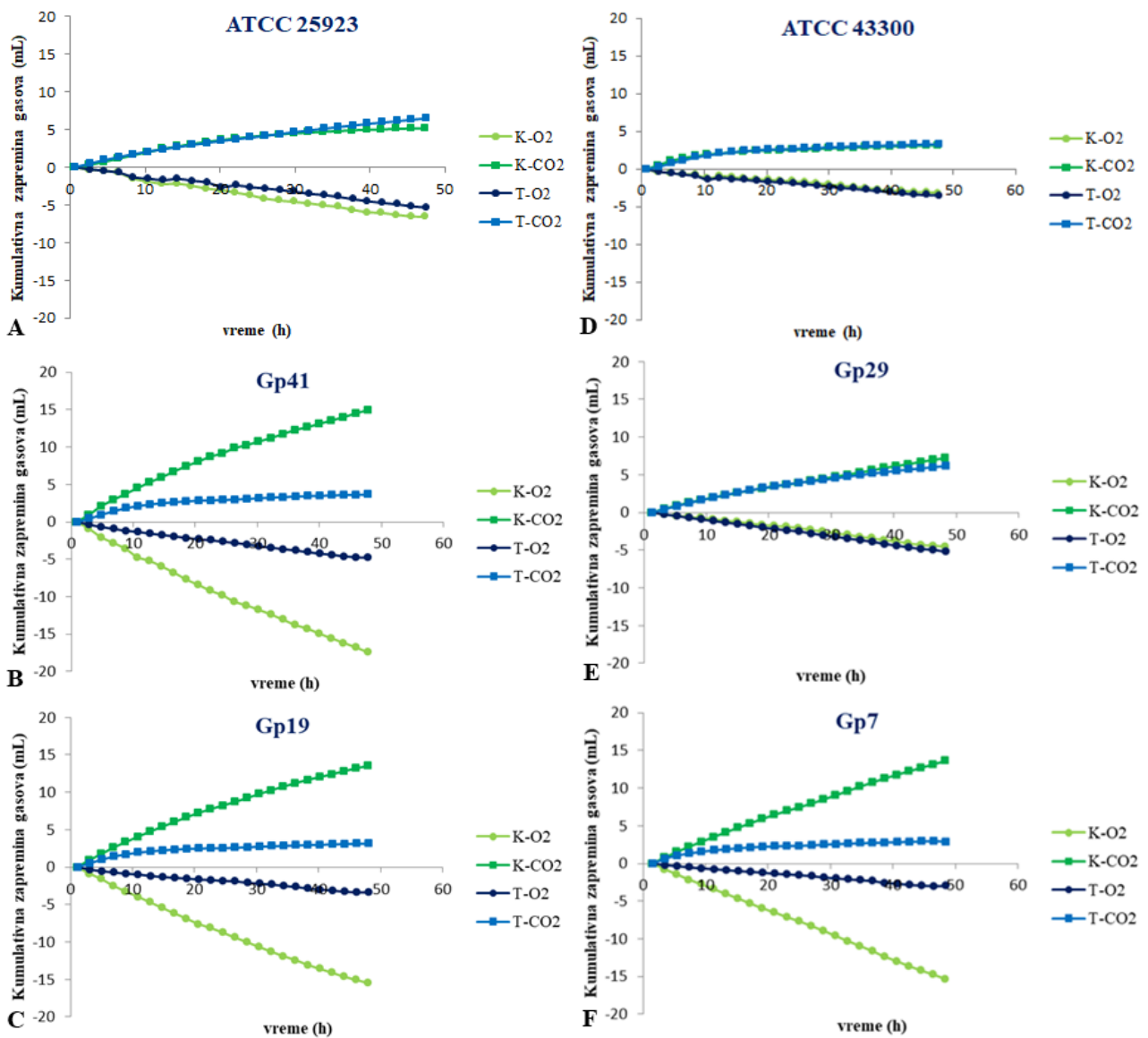
Slika 34. Efekat kombinacije emodina i vankomicina na kumulativnu potrošnju O₂ i produkciju CO₂ sojeva *S. aureus* A) Gp41 i B) Gp29 u planktonskom obliku.

K-O₂-kontrola kumulativne potrošnje O₂; K-CO₂-kontrola kumulativne proizvodnje CO₂; V-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u tretmanu vakomicinom; V-CO₂- kumulativna proizvodnja CO₂ u tretmanu vakomicinom; E-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u tretmanu emodinom; E-CO₂-kumulativna proizvodnja CO₂ u tretmanu emodinom; V+E-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u kombinovanom tretmanu; V+E-CO₂-kumulativna proizvodnja CO₂ u kombinovanom tretmanu.

4.3.4.2. Uticaj FA ekstrakta, emodina i odabranih kombinacija na aerobnu respiraciju u biofilmu

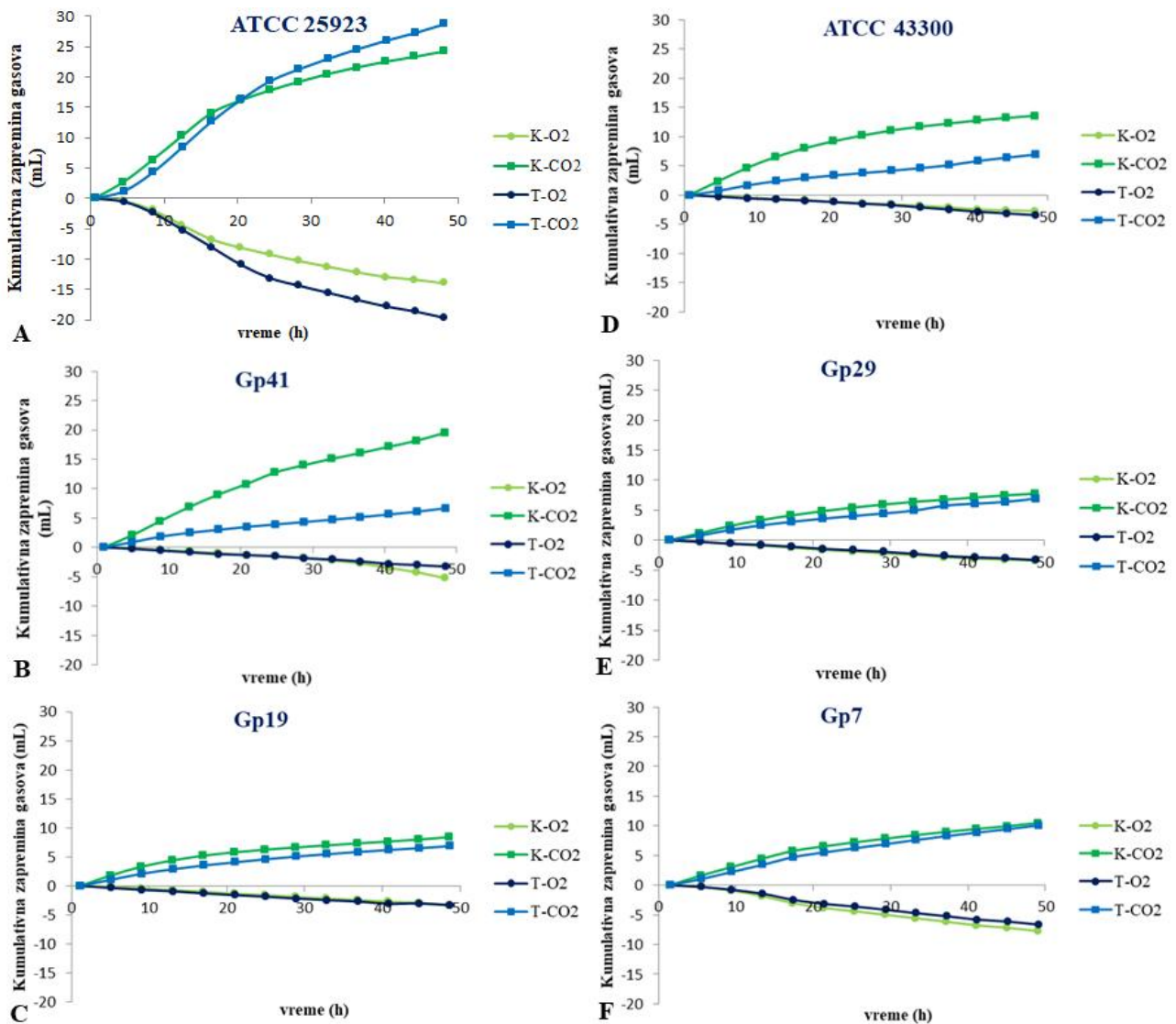
Formirani biofilmovi tretirani su koncentracijama test supstance 4×MIK i praćena je kumulativna potrošnja O₂ i produkcija CO₂ tokom 48h. Za ispitivanje kombinovanog efekta emodina i vankomicina odabrane su koncentracije dobijene u *checkerboard* testu za sojeve Gp41 i Gp29.

Respiracija pod uticajem FA ekstrakta u biofilmovima sojeva *S. aureus* prikazana je na Slici 35. U biofilmu kod tri klinička izolata (Gp41, Gp19 i Gp7) potrošnja O₂ i produkcija CO₂ bile su smanjene u tretmanima nakon 48 h (Slika 35B,C i F). Potrošnja O₂ bila je smanjena kod Gp41 za 72 %, kod Gp19 za 78 % i za 79 % kod Gp7 soja, dok je produkcija CO₂ bila smanjena približno 69 % (Tabela 8.12 prilog). FA ekstrakt, međutim nije uticao na respiraciju sojeva ATCC 25923, ATCC 43300 i Gp29.



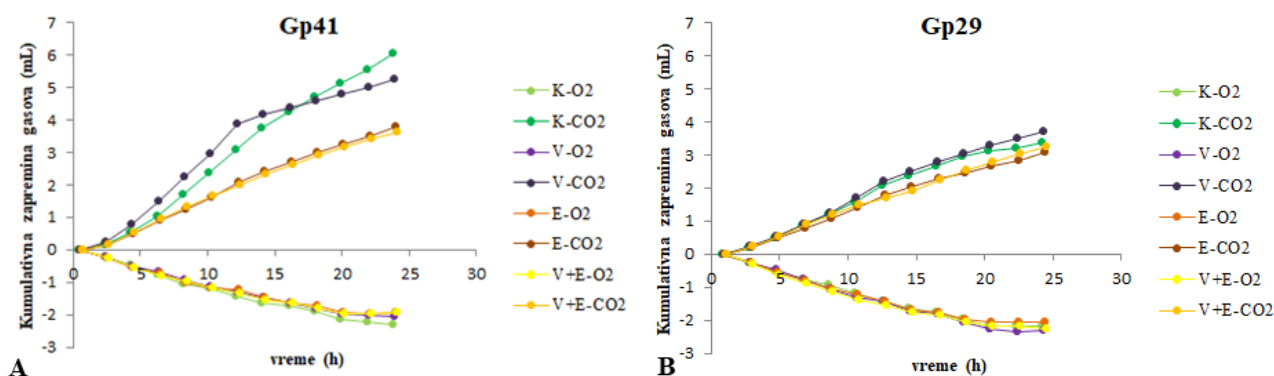
Slika 35. Efekat FA ekstrakta na kumulativnu potrošnju O₂ i produkciju CO₂ sojeva *S. aureus* A) ATCC25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29 i F) Gp7 u formiranom biofilmu. K-O₂-kontrola kumulativne potrošnje O₂; K-CO₂-kontrola kumulativne proizvodnje CO₂; T-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u tretmanu; T-CO₂- kumulativna potrošnja CO₂ u tretmanu.

Dalje, emodin je kod soja ATCC 25923 doveo do intenzivnije respiracije u biofilmu povećavajući i potrošnju i produkciju gasova (Slika 36A), dok je kod drugog referentnog soja (ATCC 43300) doveo do smanjene produkcije CO₂ za 48% (Slika 36D). Produkcija i potrošnja gasova bile su izmenjene kod kliničkog izolata Gp41: došlo je do 37 % smanjenja potrošnje O₂ i 6 5% smanjenja produkcije CO₂ (Slika 36B). Kod ostalih sojeva emodin nije uticao na intenzitet respiracije u biofilmu.



Slika 36. Efekat emodina na kumulativnu potrošnju O₂ i produkciju CO₂ sojeva *S. aureus* A) ATCC25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29 i F) Gp7 u formiranom biofilmu. K-O₂-kontrola kumulativne potrošnje O₂; K-CO₂-kontrola kumulativne proizvodnje CO₂; T-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u tretmanu; T-CO₂- kumulativna potrošnja CO₂ u tretmanu.

U biofilmovima sojeva Gp41 i Gp29 ispraćen je efekat kombinacije emodina i vankomicina (koncentracije odabrane na osnovu *checkerboard* testa) na aerobnu respiraciju (Slika 37). Kod Gp41 soja, može se primetiti da razlike u potrošnji O₂ pri tretmanima nema, dok se one uočavaju na nivou produkcije CO₂. Emodin i kombinovani tretman pokazali su inhibiciju produkcije CO₂ za 37 (Tabela 8.13 prilog). Respiracija soja Gp29 u biofilmu pod tretmanima bila je približno jednaka kontrolama.



Slika 37. Efekat kombinacije emodina i vankomicina na kumulativnu potrošnju O₂ i produkciju CO₂ sojeva *S. aureus* A) Gp41 i B) Gp29 u planktonskom obliku.

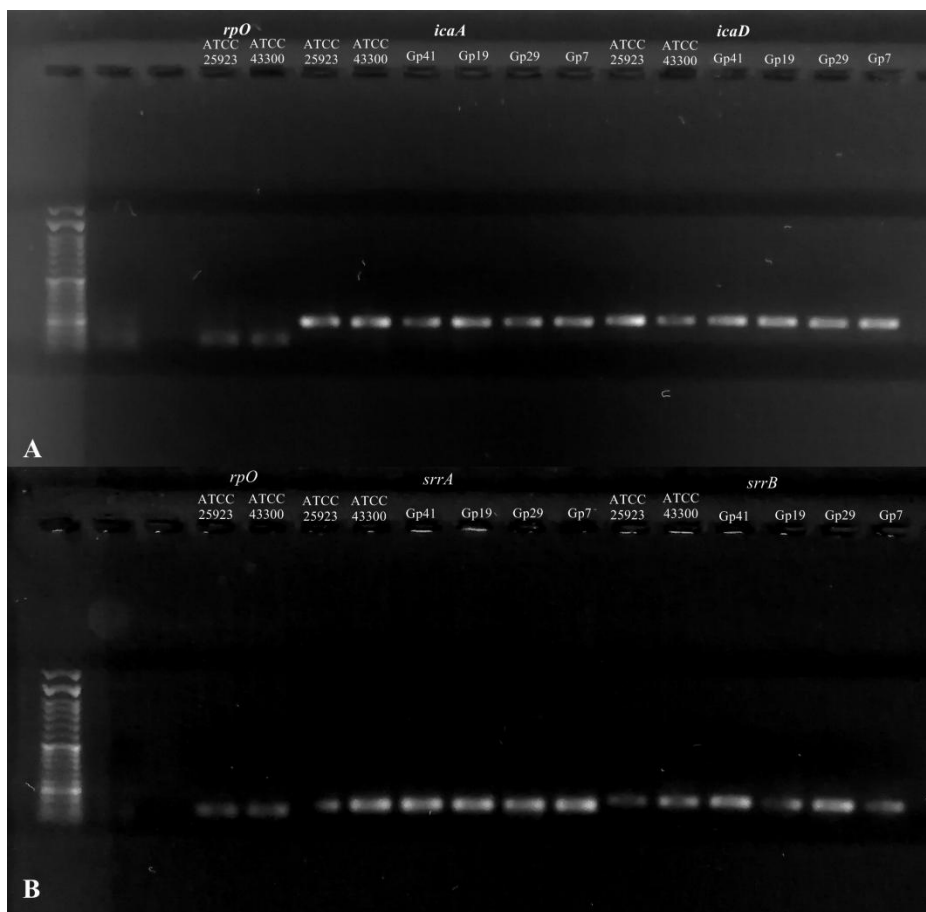
K-O₂-kontrola kumulativne potrošnje O₂; K-CO₂-kontrola kumulativne proizvodnje CO₂; V-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u tretmanu vakomicinom; V-CO₂- kumulativna proizvodnja CO₂ u tretmanu vakomicinom; E-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u tretmanu emodinom; E-CO₂-kumulativna proizvodnja CO₂ u tretmanu emodinom; V+E-O₂-kumulativna potrošnja O₂ u kombinovanom tretmanu; V+E-CO₂-kumulativna proizvodnja CO₂ u kombinovanom tretmanu.

4.3.5. Molekularne analize

U okviru ove celine, primenom PCR metode utvrđeno je prisustvo odabranih gena kod referentnih sojeva i kliničkih izolata *S. aureus*. Dalje je primenom qRT-PCR metode ispraćen efekat FA ekstrakta i emodina na ekspresiju odabranih gena kao i mikro RNK (RNAIII) (Đukanović i sar., 2021).

4.3.5.1. Detekcija odabranih gena kod sojeva *S. aureus*

PCR metodom su umnoženi DNK fragmenti testiranih sojeva koji su potom vizuelizovani na agaroznom gelu, što je prikazano na Slici 38. Potvrđeno je da svi sojevi poseduju odabrane gene (*icaA*, *icaD*, *srrA* i *srrB*).

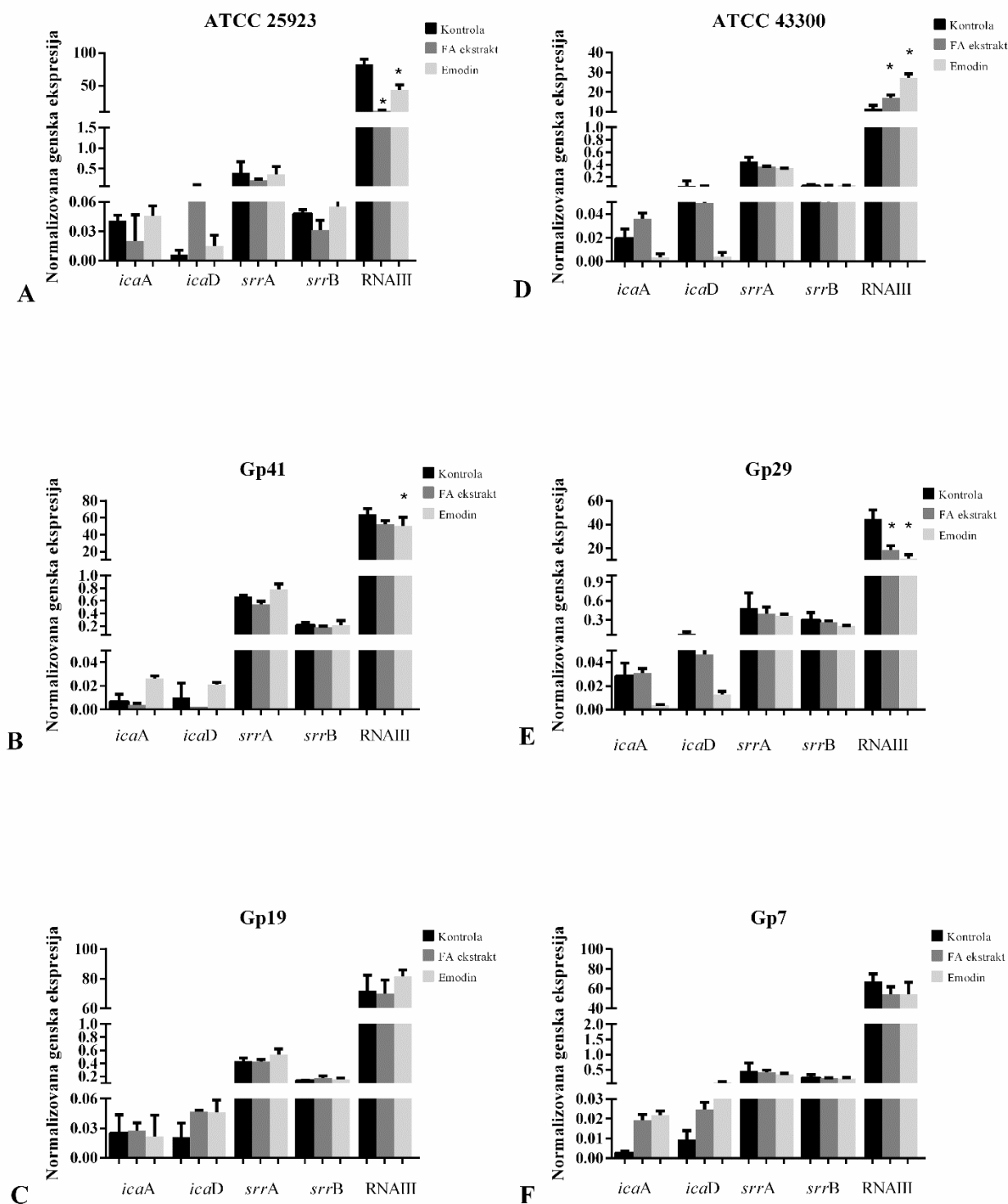


Slika 38. Elektroforeza na agaroznom gelu dobijenih PCR produkata dobijenih upotrebom specifičnih prajmera za A) *icaA*, *icaD* i *rpO* i B) *srrA* i *srrB* i *rpO* gene. Prvi red: marker molekularne mase 50 – 1500 bp; *rpO* produkti 80 bp; *icaA* produkt 188 bp; *icaD* produkt 198 bp; *srrA* produkt 108 bp; *srrB* produkt 132 bp.

4.3.5.2. Efekat FA ekstrakta i emodina na ekspresiju odabranih gena u biofilmu sojeva *S. aureus*

Efekat FA ekstrakta i emodina na ekspresiju *icaA*, *icaD*, *srrA* i *srrB* gena kao i mikro RNK RNA III praćen je primenom kvantitativne PCR metode u realnom vremenu. Za potrebe ovog istraživanja biofilmovi *S. aureus* su tretirani koncentracijama test supstanci 4×MIK. Na osnovu dobijenih rezultata koji su prikazani na Slici 39 može se primetiti da efekti test supstanci variraju od soja do soja. Kod MSSA sojeva FA ekstrakt je smanjio ekspresiju *icaA* gena u slučaju ATCC25923 i Gp41, dok je kod soja Gp19 ekspresija nepromenjena. Dalje, na drugi gen iz *ica* operona (*icaD*) ekstrakt je blago povišio ekspresiju kod sojeva ATCC 25923 i Gp19. Sa druge strane, emodin je povećao ekspresiju oba gena iz *ica* operona kod svih MSSA sojeva, osim u slučaju gena *icaA* u soju Gp19. Nasuprot MSSA sojevima, kod MRSA sojeva, ekstrakt je uticao na povećanje ekspresije *icaA* gena (ATCC 43300 i Gp7), dok je ekspresija *icaD* gena bila smanjena kod sojeva ATCC 43300 i Gp29. Emodin je kod MRSA sojeva, osim Gp7, doveo do smanjenja ekspresije gena iz *ica* operona. Kada su u pitanju geni iz dvokomponentnog sistema *srrAB*, kod svih sojeva osim Gp19 i Gp7, FA ekstrakt je doveo do blago smanjene ekspresije oba gena. Sa druge strane, emodin je povećao ekspresiju *srrA* i *srrB* gena kod MSSA sojeva. Međutim, svi efekti nisu bili signifikantni, odnosno statistički su bez značaja. Posmatrajući rezultate dobijene za ekspresiju mikro RNK RNAIII, može se uočiti da je ekspresija pod uticajem FA ekstrakta bila smanjena kod svih sojeva, osim ATCC 43300 gde je došlo do povećanja ekspresije. Statistički značajne promene zabeležene su kod oba ATCC soja, kao i Gp41 i Gp29 izolata. Statistički značajno redukovana

ekspresija pod tretmanom emodinom uočena je kod sojeva ATCC 25923, Gp41 i Gp29. Emodin je kod soja ATCC 43300 doveo do statistički značajnog povećanja u ekspresiji RNA III.



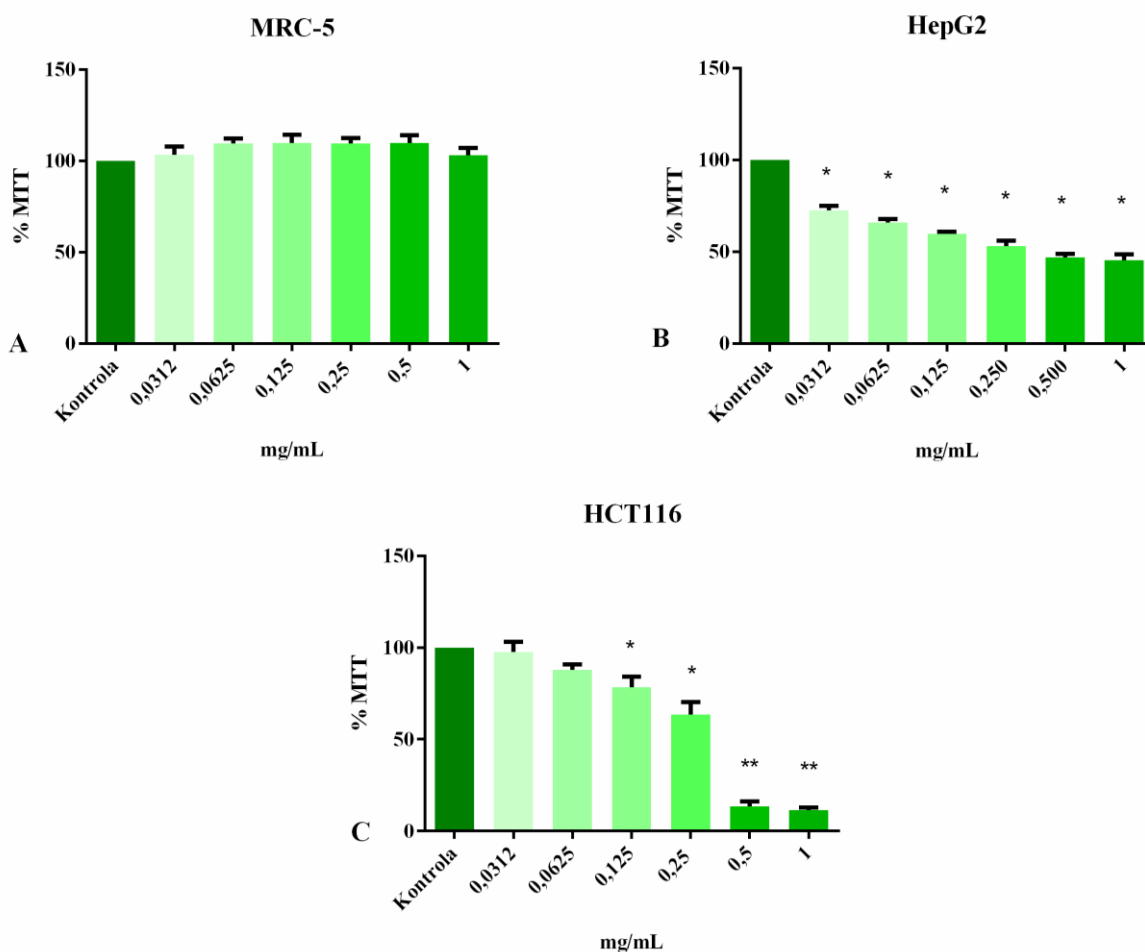
Slika 39. Uticaj FA ekstrakta i emodina na ekspresiju odabranih gena kod sojeva *S. aureus* A) ATCC 25923, B) Gp41, C) Gp19, D) ATCC 43300, E) Gp29 i F) Gp7. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$

4.4. Citotoksična aktivnost FA ekstrakta i emodina

U okviru ove celine istraživanja, ispitana je citotoksična aktivnost FA ekstrakta i emodina na normalnoj ćelijskoj liniji plućnih fibroblasta (MRC-5), kao i na dve kancerske ćelijske linije, liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2) i kancera kolona (HCT116). Prvobitno je primenom MTT testa praćen efekat na preživljavanje odabranih ćelijskih linija, a potom u cilju utvrđivanja potencijalnog mehanizma delovanja test supstanci, praćen je efekat na ćelijski ciklus, tip ćelijske smrti i mitohondrijski membranski potencijal ćelija.

4.4.1. Efekat FA ekstrakta i emodina na preživljavanje odabranih ćelijskih linija

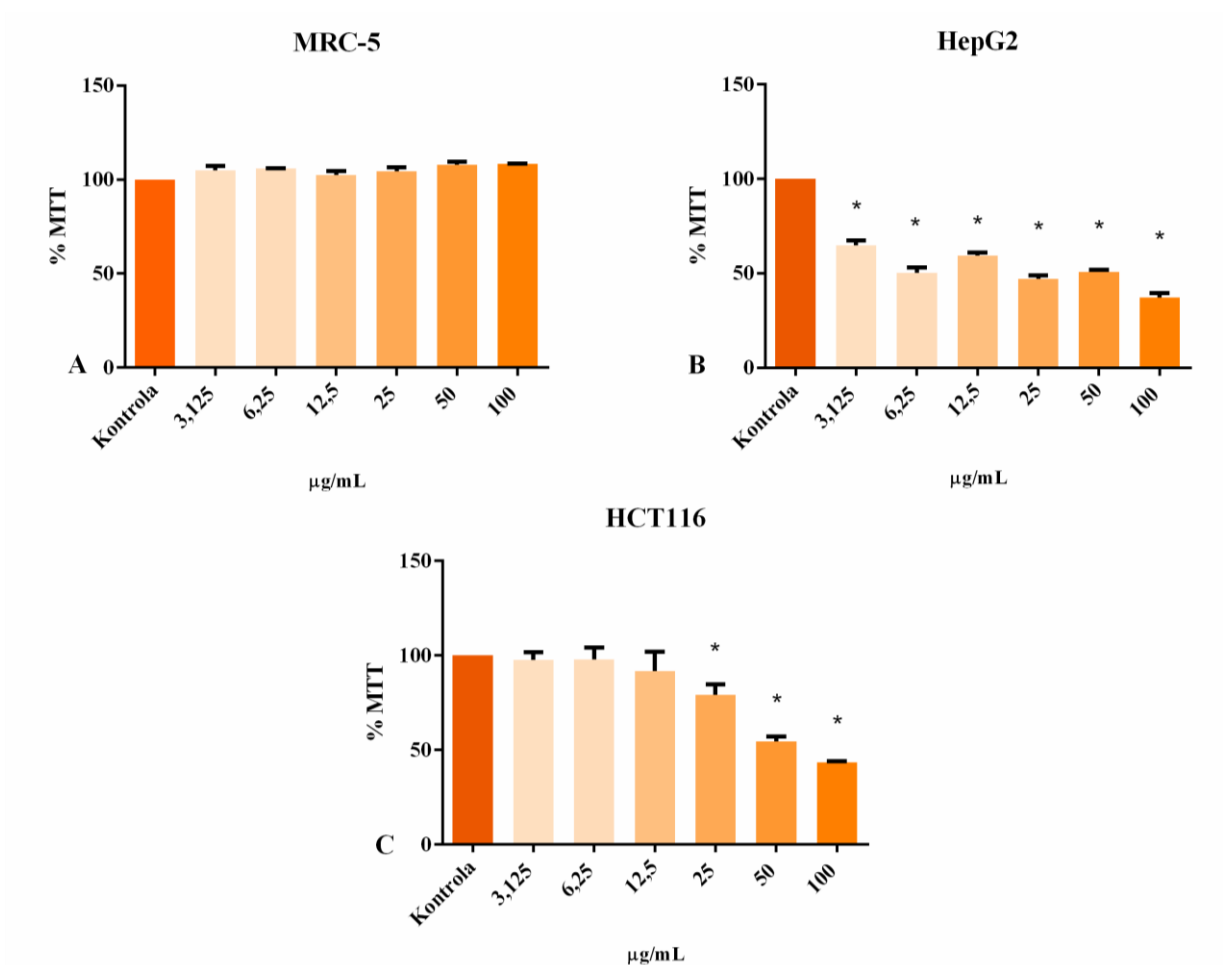
Primenom MTT testa ispitana je efekat test upstanci na metaboličku aktivnost odabranih ćelijskih linija koja predstavlja rezultat proliferacije i smrti ćelija u kulturi. Test supstance nisu ispoljile efekat prema MRC-5 ćelijskoj liniji, što se može uočiti na Slikama 40 i 41.



Slika 40. Efekat FA ekstrakta na metaboličku aktivnost MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT-116 (C) ćelijske linije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije. * $p < 0,05$

Kada je HepG2 ćelijska linija u pitanju, FA ekstrakt i emodin su pokazali inhibitorski efekat. FA ekstrakt je izazvao dozno-zavisni odgovor, pri čemu se procenat inhibicije metaboličke aktivnosti kretao od 27 % do 54 % (Slika 40B). Emodin je na svim testiranim koncentracijama pokazao inhibitorski potencijal (35 – 62,8 %), sa najvećim procentom inhibicije od 62,8 % na najvećoj testiranoj koncentraciji (Slika 41B). Dozno-zavisni efekat obe test supstance uočen je i kod HCT116 ćelijske linije. Procenat inhibicije pod tretmanom FA ekstraktom se kretao od 2 % do 88 %, s tim da je najveći procenat inhibicije zabeležen na dve najviše testirane koncentracije (0,5

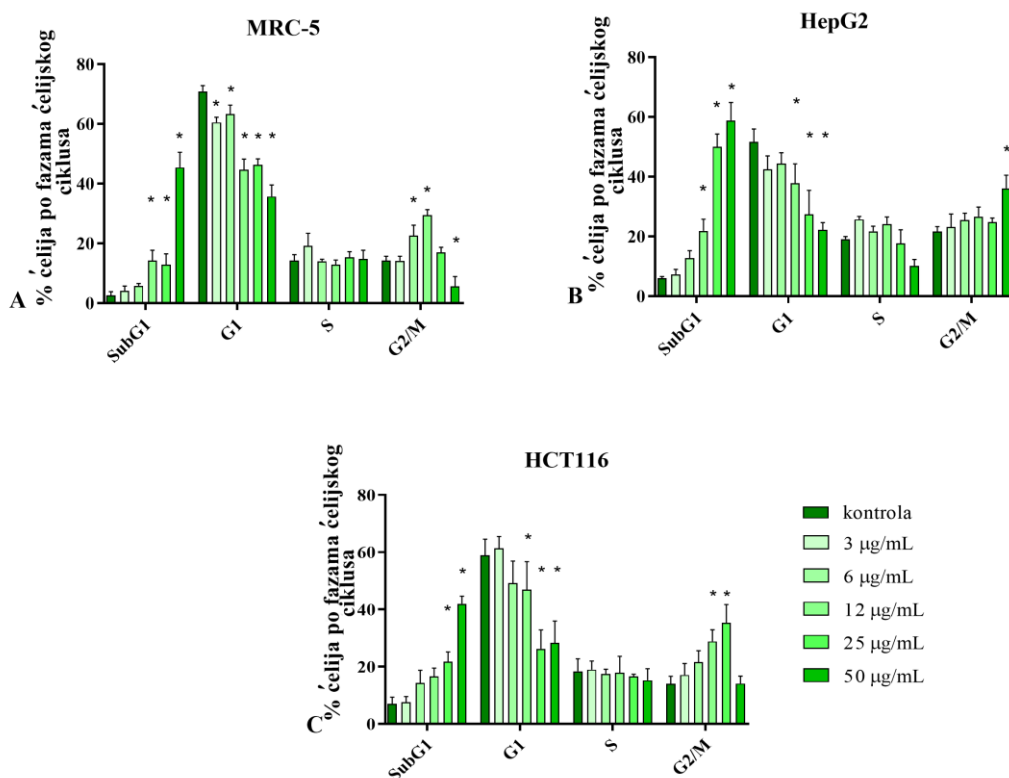
mg/mL i 1 mg/mL) (Slika 40C). Kada je u pitanju tretman emodinom, efekat je nešto slabiji i procenat inhibicije je u opsegu od 2 % do 56 %. I u ovom slučaju je najveći efekat zabeležen na dve najviše testirane koncentracije (Slika 41C).



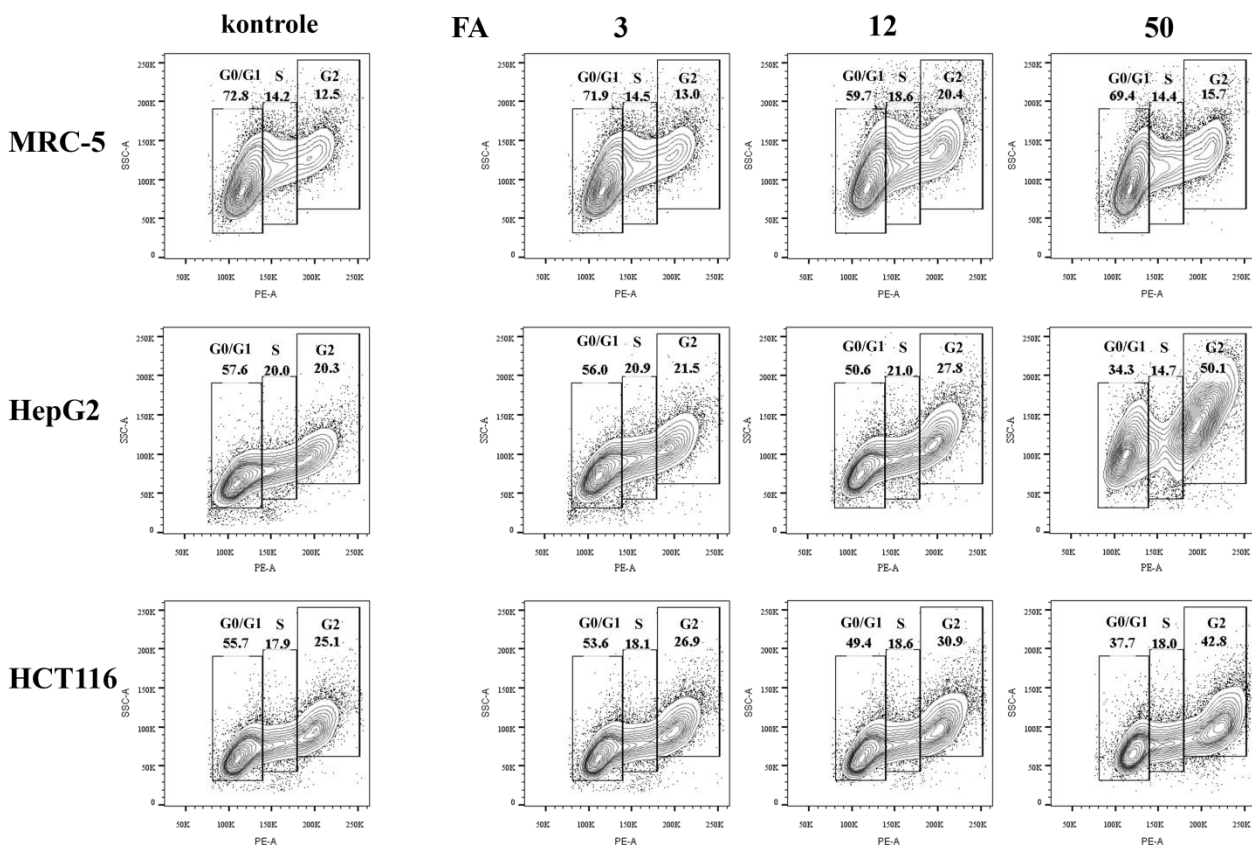
Slika 41. Efekat emodina na metaboličku aktivnost MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT-116 (C) ćelijske linije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije. * p<0,05

4.4.2. Efekat FA ekstrakta i emodina na ćelijski ciklus odabranih ćelijskih linija

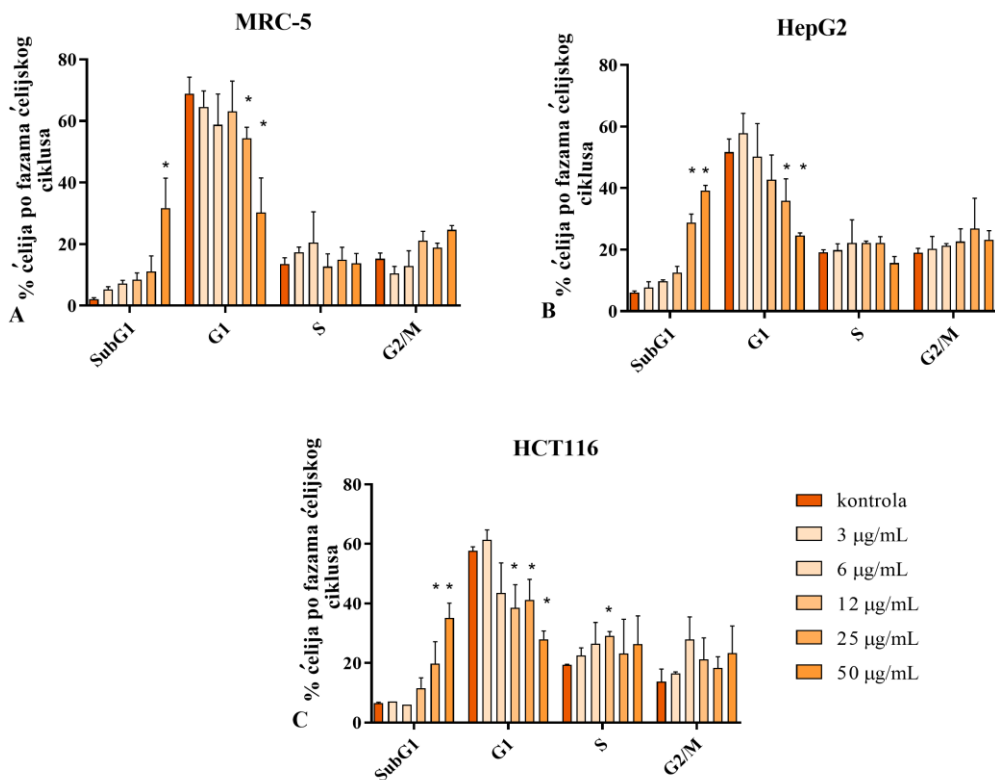
Efekat ispitivanih test supstanci na raspoređivanje ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, analiziran je protočnom citometrijom. Kako rezultati MTT testa ukazuju na smanjenje metaboličke aktivnosti, cilj je bio ispitati koliko ćelijska proliferacija dovodi do ovakvog fenomena. Stoga je prvo praćen efekat na ćelijski ciklus ćelijskih linija. Ono što se može uočiti kod svih ćelijskih linija, ali i oba tretmana, jeste trend u zastoju ćelijskog ciklusa u S fazi, ali i blagog nakupljanja ćelija u G2/M fazi (Slika 42, 44) što se vidi i na reprezentativnim dijagramima (Slika 43 i 45). Primećuje se i veliki broj apoptotičnih ćelija u subG1 fazi. Naime, sa porastom testiranih koncentracija raste broj ćelija u subG1 fazi (do 45 % u tretmanu FA ekstraktom i do 31% u tretmanu emodinom), doznazavisno opada broj ćelija u G1 fazi, jasno je primetan zastoj u S fazi na svim testiranim koncentracijama obe testirane supstance, a potom dolazi do blagog nakupljanja u poslednjoj, G2/M fazi. Može se uočiti da najviša testirana koncentracija ekstrakta (50 µg/mL) kod MRC-5 ćelijske linije dovodi do statistički značajnog pada u broju ćelija u G2/M fazi dok, nasuprot, kod HepG2 dolazi do statistički značajnog povećanja broja ćelija u ovoj fazi (Slike 42-45).



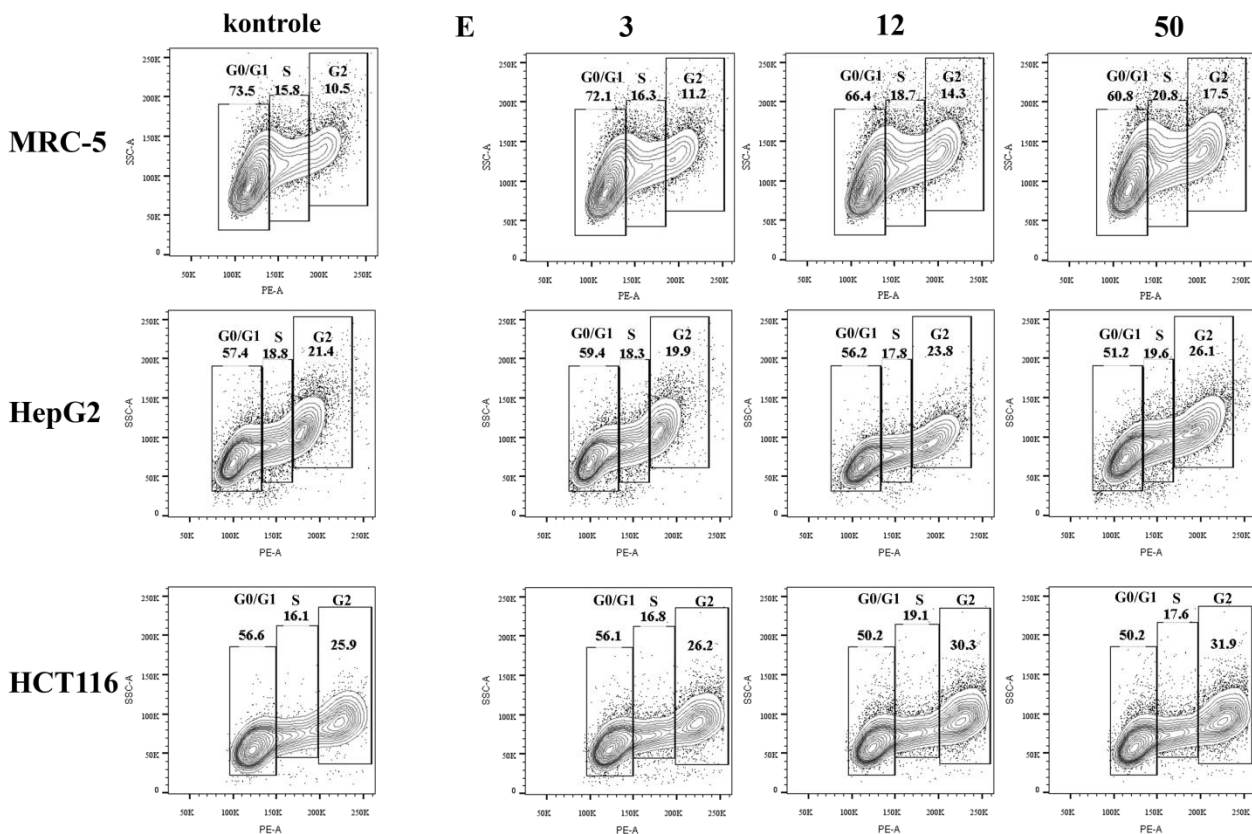
Slika 42. Efekat FA ekstrakta na raspodelu MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT116 (C) ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije. * p<0,05



Slika 43. Efekat određenih koncentracija FA ekstrakta na ćelijski ciklus MRC-5, HepG2 i HCT116 ćelijskih linija. Na slici su prikazani reprezentativni tačkasti dijagrami analize kao i naveden procenat vijabilnih ćelija u G0/G1, S i G2 fazi ciklusa jednog od tri nezavisna eksperimenta.



Slika 44. Efekat emodina na raspodelu MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT116 (C) ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije. * $p < 0,05$

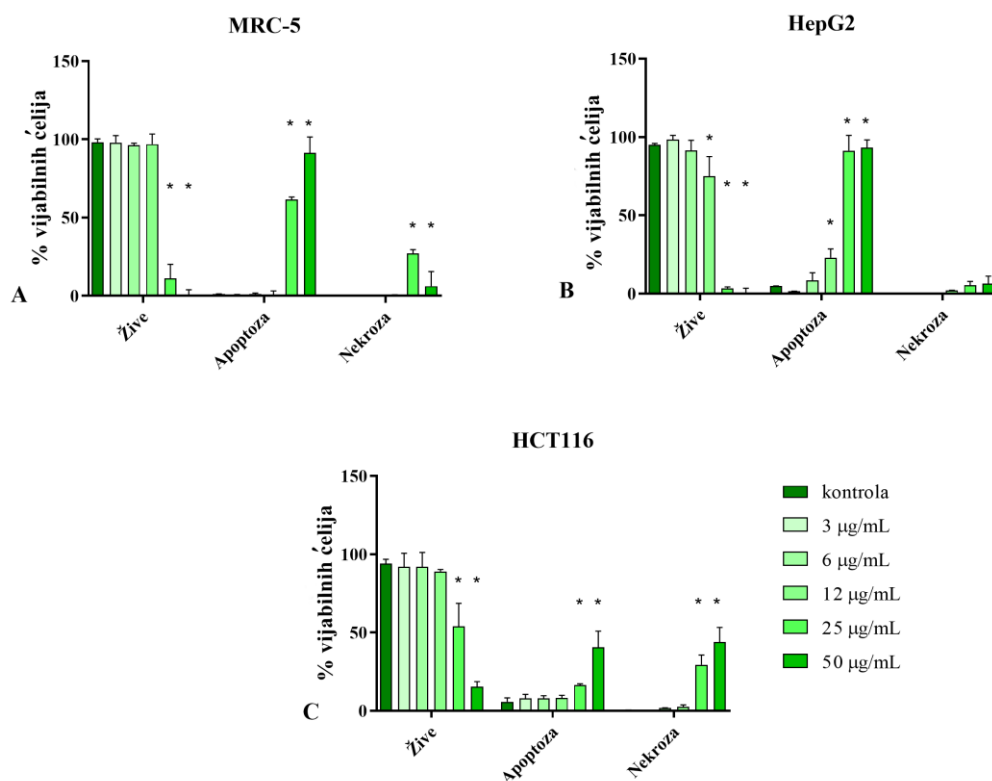


Slika 45. Efekat određenih koncentracija emodina na ćelijski ciklus MRC-5, HepG2 i HCT116 ćelijskih linija. Na slici su prikazani reprezentativni tačkasti dijagrami analize kao i naveden procenat vijabilnih ćelija u G0/G1, S i G2 fazi ciklusa jednog od tri nezavisna eksperimenta.

4.4.3. Analiza tipa ćelijske smrti indukovane FA ekstraktom i emodinom na odabranim ćelijskim linijama

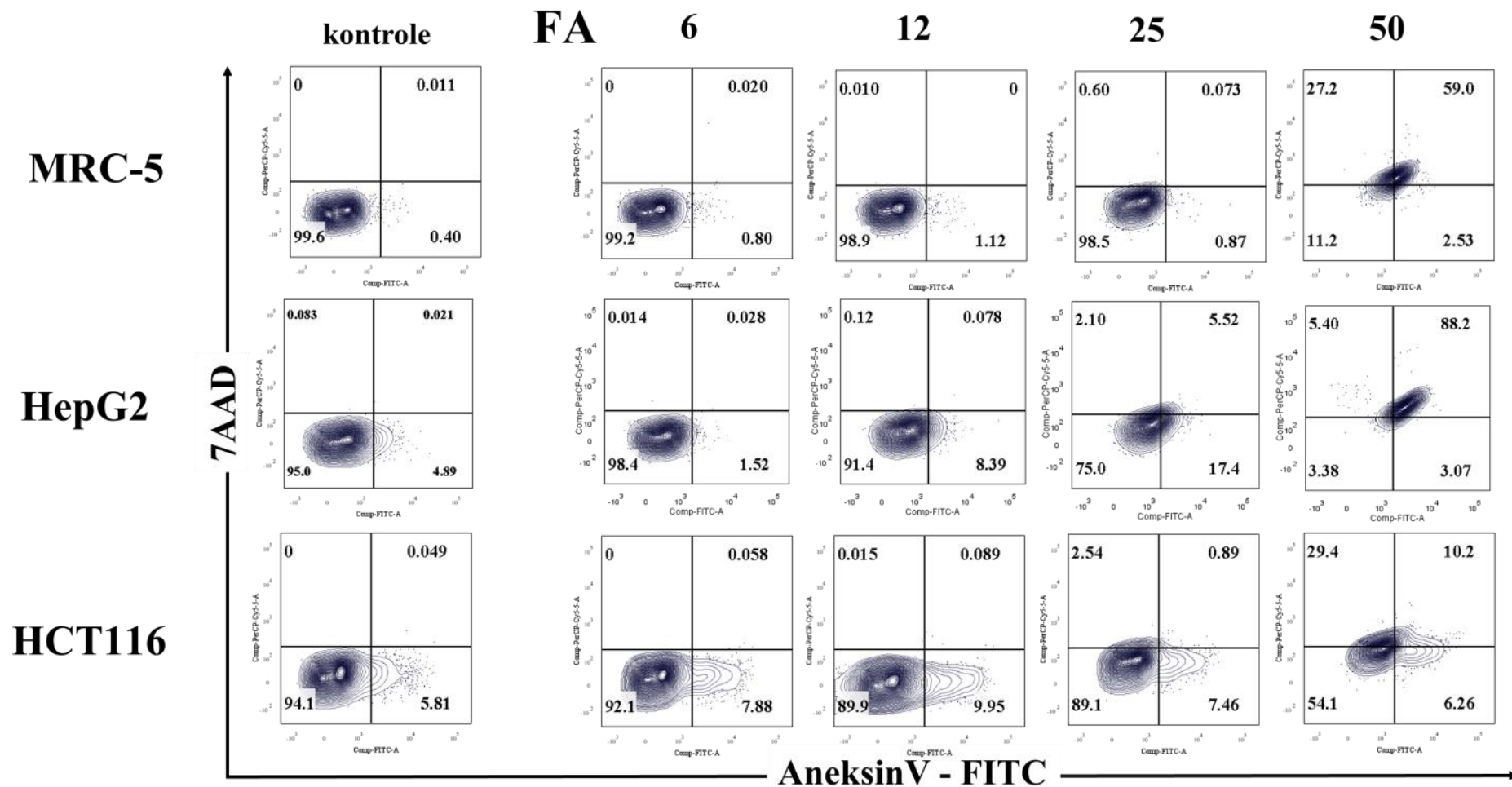
Tip ćelijske smrti koju indukuju test supstance kod odabranih ćelijskih linija, analiziran je takođe protočnom citometrijom. Dobijeni rezultati su prikazani grafički, ali i reprezentativnim kontur plotovima ćelija po tipovima ćelijske smrti. Jasno se može primetiti da sa porastom primenjenih doza i FA ekstrakta i emodina, opada broj vijabilnih ćelija kod svih ćelijskih linija (Slika 46 i 48).

Kod MRC-5 ćelijske linije pad u % vijabilnih ćelija se javlja naglo pod uticajem FA ekstrakta i uočljiv je na dve najviše testirane koncentracije (25 μg/mL i 50 μg/mL), kod ostalih ćelijskih linija se može zapaziti i na ostalim testiranim koncentracijama. Nadalje, sa porastom koncentracija raste i broj apoptotičnih ćelija, te je kod MRC-5 i HepG2 ćelijske linije procenat apoptotičnih ćelija, na najvišoj testiranoj koncentraciji, oko 90 %.



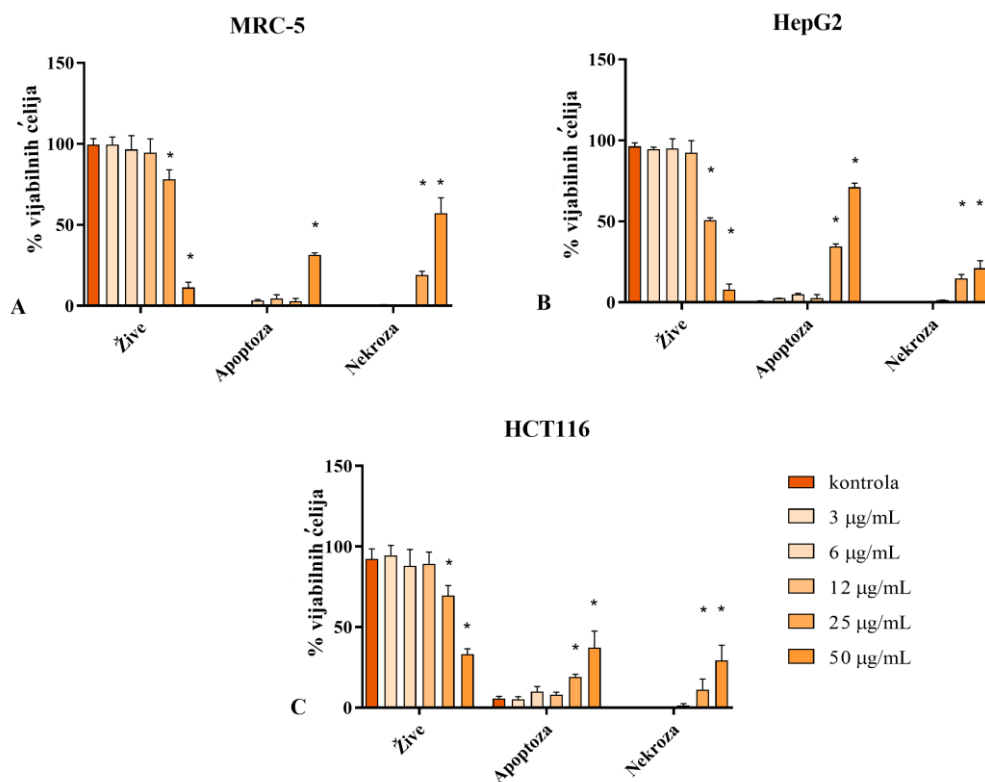
Slika 46. Efekat FA ekstrakta na indukciju ćelijske smrti kod MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT116 (C) ćelijskih linija. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije. * $p < 0,05$

Dok se kod MRC-5 ćelijske linije uočava nagli ulazak u apoptozu, kod kancerskih ćelijskih linija (HepG2 i HCT116) ova pojava je nešto postepenija, naročito kod HCT 116 linije gde se primećuje jasan dozno zavisani efekat FA ekstrakta. Takođe, može se primetiti i da ekstrakt na najvišoj testiranoj koncentraciji dovodi i do porasta broja ćelija koje su u nekrozi. Ovakve rezultate podržava i reprezentativni primer kvadrantne raspodele ćelijskih populacija u ranoj i kasnoj apoptozi, kao i nekrozi (Slika 47). Na ovoj slici, primećujemo da se na dve najviše koncentracije ekstrakta, više ćelijskih populacija nalazi u kasnoj apoptozi, ali i nekrozi.

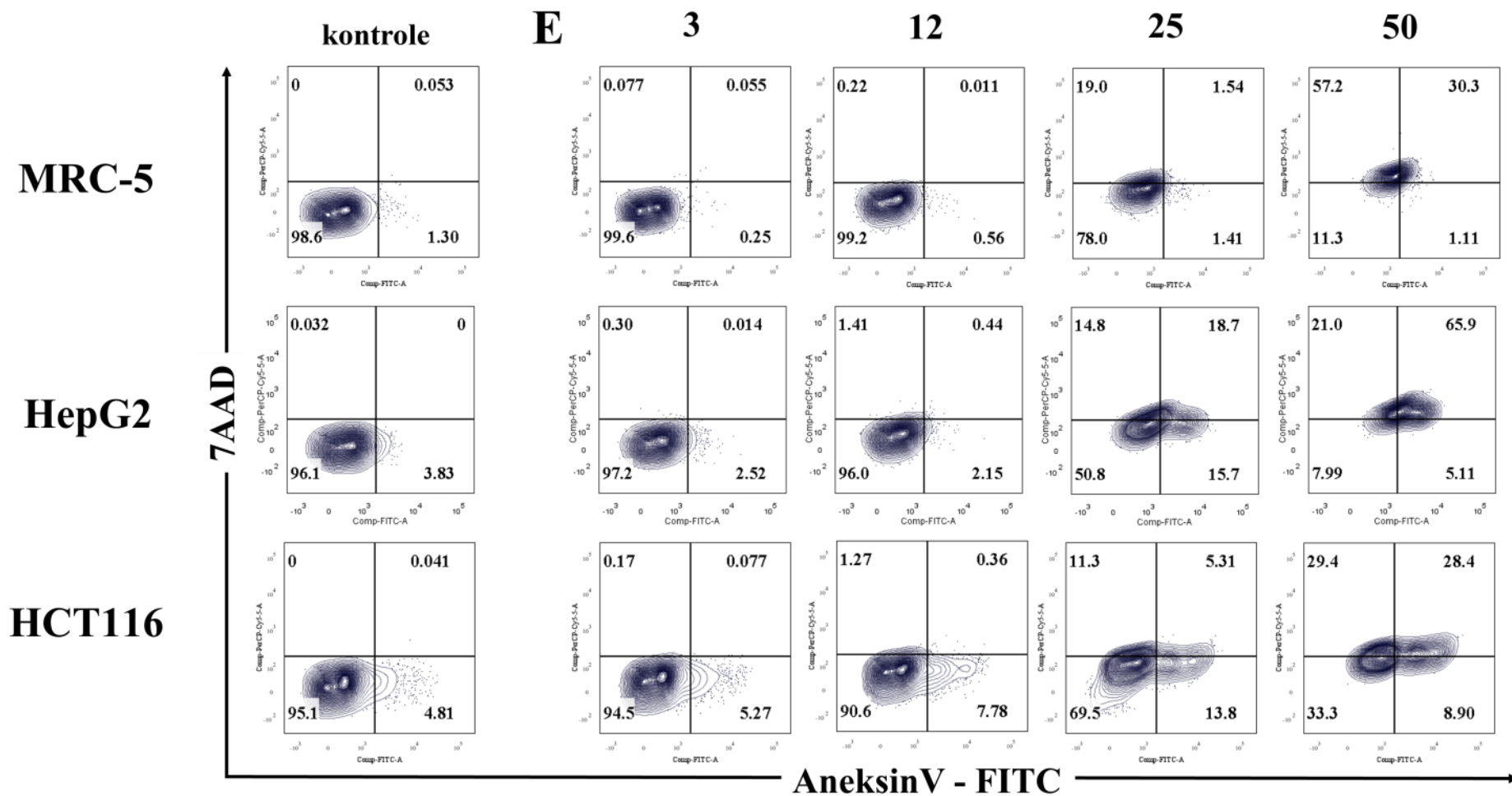


Slika 47. Dozno-zavisan efekat FA ekstrakta na izazivanje apoptoze kod MRC-5, HepG2, HCT116 ćelijskih linija. Na slici su prikazani reprezentativni tačkasti dijagrami analize kao i naveden procenat vijabilnih ćelija (Annexin V-FITC⁻/7AAD⁻), rano apoptotičnih (Annexin V-FITC⁻/7AAD⁺), kasno apoptotičnih (Annexin V-FITC⁺/7AAD⁻) i primarno nekrotičnih ćelija (Annexin V-FITC⁺/7AAD⁺), jednog od tri nezavisna eksperimenta.

Sličan efekat koji izaziva ekstrakt, primećuje se i kod tretmana emodinom, s tim da je trend u ovom slučaju izraženiji. Takođe, sa porastom koncentracije opada broj vijabilnih ćelija, a trend koji se javlja kod normalne i kancerskih ćelijskih linija je isti kao i pri tretmanu ekstraktom. Sa druge strane, porast koncentracija emodina vodi i ka porastu apoptotičnih ali i nekrotičnih ćelija (Slika 48). Iz priložene kvadrantne raspodele ćelijskih populacija pri tretmanu emodinom, može se uočiti da je mnogo veći broj ćelija u kasnoj apoptozi i nekrozi u odnosu na tretman ekstraktom (Slika 49). Čak 57 % ćelija se nalazi u nekrozi u slučaju MRC-5 ćelijske linije na koncentraciji od 50 µg/mL. Veliki broj ćelija u kasnoj apoptozi se može uočiti kod HepG2 ćelijske linije na koncentraciji od 50 µg/mL (66 %).



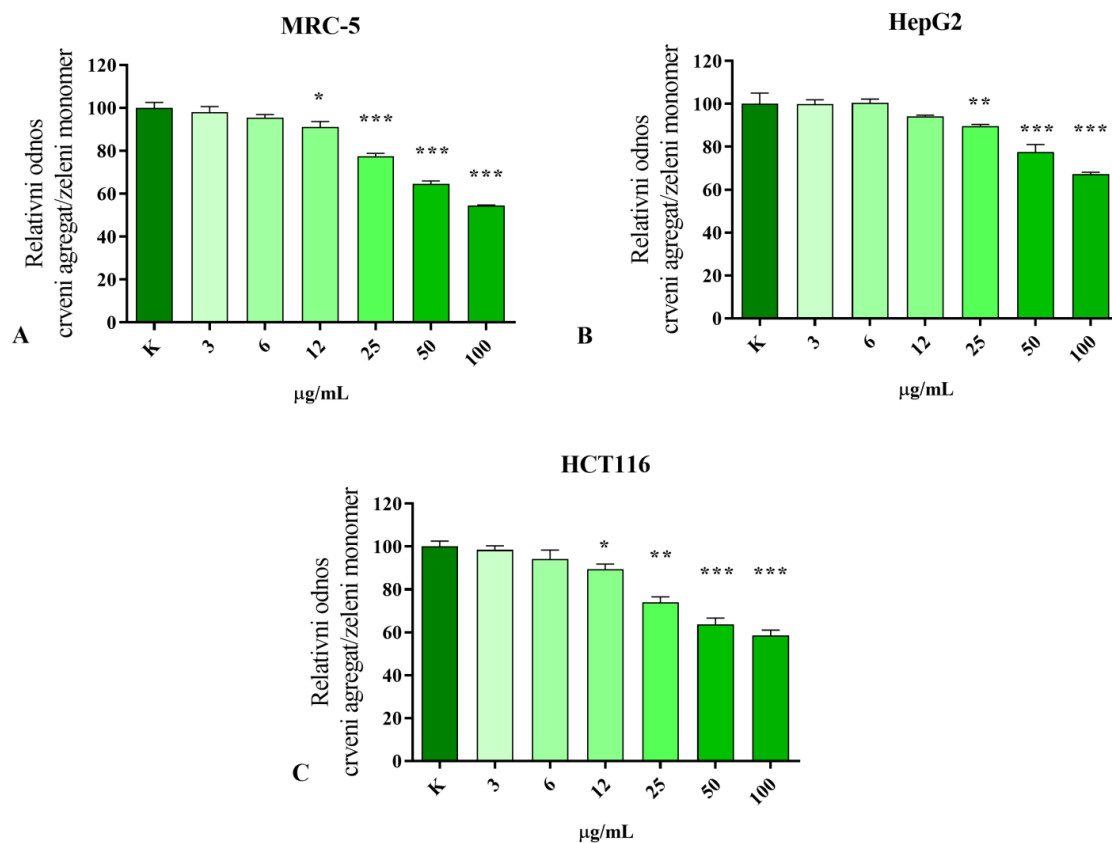
Slika 48. Efekat emodina na indukciju ćelijske smrti kod MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT116 (C) ćelijskih linija. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije. * p<0,05



Slika 49. Dozno-zavisan efekat FA ekstrakta na izazivanje apoptoze kod MRC-5, HepG2, HCT116 ćelijskih linija. Na slici su prikazani reprezentativni tačkasti dijagrami analize kao i naveden procenat vijabilnih ćelija (Annexin V-FITC⁻/7AAD⁻), rano apoptotičnih (Annexin V-FITC⁺/7AAD⁻), kasno apoptotičnih (Annexin V-FITC⁻/7AAD⁺) i primarno nekrotičnih ćelija (Annexin V-FITC⁺/7AAD⁺), jednog od tri nezavisna eksperimenta.

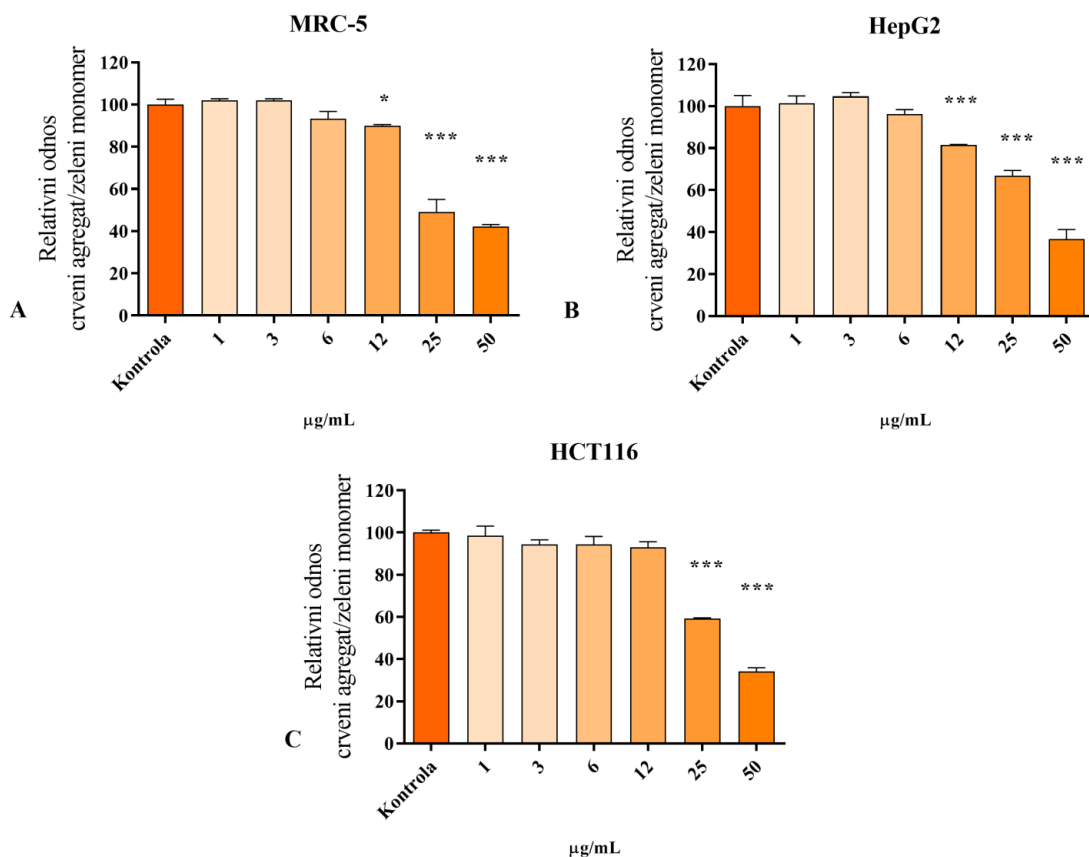
4.4.4. Efekat FA ekstrakta i emodina na mitohondrijski membranski potencijal odabranih ćelijskih linija

Praćenjem fluorescencije JC-10 boje analiziran je efekat test supstanci na mitohondrijski membranski potencijal odabranih ćelijskih linija, a rezultati su prikazani grafički (Slike 50 i 51). FA ekstrakt pokazuje dozno-zavisano efekat na sve tri ćelijske linije, a najizraženiji je kod MRC-5 i HCT 116 ćelijskih linija (Slika 50). Kako primenjene koncentracije ekstrakta rastu, tako raste i narušavanje mitohondrijskog membranskog potencijala ćelija, odnosno smanjen je odnos između crvenih agregata i zelenih monomera. Najmanji efekat, FA ekstrakt ispoljava kod HepG2 ćelijske linije, međutim, i u ovom slučaju je odgovor na tretman statistički značajan.



Slika 50. Efekat FA ekstrakta na mitohondrijski membranski potencijal MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT116 (C) ćelijskih linija. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±standardne devijacije. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

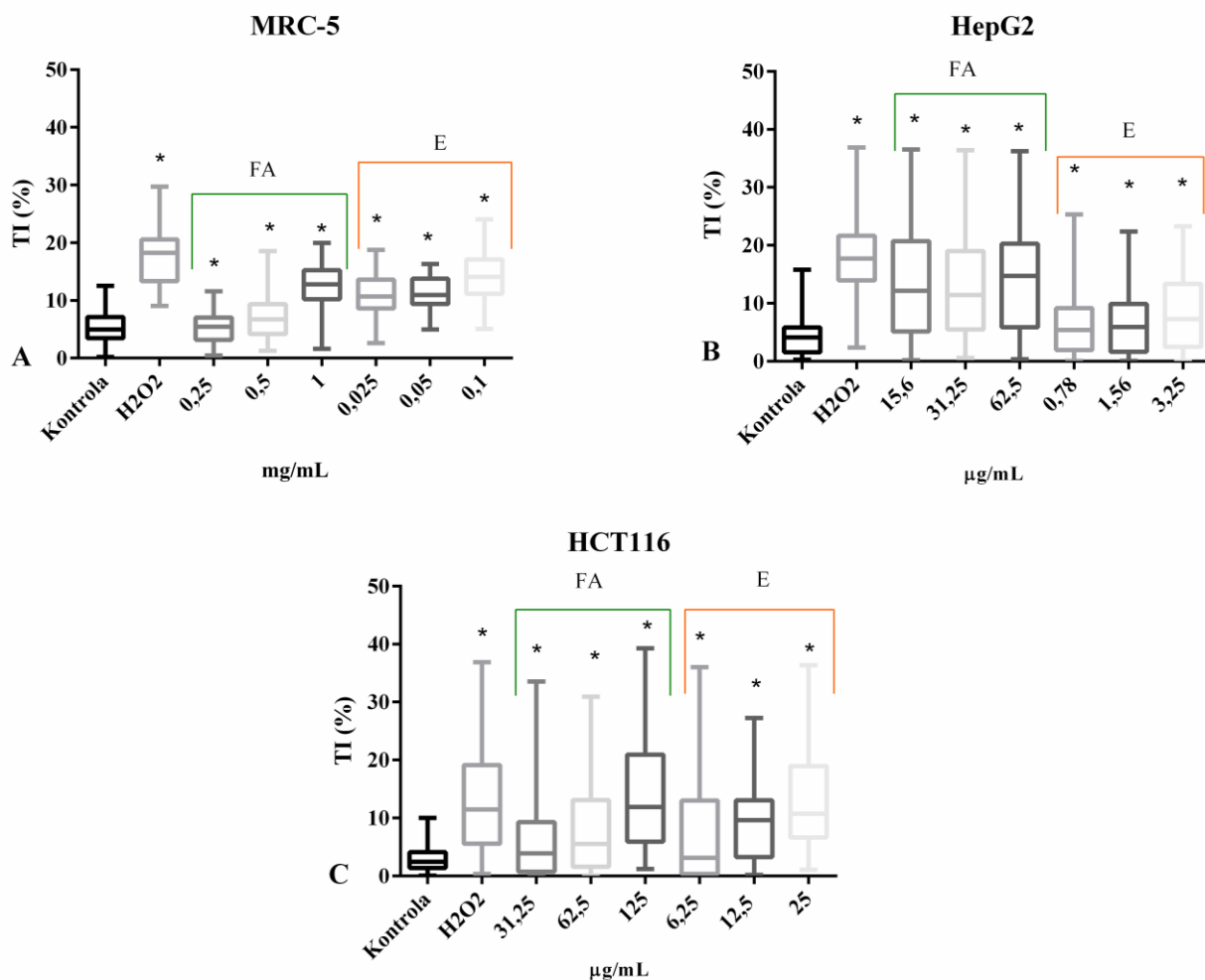
Kada je u pitanju efekat emodina na mitohondrijski membranski potencijal ispitivanih ćelija, efekat je nešto drugačiji. Emodin dovodi do najjačeg efekta, odnosno narušavanja mitohondrijskog membranskog potencijala kod sve tri ćelijske linije na najvišoj testiranoj koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$ (Slika 51). Kod MRC-5 efekat emodina se primećuje na koncentracijama 12, 25 i 50 $\mu\text{g/mL}$, u slučaju HCT 116 ćelijske linije na 25 i 50 $\mu\text{g/mL}$, dok kod HepG2 postoji dozno-zavisano odgovor na emodin počevši od koncentracije 12 $\mu\text{g/mL}$.



Slika 51. Efekat emodina na mitohondrijski membranski potencijal MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT 116 (C) ćelijskih linija. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.5. Genotoksični potencijal FA ekstrakta i emodina

Genotoksični potencijal test supstanci prema MRC-5, HepG2 i HCT 116 ćelijskoj liniji, ispraćen je primenom alkalnog Komet testa. FA ekstrakt je ispoljio genotoksični efekat na svim ćelijskim linijama, a kod MRC-5 i HCT 116 ćelijskih linija pokazao je dozno-zavisani efekat, dok je na HepG2 ćelijskoj liniji efekat bio donekle ujednačen na svim primenjenim koncentracijama (Slika 52). Što se tiče emodina, on je takođe ispoljio snažan genotoksični efekat i to na znatno nižim koncentracijama. Njegov efekat bio je dozno zavisani kod svih testiranih ćelijskih linija. Prema dobijenim rezultatima, može se reći da je efekat obe test supstance bio značano izraženiji na kancerskim ćelijama, naročito kod HCT116 ćelijske linije.



Slika 52. Genotoksični efekat FA ekstrakta i emodina na MRC-5 (A), HepG2 (B) i HCT-116 (C) ćelijskim linijama. Rezultati su predstavljeni kao intezitet repa (TI) – procenat DNK u repu komete. H₂O₂ (75 μmol) – pozitivna kotrola. FA- FA ekstrakt; E – emodin. Statistička značajnost je testirana u odnosu na kontrolu primenom neparametrijskog Mann-Whitney U testa (*p<0,05).

5. Diskusija

Poslednjih godina, borba sa rezistencijom na konvencionalne terapeutike, kako na antibiotike tako i na antikancerske agense, predstavlja ozbiljan problem sa kojim se medicina i čovečanstvo suočavaju. Kako je efikasnost dostupnih lekova sve manja, istraživanja su usmerena ka pronalasku novih prirodnih agenasa i strategija, kao i načina da se poboljša delovanje postojećih. Posebnu pažnju privlače biljke zbog raznovrsnosti sekundarnih metabolita i njihovih derivata i brojnih bioloških aktivnosti koje poseduju (Farha i Brown, 2015). Ono što je takođe važno jeste da biljke ispoljavaju manju toksičnost i samim tim manje je neželjenih efekata, a još važnije je što nema razvijanja rezistencije (Yang i sar., 2018). Znajući da biljke predstavljaju bogat izvor jedinjenja, od značaja je ispitati do sada manje istražene biljne vrste i proceniti njihove biološke aktivnosti koje do sada nisu poznate ili su slabo ispitane.

Frangula alnus je tradicionalno korišćena biljka, prvenstveno kao laksativ, od koje su pripremane brojne tinkture i preparati. Iako su poznate određene biološke aktivnosti biljaka roda *Frangula*, poput antifungalne (Manojlović i sar., 2005), antibakterijske (Kremer i sar., 2012), antioksidantne (Brkanac i sar., 2015) i antikancer (Azadkhan i Farahani, 2016) aktivnosti, međutim biološki efekti *F. alnus* ispitani u ovom radu, tj. antibakterijska, antibiofilm i antikancerska svojstva su do sada bila slabo ispitana. Stoga je predmet istraživanja ove doktorske disertacije bio da se ispituju biološke aktivnosti, i to etil-acetatnog ekstrakta krušine (*Frangula alnus*) kao i njene dominantne komponente emodina. Poseban akcenat je stavljen na njihovu antibiofilm aktivnost na odabranim sojevima *S. aureus*.

Do sada je poznato da su biljke roda *Frangula*, naročito njihova kora, izuzetno bogate antrahinonima, medicinski značajnim supstancama koje su i odgovorne za purgativni efekat. Pored ovih supstanci, biljke familije Rhamnaceae su bogate flavonoidima, taninima i pojedinim alkaloidima (Maleš i sar., 2010; Tebrencu i sar., 2015). Nejabatdoust i sar. (2020) su u svom istraživanju primenom FTIR i UV-Vis spektrometrije ukazali na prisustvo alkana, alkena, fenola, alkoholnih jedinjenja, estra, terpena, masnih kiselina, kao i antrahinona u vodeno-etanolnom, etanolnom i metanolnom ekstraktu *F. alnus*. Pojedine grupe ovih jedinjenja, posebno estara, uočavaju se i u rezultatima GC×GC/MS metode dobijenim u ovom radu za FA ekstrakta. Ova kvalitativna analiza pokazala je da je najzastupljenija komponenta benzoeva kiselina, 4-etoksi-, etil estar. Upravo ova komponenta je detektovana kao dominantna i aktivna i u etanolnom ekstraktu lista *Rhamnus prinoides*, biljke iz familije Rhamnaceae (Campbell i sar., 2019). Sa druge strane, Boncler i sar. (2017) pokazali su da je kora *F. alnus* bogata fenolnim jedinjenjima, što je dokazano i u slučaju našeg FA ekstrakta primenom kvantitativne LC-MS/MS analize. Prema novijim literaturnim podacima, u ekstraktu lista *F. alnus* detektovane su fenolne kiseline (*p*-kumarinska, ferulinska i kafeinska), ali i flavonoidna jedinjenja kvercetin i kvercitrin (Elansary i sar., 2020), koja su prisutna i u FA ekstraktu u nešto manjim količinama. Rezultati dobijeni primenom LC-MS/MS metode su pokazali da je antrahinon emodin bio najzastupljeni u ekstraktu, dok je za njim bio flavonoid katehin. Prema literaturnim podacima, kao dominantni konstituent biljke navodi se upravo emodin kao i njegovi derivati (Maleš i sar., 2010; Kremer i sar., 2012; Tebrencu i sar., 2015). Kako je pokazano da je emodin izuzetno zastupljen u FA ekstraktu, on je odabran za dalja istraživanja uz ekstrakt, kako bi se uporednom analizom aktivnosti moglo zaključiti da li se biološka aktivnost ekstrakta može, u najvećoj meri, pripisati upravo ovom jedinjenju.

Biljke, zahvaljujući širokom spektru sekundarnih metabolita, predstavljaju značajan izvor antioksidanata koji doprinose mnogim drugim biološkim aktivnostima. Poznato je da ROS u ćelijama oksiduju različite biomolekule, uključujući proteine, lipide i DNK, što posledično utiče na fiziološke funkcije, ali može dovesti i do ćelijske smrti (Ammar i sar., 2008). Jedinjenja poreklom iz biljaka (antioksidanti) mogu zaštititi ćeliju od oksidativnog stresa, odlažući ili inhibirajući oksidaciju supstrata, ali i neutrališući slobodne radikale. Ova aktivnost biljaka i njihovih jedinjenja je od značaja, s obzirom da oksidativni stres predstavlja bitan faktor u nastanku mnogih sistemskih oboljenja uključujući i maligna (Ammar i sar., 2008). Stoga, sledeća celina istraživanja bila je usmerena na ispitivanje antioksidativnog potencijala FA ekstrakta i emodina.

Prvobitno je ispitana sposobnost test supstanci da neutralizuju slobodne radikale, nakon čega je ispitana njihova efikasnost da inhibiraju proces lipidne peroksidacije. U jednostavnom i često korišćenom DPPH testu, FA ekstrakt je pokazao snažnu antioksidativnu aktivnost, odnosno sposobnost da neutrališe DPPH radikale. Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na umerenu antioksidantnu aktivnost ekstrakta *F. alnus* ali i drugih vrsta ovog roda (Kremer i sar., 2012; Kosalec i sar., 2013; Brkanac i sar., 2015). U navedenim radovima EC₅₀ vrednosti su bile znato više od dobijenih u ovom istraživanju što ukazuje da sam način ekstrakcije i vrsta rastvarača koji je korišćen mogu uticati na razliku u dobijenim rezultatima. Sa druge strane, emodin nije pokazao antioksidantnu aktivnost u ispitivanom opsegu koncentracija. Iako pojedine studije sugerišu da emodin ima antioksidantnu sposobnost (Dong i sar., 2016), možemo reći da u FA ekstraktu, emodin nije komponenta koja doprinosi njegovoj dobroj sposobnosti da neutrališe radikale. Dodatno, Tian i Hua (2005) su pokazali da sličan antrahinon, aloe-emodin, ne poseduje antioksidantnu aktivnost. Dalje, dobar antioksidantni potencijal FA ekstrakta potvrđen je i u TBA testu, gde je ekstrakt u dozno-zavisnom maniru inhibirao proces lipidne peroksidacije. Emodin je i u ovom slučaju pokazao slabu aktivnost koja je bila u korelaciji sa studijom Vargas i sar. (2004), gde je pokazano da emodin inhibira proces LP za oko 30%. Među biljkama porodice Rhamnaceae, flavonoidi ali i druga fenolna jedinjenja osim antrahinona, se mogu smatrati odgovornim za ispoljenu antioksidativnu aktivnost (Ammar i sar., 2008). S obzirom da je u ovom istraživanju pokazano da je FA ekstrakt bogat flavonoidima i fenolnim kiselinama, možemo reći da su ove grupe jedinjenja odgovorne za antioksidantnu aktivnost FA ekstrakta.

Kao što je prethodno navedeno, rezistencija na antimikrobne agense predstavlja globalni problem današnjice. S obzirom da ozbiljne bakterijske infekcije postaju sve učestalije, javlja se i potreba za pronalaskom novih agenasa, a posebnu pažnju privlače prirodni proizvodi poreklom iz biljaka (Salam i Quave, 2018). Iako je *F. alnus* korišćena u tradicionalnoj medicini, njena antibakterijska aktivnost je slabo ispitana. Prema tome, sledeća celina je obuhvatila ispitivanje antibakterijskog efekta FA ekstrakta i emodina na referentnim sojevima i kliničkim izolatima *S. aureus*. Postoje pojedini literaturni podaci koji ukazuju na antibakterijsku aktivnost kore krušine prema sojevima *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* (Kremer i sar., 2012; Sadowska i sar., 2014;), ali do sada nema i podataka koji se tiču mehanizama njenog delovanja. FA ekstrakt je pokazao izrazitu inhibitornu aktivnost prema svim sojevima *S. aureus*, s tim da su najosetljiviji sojevi bili Gp19 (MSSA) ATCC 43300 i Gp29 (MRSA). Dobijene MIK vrednosti bile su slične dobijenim u studijama Kremer i sar. (2012) i Sadowska i sar. (2014), a koji su objavili nešto više MIK vrednosti. Kao i u slučaju antioksidativne aktivnosti, na antimikrobnu aktivnost FA ekstrakta uticao je način i odabir rastvarača i delova biljke za ekstrakciju, klimatski uslovi i sastav zemljišta na kojima je biljka rasla, jer od toga zavisi hemijski sastav dobijenog ekstrakta od koga potiče biloška aktivnost. Takođe, sojevi različite osetljivosti su korišćeni u pomenutim studijama, što takođe utiče na varijabilnost rezultata.

Kora krušine je bogata antrahinonima i njihovim derivatima čije su brojne aktivnosti ispitivane, uključujući i antibakterijsku. Literaturni podaci pokazuju da ova grupa jedinjenja ispoljava antibakterijski efekat na širem spektru patogena među kojima je i *S. aureus* (Malmir i sar., 2017). Za flavonoide je takođe pokazano da poseduju antibakterijsku aktivnost i to prema mnogim sojevima (Farhadi i sar., 2019). Imajući u vidu da je FA ekstrakt bogat fenolima i flavonoidima, kao i da je kora krušine bogata antrahinonima, dobra antibakterijska aktivnost se može pripisati ovim grupama sekundarnih metabolita biljaka. Malmir i sar. (2017) prikazuju da su mehanizmi delovanja antrahinona destabilizacija ćelijskog zida, alteracija metaboličkih puteva ili oštećenja molekula DNK. Sa druge strane, u radu Cushnie i Lamb (2011) dato je nekoliko potencijalnih mehanizama kojim flavonoidi ostvaruju svoju antibakterijsku aktivnost i to su: oštećenje i inhibicija sinteza citoplazmatične membrane, nukleinskih kiselina i ćelijskog zida, kao i energetskog metabolizma. Međutim, ono što je sigurno jeste da obe grupe mogu ostvariti svoju aktivnost kroz više mehanizama, ali i kroz sinergizam sa nekim drugim komponentama. Takođe, antibakterijska aktivnost FA ekstrakta može biti pripisana i emodinu i katehinu koji su bili najzastupljenije komponente FA ekstrakta, što je pokazala LC-MS/MS metoda, a za koje je poznato da poseduju

antibakterijsku aktivnost (Gibbons i sar., 2004; Song i sar., 2007; Cao i sar., 2015; Dong i sar., 2016). Zbog toga je dalje ispitana antibakterijska aktivnost dominantne komponente emodina.

Emodin poseduje brojne biološke aktivnosti među kojima je i antibakterijska, međutim, do sada ima nedovoljno podataka o mehanizmu njegovog delovanja (Yan i sar., 2017; Chalothron i sar., 2019; Ya i sar., 2020). Ispitivanje antibakterijske aktivnosti je ukazalo na snažnu inhibitornu aktivnost emodina na svim testiranim sojevima sa najvećim efektom na MRSA sojeve (Gp29 i Gp7). Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje su se bavile ovom aktivnošću emodina na sojevima *S. aureus*, a takođe su i dobijene MIK vrednosti približne njihovim (Liu i sar., 2015; Li i sar., 2016; Yan i sar., 2017; Chalothorn i sar., 2019). Liu i sar. (2015) su pokazali da emodin ostvaruje svoju aktivnost na MRSA sojeve *in vitro* i *in vivo* i to preko oštećenja ćelijskog zida i ćelijske membrane. U istraživanju je prikazano da emodin ne deluje na ćelijski zid remeteći ekspresiju gena odgovornih za sintezu, već indirektno preko ćelijske membrane. Ćelijska membrana predstavlja važno mesto za sintezu ćelijskog zida, s obzirom da se kroz nju transportuju neophodni prekursori za sintezu, čija aktivnost zavisi od njene fluidnosti i integriteta. Emodin je u ovom slučaju uticao i na fluidnost i integritet membrane, što je posledično dovelo i do uticaja na sintezu ćelijskog zida. Još važnije, Liu i sar. (2015) su pokazali da osim postojanja antibakterijske aktivnosti prema testiranom MRSA soju, ta aktivnost ostaje ista i nakon 20 pasaža i tretmana emodinom, što je procenjeno na osnovu neizmenjene MIC vrednosti. Drugim rečima, nije dolazilo do razvijanja rezistencije na emodin. Pokazano je takođe da emodin nema uticaja na ekspresiju *mecA* gena odgovornog za rezistenciju kod MRSA sojeva. Postoje literaturni podaci koji navode da emodin ostvaruje svoju aktivnost inhibirajući sintezu nukleinskih kiselina, ali i ćelijskog metabolizma (Malmir i sar., 2011). Štaviše, Duan i sar. (2017) objavili su da hlorisan emodin izaziva značajno curenje K^+ jona iz ćelije *S. aureus*, što utiče na depolarizaciju membrane i povećava njenu permeabilnost, vodeći ka ćelijskoj smrti. Ovi nalazi ukazuju da emodin ostvaruje svoju antibakterijsku aktivnost preko ćelijske membrane. Međutim, ćelijska membrana nije jedino ciljno mesto emodina. Da emodin na više načina ostvaruje antibakterijsku aktivnost na sojeve *S. aureus* govori i istraživanje Ji i sar. (2017). U ovoj studiji emodin indukuje poremećaj u ravnoteži piruvatnog puta, inhibira sintezu proteina i molekula DNK, ali i interferira sa proteinima koji su u vezi sa oštećenjem ćelijske membrane. U cilju detaljnijeg istraživanja aktivnosti emodina, Chalothorn i sar. (2019) su ispitivanjem veze između strukture i aktivnosti emodina pokazali da su njegove hidroksilne i metil grupe odgovorne za anti-MRSA aktivnosti.

Dodatno, praćenjem efekta ekstrakta na bakterijski rast može se primetiti da skoro sve ispitivane koncentracije test supstanci dovode do određene inhibicije rasta, kao i da postoji određena pravilnost u tom dejstvu. Naime, najniže i najviše doze ekstrakta i emodina ne smanjuju bakterijski rast, čak štaviše, negde se pojavljuje i povišen rast. Posmatranjem dobijenih rezultata uočava se hormezis efekat i to u vidu krive takozvanog U oblika. Kao odgovor bioloških sistema na stres često se javljaju krive ovog oblika, što ukazuje na narušenu homeostazu organizma. Najčešće niske koncentracije test supstanci omogućavaju prevazilaženje stresnih uslova, dok pri višim koncentracijama izbor mehanizma kojim bi se prevazišao stres postaje ograničen, ponekad i nedovoljan da se organizam vrati u ravnotežu. Ovim se postiže hormetični bifazni odgovor u vidu krive U oblika (Calabrese i Baldwin, 2001). Iako postoje radovi koji ukazuju na hormezis efekat antimikrobnih supstanci, u njima se pod pojmom hormoneze podrazumeva drugačiji fenomen od onog uočenog u ovom radu: primenjeni u niskim subinhibitornim dozama, antibiotici mogu stimulisati rast, bioluminescenciju i pokretljivost bakterija, njihovu sposobnost formiranja biofilma, kao i povećati učestalosti mutacija i horizontalnog transfera gena konjugacijom (Iavicoli i sar., 2021). U ovom radu, međutim, pojmom hormoneze označen je dualni efekat na rast očit na osnovu vrednosti optičkih gustina – dok su niske i visoke doze bile bez negativnog efekta na optičku gustinu (ili su je čak povećavale), umerene doze su izazvale najveće smanjenje optičkih gustina. Ovakav rezultat dobijen u eksperimentima ispitivanja dinamike rasta bakterija u prisustvu test supstanci prividno nije logičan, niti je usaglašen sa rezultatima mikrodilucione metode sa resazurinom, u kojoj je dobijen jasan dozno zavisni odgovor. Nelogičnost i prividna neusaglašenost metoda se mogu objasniti činjenicom da su obe test supstance obojene, što u bitnoj meri utiče na vrednosti očitanih

optičkih gustina na visokim koncentracijama. Drugim rečima, obojenost jedinjenja je u slučaju visokih doza maskirala odsustvo rasta, ukazujući da praćenje dinamike rasta na ovaj način, u slučaju naših test supstanci, nije bila odgovarajuća metoda.

Kao što je već napomenuto, osim novih antibiotika i antimikrobnih agenasa neophodno je pronaći i nove strategije za prevazilaženje bakterijske rezistencije. Jedan od načina jeste i kombinovanje prirodnih jedinjenja sa konvencionalnim antibioticima, u cilju smanjenja koncentracije antibiotika i povećanja njegove efikasnosti. Shodno tome, FA ekstrakt i emodin su testirani sa antibiotikom vankomicinom koji se koristi za lečenje teških infekcija izazvanih *S. aureus* sojevima. Sinergizam supstanci uočen je samo u slučaju kombinacije emodina i vankomicina kod Gp41 soja. Studija Lee i sar. (2010) govori da emodin u kombinaciji sa antibiotikom oksacilinom i ampicilinom pokazuje sinergistički efekat na sojevima *S. aureus*, tačnije dolazi do smanjenja MIK vrednosti oba antibiotika u kombinacijama. Izračunati FICI indeksi za oksacilin u ovoj studiji odgovarali su dobijenim vrednostima naše studije za soj Gp41, a neznatna varijabilnost rezultata se može pripisati razlikama u antibioticima koji su korišćeni kao i sojevima na kojima su testiranja sprovedena. Dalje, Cha i sar. (2017) su pokazali da emodin u kombinaciji, takođe sa amoksicilinom i oksacilinom, može se koristiti za smanjenje upotrebe ovih antibiotika i omogućava efikasniju antibakterijsku aktivnost na *S. aureus* sojevima. Rolta i sar. (2020) su u svom istraživanju pokazali da hloroformna frakcija ekstrakta biljke *Rheum emodi* (bogata emodinom) značajno poboljšava efikasnost antibiotika hloramfenikola, tetraciklina i eritromicina i samim tim smanjuje njihove efektivne koncentracije na sojevima *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Uzimajući u obzir do sada navedene literaturne podatke, uspešno kombinovanje emodina sa antibioticima može se pripisati njegovom efektu na ćelijsku membranu (Liu i sar., 2015; Cha i sar., 2017). Dodatno, postoje podaci koji ukazuju da jedinjenja biljnog porekla mogu poboljšati efikasnost antibiotika koji deluju na sintezu ćelijskog zida (kao što je i vankomicin), ciljajući isto mesto delovanja kao i antibiotik, tj. ćelijski zid (Holler i sar., 2012; Cha i sar., 2017). Delujući na ćelijski zid i ćelijsku membranu (Liu i sar., 2015), emodin verovatno olakšava prolazak antibiotika, uključujući i vankomicin koji, kao što je pomenuto, deluje na ćelijski zid bakterija.

Dalje, biofilm predstavlja jedan od glavnih faktora virulencije sojeva *S. aureus*, koji je odgovoran za uporne infekcije i poteškoće u lečenju i samim tim čini ozbiljan problem u medicini u borbi sa rezistencijom. Formiranje biofilma se može smatrati strategijom preživljavanja u prisustvu imunskog odgovora domaćina i primenjenih terapija tokom uspostavljanja infekcije (Sacco i sar., 2020). Budući da je ovaj patogen i usko povezan sa infekcijama koje nastaju usled kontaminiranih medicinskih uređaja i implanata, sprečavanje adhezije ćelija i formiranja biofilma predstavlja dobru preventivnu strategiju (Suresh i sar., 2019). Još jedan razlog zbog kog sprečavanje formiranja biofilma predstavlja dobru strategiju jeste i sprečavanje dalje kolonizacije i razvoja infekcije (Francolini i Donelli, 2010). Uzimajući u obzir ove činjenice, kao i činjenicu da je antibiofilm aktivnost krušine vrlo slabo ispitana, sledeći korak bio je ispitivanje efekta FA ekstrakta i emodina na formiranje biofilmova. Dobijeni rezultati ukazuju na izrazitu sposobnost FA ekstrakta da inhibira formiranje biofilma svih testiranih sojeva, izuzev Gp19. Slična antibiofilm aktivnost opisana je od strane Campbell i sar. (2019) za biljku *Rhamnus prinoides* iz iste familije Rhamnaceae. Pokazano je da njen konstituent, etil 4-etoksibenzoat (estar 4-etoksi benzoeva kiselina), koji je u velikoj meri zastupljen i u FA ekstraktu, poseduje značajnu antibiofilm aktivnost. U svojoj sledećoj studiji, Campbell i sar. (2020) pokazuju da ova komponenta značajno inhibira formiranje biofilma sojeva *S. aureus* i predlažu dva moguća mehanizma kroz koje se ostvaruje ta aktivnost. Prvi predloženi mehanizam jeste preko fizičko-hemijskog puta, jer je ova supstanca smanjila hidrofilitet površine *S. aureus*, što je dalje moglo da spreči inicijalnu adheziju i kolonizaciju negativno naelektrisane površine. Drugi predloženi mehanizam jeste moguće delovanje na međućelijsku komunikaciju i gene koji je regulišu. Snažna antibiofilm aktivnost FA ekstrakta se verovatno može objasniti i prisustvom fenolnih jedinjenja i flavonoida za koje je poznato da poseduju antibiofilm aktivnost. Fenolna jedinjenja mogu sprečiti formiranje biofilma smanjujući sposobnost adhezije, delujući na međućelijsku komunikaciju, ali i inhibirajući ekspresiju faktora virulencije (Takó i sar., 2020). Dalje, fenolna jedinjenja prisutna u ekstraktu, kao što su kvercetin, emodin, galna kiselina, elagna

kiselina i kafena kiselina poseduju takođe antibiofilm aktivnost (Lee i sar., 2013; Slobodnikova i sar., 2016; Al-Shabib i sar., 2017; Qian i sar., 2020). Dodatno, Lee i sar. (2016) su pokazali da pojedina jedinjenja iz grupe antrahinona (posebno alizarin) utiču na formiranje biofilma *S. aureus*.

Da bi se ispitala detaljnije antibiofilm aktivnost FA ekstrakta, u daljem istraživanju praćen je efekat dominantne komponente ekstrakta – emodina na formiranje biofilma *S. aureus*. Prema dosadašnjim literaturnim podacima, emodin inhibira formiranje biofilma sojeva *Streptococcus suis* (Yang i sar., 2015), *Streptococcus mutans* (Coenye i sar., 2007) i *Pseudomonas aeruginosa* (Ding i sar., 2011; Zhou i sar., 2017), dok su podaci o emodinu i biofilmu *S. aureus* veoma oskudni. Rezultati koji su dobijeni u našem istraživanju ukazali su na odličnu sposobnost emodina da spreči formiranje biofilma svih testiranih sojeva na svim testiranim koncentracijama, izuzev Gp7 soja gde je inhibicija uočena samo na dve najviše koncentracije. Slični podaci dobijeni su i u studiji Yan i sar. (2017) gde emodin inhibira formiranje biofilma *S. aureus* i to u dozno – zavisnom maniru, što je potvrđeno i primenom SEM mikroskopije. Takođe, postoje podaci da aloe-emodin sprečava inicijalnu adheziju i proliferaciju *S. aureus* (Xiang i sar., 2017). Primećuje se i da emodin i FA ekstrakt uspešno inhibiraju formiranje biofilma na sub-inhibitornim koncentracijama. Ovakvi rezultati su u skladu sa studijom Ding i sar. (2017) koji su pokazali da biljni ekstrakti, kao i supstance poreklom iz njih, ispoljavaju svoju aktivnost na nižim koncentracijama od inhibitornih. Posebno je značajno što je ovakva aktivnost zabeležena za emodin, aloe-emodin, galnu i elagnu kiselinu (Luis i sar., 2014; Bakkiyaraj i sar., 2013; Yan i sar., 2017; Xiang i sar., 2017).

Sa druge strane, kombinovanje emodina i vankomicina nije pokazalo bolji efekat na formiranje biofilma od samog emodina. Ono što se moglo primetiti jeste da je subinhibitorna koncentracija vankomicina kod soja Gp29 dovela do blage stimulacije formiranja biofilma, što nije neobičan rezultat za niske koncentracije antibiotika. Vasilchenko i Rogozhin (2019) u svojoj studiji pokazuju da niske koncentracije antibiotika mogu izazvati kod bakterija potpuno neočekivano ponašanje koje je rezultat adaptacije na prisutne stresne uslove. Upotreba ovih koncentracija antibiotika često dovodi do ekspresije faktora virulencije koji pospešuju formiranje biofilma u stresnim uslovima kojima su ćelije izložene (Lazaro-Diez et al., 2016), što se uglavnom označava kao hormeza u delovanju antibiotika (Iavicoli i sar., 2021), o čemu je već bilo reči.

Dodatno, da bi se ispitala veza između formiranja biofilma i tipa metabolizma fakultativno anaerobnih *S. aureus* u uslovima kada se biofilm formira, kao i potencijalni mehanizam antibiofilm delovanja test supstanci, po prvi put ispraćen je efekat na aerobnu respiraciju (potrošnju O₂ i produkciju CO₂) ćelija u planktonskoj životnoj formi. Obe test supstance su značajno inhibirale aerobnu respiraciju sojeva ATCC 25923, Gp41 i Gp29, dok je FA ekstrakt dodatno imao efekta i na soju Gp7. Kombinovani efekat je takođe bio uspešan i izraženiji na soju Gp29. Zanimljivo je da je upravo kod ovih sojeva formiranje biofilma inhibirano na istim koncentracijama na kojima i aerobna respiracija, što može ukazivati da se inhibicija ostvaruje kroz blokiranje respiracije. Štaviše, antibiofilm aktivnost emodina je izraženija kod sojeva kod kojih je inhibirana i respiracija. Nasuprot ostalim sojevima, kod Gp19 soja FA ekstrakt je imao najmanji inhibitorni efekat na respiraciju, a kod njega je čak uočena i stimulacija formiranja biofilma upravo na koncentraciji ekstrakta korišćenoj u eksperimentima analize respiracije. Pojava stimulacije formiranja biofilma, uočena u slučaju primene nekoliko koncentracija ekstrakta na soju Gp19, bi se mogla objasniti altruističkim ponašanjem zajednice, odnosno stresom indukovanoj programiranoj ćelijskoj smrti pojedinih ćelija u zajednici koju pokreću neki slabiji antimikrobni agensi, uključujući i sekundarne metabolite biljaka primenjene, naravno, u sub-inhibitornim koncentracijama (Lewis, 2000; Pankey i Sabath, 2004; Trentin i sar., 2013). Izazvana programirana ćelijska smrt na ovaj način može biti benefit za zajednicu, s obzirom da se uklanjaju pojedinačne ćelije. Dešava se da ovi agensi ne ubijaju celu ćelijsku populaciju već, izazivajući poremaćaje ćelijske membrane i lizu zahvaćenih ćelija, dovode pre do curenja ćelijskih struktura. Posledično ovo dovodi do toga da one postanu sastavni deo povećanog ekstracelularnog matriksa, što je kasnije i dokazano za pojedine antimikrobne lekove (Bayles i sar., 2007; Trentin i sar., 2013). Nadalje, korelacija između respiracije *S. aureus* i razvoja faktora virulencije je ispitivana u studijama koje su pokazale da je

smanjena respiracija dovodila do produkcije adhezina i liganda koji su neophodni za interakciju sa ćelijama domaćina i posleđično do formiranja biofilma (Proctor i sar., 2006; Proctor i sar., 2014; Kahl i sar., 2016; Proctor i sar., 2019). Međutim, FA ekstrakt i emodin su slabo uticali na respiraciju soja ATCC 4300, dok je formiranje biofilma u slučaju ovog soja bilo inhibirano. Ovo nam može ukazati da delimično oslabljeno disanje ne dovodi uvek do gore pomenute programirane ćelijske smrti i razrastanja biofilma, već da je u nekim slučajevima ono dovoljno da inhibira formiranje biofilma.

Interesovanje za izučavanje biofilma i novih antibiofilm agenasa je poraslo zadnjih godina, s obzirom da se procenjuje da je oko 80 % ukupnih bakterijskih infekcija poreklom od bakterija sposobnih da formiraju biofilm (Khattoon i sar., 2018). Način života u biofilmu pruža bakterijama dodatnu zaštitu koja se ogleda u povećanju otpornosti na antimikrobne agense budući da su u biofilmu i do 1000 puta otpornije (Penesyan i sar., 2020). Jednom kada se uspostave, biofilmovi se teško mogu degradovati, što vodi ka daljem razvoju rezistencije i poteškoćama u lečenju infekcija (Von Borowski i sar., 2019). Stoga istraživanje efekta novih antibiofilm jedinjenja na već formirane biofilme treba da bude prioritet u istraživanju. Kako je podataka o antibiofilm aktivnosti *F. alnus*, u smislu sposobnosti degradacije pre-formiranih biofilмова vrlo malo, u disertaciji je dalje ispraćen efekat FA ekstrakta i emodina, kao i kombinacije emodina i vankomicina na već formirane biofilme *S. aureus*. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da obe test supstance u određenoj meri dovode do dezintegracije biofilma sojeva ATCC 43300 (MRSA) i Gp41 (MSSA), dok emodin pokazuje efekat i na ostalim MRSA sojevima (Gp29 i Gp7). Ipak, naj snažniji efekat obe supstance je zabeležen na soju ATCC 43300. Nije iznenađujuće da emodin ima dobru antibiofilm aktivnost na MRSA sojevima, s obzirom da je već pokazano da su MRSA sojevi dosta osetljiviji od MSSA sojeva na prirodne proizvode, kako u ovoj studiji tako i u literaturi (Liu i sar., 2015). Efekat koji se vidi pokazuje blagi hormetični odgovor, koji, kao što je prethodno objašnjeno, najizraženiji je kod soja Gp29. Kod ovog soja uočava se značajno povećanje biomase biofilma pri niskim dozama emodina i najveći inhibični efekat pri srednjim dozama, dok sa daljim povećanjem koncentracije inhibična svojstva ponovo opadaju. Kao što je već napomenuto, moguće je da male doze izazovu adaptivni odgovor na stres u cilju zaštite od za njih štetnih aktivnosti. S druge strane, sa povećanjem doze emodina moglo je doći do zasićenja zaštitnih mehanizama bakterija, što vodi ka smanjenom adaptivnom odgovoru i samim tim smanjenoj biomasi biofilma. Međutim, dalje povećanje doze dovodilo je do pada inhibične aktivnosti, što je još uvek nejasno i zahteva dalje analize. Činjenica da antibiofilm aktivnost emodina, ali i brojnih drugih prirodnih jedinjenja, neretko dovodi do hormetičkog odgovora, ukazuje da je neophodno pažljivo odabrati doze jedinjenja kojima bi se ostvarila najuspešnija eradikacija biofilma (Jodynis-Liebert i Kujawska, 2020; Murakami, 2020). Slično kao i u slučaju delovanja pojedinačnih test supstanci, kombinovani tretman emodinom i vankomicinom je bio uspešniji na biofilmu soja Gp29 (MRSA).

U cilju rešenja problema koje predstavljaju biofilmovi, stalno se traga za novim strategijama i ciljnim mestima na koje bi agensi delovali. Shodno tome, godinama se istražuje i veza biofilma i njegovog postojanja sa različitim ćelijskim procesima. Jedna od važnih karakteristika biofilma je i njegova metabolička heterogenost koja omogućava visoku toleranciju na antimikrobne agense. Sa druge strane, poznato je i da aktivnost samih antimikrobnih agenasa zavisi i od metaboličkog statusa ćelije (Crabbé i sar., 2019). Iako su neki stariji podaci ukazivali na inverznu korelaciju ili čak nikakvu korelaciju između ćelijskog metabolizma i formiranja biofilma (Budzynska i sar., 2011), noviji podaci ukazuju na postojanje određenih korelacija između biofilma i tipa respiracije (Lobritz i sar., 2014; Mashruwala i sar., 2017). S obzirom da je *S. aureus* fakultativni anaerob i da promena sa aerobnog na anaerobno disanje svakako ima uticaja na strukturu i formiranje biofilma, ispraćen je i efekat test supstanci na aerobnu respiraciju u formiranim biofilmovima. Praćenje ovog efekta omogućilo je istraživanje korelacije disanje – biofilm i samim tim potencijalni mehanizam delovanja supstanci. Rezultati merenja koncentracije gasova u biofilmu su pokazali da FA ekstrakt smanjuje aerobnu respiraciju kod oba MSSA izolata (Gp41 i Gp19) i kod MRSA izolata Gp7. Iako testirana koncentracija (4×MIK) remeti aerobno disanje u biofilmu, ona nije bila uspešna u dezintegraciji biofilma. Dobijeni rezultat se može objasniti činjenicom da se većina biomase

biofilma sastoji od ekstracelularnog matriksa i da njegovo povećanje ne mora biti u vezi sa intenzitetom i tipom ćelijskog disanja. Sa druge strane, emodin je inhibirao proces aerobne respiracije sojeva ATCC 43300 i Gp41 dok je istovremeno na ovoj koncentraciji i smanjivao biomasu biofilma, te možemo reći da ovde postoji pozitivna korelacija između degradacije biofilma i inhibicije aerobne respiracije. Međutim, interesantno je i napomenuti da, iako je emodin dezintegrisao biofilm soja Gp7, njegova respiracija je pod istim tretmanom ostala nepromenjena. Uopšteno gledano, kako su uočeni raznovrsni efekti test supstanci na pre-formirani biofilm i tip respiracije kod različitih sojeva, moglo bi se konstatovati da se nikakve generalizacije ne mogu izvesti, već da je odgovor *species* specifičan. U slučaju inhibitornog delovanja ekstrakta/emodina na aerobnu respiraciju, dobijeni rezultati su saglasni sa nekim od studija koje sugerišu da bi antibiotici mogli da izazovu metaboličke promene kao sekundarni odgovor na lečenje (Lobritz i sar., 2014). Štaviše, navodi se i da ovakvi agensi smanjuju ćelijsko disanje, što se posledično može računati kao mehanizam otpornosti na njih (Lobritz i sar., 2014; Bazargani i sar., 2016). Zanimljivo je da Lobritz i sar. (2014) navode i da pojedini antibiotici smanjivanjem intenziteta disanja inhibiraju procese transkripcije i translacije, što posledično može uticati na preživljavanje ćelija. S druge strane, Haaber i sar. (2012) navode da je *S. aureus* sposoban da formira ćelijske agregate slične zajednici biofilma koji povećavaju toleranciju na spoljašnje uslove sredine, ali i pokazuju veću metaboličku aktivnost. Stoga, može se sugerisati da emodin kod soja Gp7 izaziva dispregiju biofilma i verovatno formiranje ovakvih agregata, što rezultuje u promeni biomase ali ne i u promeni metaboličke aktivnosti. Konačno, nasuprot pomenutim dejstvima test supstanci na respiraciju svih ostalih sojeva, kod soja ATCC 25923 uočava se nešto intenzivniji proces aerobne respiracije pod uticajem emodina. Ovo se može povezati sa stavovima pojedinih autora koji navode da određeni antimikrobni agensi dovode do ubrzane respiracije i produkcije ROS-a, što doprinosi ostvarivanju njihove antimikrobne funkcije, iako tačan mehanizam putem kog dolazi do ovakvih pojava nije jasan (Dwyer i sar., 2014; Lobritz i sar., 2014). Međutim, kod soja ATCC 25923 na koncentraciji emodina koja ubrzava respiraciju nema promene biomase biofilma.

Često se u analizama bakterijskog biofilma koriste različiti tipovi mikroskopije koji omogućavaju uvid u samu morfologiju biofilma, strukturu i raspored matriksa, pa čak i uvid u vijabilnost ćelija. SEM mikroskopija je jedna od tehnika koja se dosta koristi, jer daje uvid u morfologiju, organizaciju EPS-a, interakcije ćelija, ali i omogućava praćenje efekta antibiofilm agenasa, što sve doprinosi boljem razumevanju biofilma (Wilson i sar., 2017). Takođe, njena prednost je i što su dobijene mikrografije veoma visoke rezolucije. Stoga, sledeći korak je bio ispratiti efekat FA ekstrakta na već formirane biofilmove *S. aureus* putem SEM-a. Dobijeni rezultati bili su u skladu sa rezultatima dobijenim bojenjem biomase biofilma kristal violetom. Razvoj specifične morfologije i arhitekture biofilma je od značaja za patogenezu *S. aureus* (Kostakioti i sar., 2013). Uslovi životne sredine mogu poremetiti ćelijsku strukturu ali i strukturu biofilma i posledično promovisati formiranje biofilma kroz produkciju ekstracelularnog matriksa (Buzon-Duran i sar., 2017). Imajući u vidu da je ekstracelularni matriks svojevrsna barijera za antimikrobna sredstva i zbog toga predstavlja jedan od mehanizama rezistencije (Gebreyohannes i sar., 2019), razrastanje biofilma kod soja ATCC 25923 se može smatrati adaptivnim odgovorom na tretman FA ekstraktom. Zanimljivo je da je SEM mikroskopija pokazala da se kod sojeva Gp19 i Gp29 ćelije grupišu u klastere i da su u poređenju sa netretiranom kontrolom dosta manje veličine. Po literaturi, smanjena respiracija i samim tim nivo ATP-a mogu u ćelijama *S. aureus* izazvati odgovor na stres, terajući ih da formiraju kolonije malih varijanti (Frees i sar., 2014; Proctor i sar., 2019). Pored toga, primećene su značajne promene u arhitekturi matriksa. Preraspodela energije može biti potencijalno objašnjenje za promene uočene kod sojeva Gp19 i Gp29. Uribe-Alvarez i sar. (2016) objašnjavaju da ekspresija različitih puteva respiratornog lanca može usmeriti ćelije ka putevima odgovornim za formiranje biofilma. Kako stresni uslovi izazivaju različite odgovore kod bakterija, sve promene u strukturi matriksa mogu ukazivati na indukciju stresa izazvanog FA ekstraktom, što ih je posledično primoralo da se zaštite.

Iako se najčešće za vizuelizaciju biofilma primenjuje SEM mikroskopija, mikroskopija atomskih sila ima takođe svojih prednosti u ovom polju. Glavna prednost AFM-a u odnosu na SEM

jeste što se može raditi u ambijentalnim uslovima bez bojazni za oštećenjem uzorka, a takođe daje i trodimenzionalni prikaz površine uzorka i njegove topografije. AFM mikroskopijom se lako može pratiti efekat antimikrobnih agenasa na samu morfologiju biofilma (Chatterjee i sar., 2014). Prema tome, efekat test supstanci na već formirani biofilm ispraćen je i primenom AFM mikroskopije, gde su dobijeni 3D prikazi biofilma, kao i promene u hrapavosti površine biofilma. Generalno, *S.aureus* je poznat po formiranju robusnih, višeslojnih biofilmova sa jasnom sposobnošću formiranja trodimenzionalne strukture oblikovane aktivnošću različitih enzima (Archer i sar., 2011). *S.aureus* je takođe poznat po rastu u klasterima, što u planktonu što u biofilmu, ali i po sposobnosti da formira agregate preko PIA puta (Haaber i sar., 2012), što se može primetiti na 3D mikrografijama netretiranih biofilmova. Kao što je već napomenuto, stresni uslovi mogu poremetiti specifičnu arhitekturu biofilma, bilo da dođe do rasturanja biofilma bilo da same ćelije u zajednici moraju da se zaštite. Takve promene u morfologiji i strukturi biofilma su uočene kod tretmana svih sojeva osim Gp7 pod tretmanom emodinom. Pored toga, FA ekstrakt i emodin su uticali na hrapavost biofilma skoro svih sojeva. Zanimljivo je da je hrapavost bila značajno povećana kod sojeva Gp41 i Gp29 u tretmanu FA ekstraktom, dok je emodin doveo do značajnog povećanja hrapavosti kod sojeva ATCC 25923 i Gp41. Ovaj efekat se može pripisati ranije spomenutoj i opisanoj sposobnosti emodina da intereaguje sa ćelijskom membranom (Liu i sar., 2015). Štaviše, Neethirajan i DiCiccio (2014) tvrde da interakcija antimikrobnih agenasa i ćelijske membrane modulira oblik ćelije, što rezultira povećanjem hrapavosti njene površine i verovatno posledično dovodi do izmena i u morfologiji površine biofilma. Sa 3D topografija biofilma soja ATCC 25923 tretiranog FA ekstraktom uočava se pojava većih depresija sa ostacima matriksa i ćelija po njihovim obodima, što ide u prilog rezultatima kristal violet bojenja koji govore da je ukupna biomasa biofilma povećana. Međutim, dobijene mikrografije su pokazale da je emodin dezintegrisao biofilm soja Gp41 na agregate i formirao depresije u biofilmu soja ATCC 43300 što je u skladu sa dobijenim rezultatima kristal violet bojenja.

Ćelije biofilma uronjene su u organski ekstracelularni matriks koje same produkuju i koji je uključen u njihovu interakciju sa sredinom; on se najčešće sastoji od polisaharida, eDNK i proteina (Di Martino, 2018; Mishra i sar., 2020). EPS omogućava adheziju i agregaciju u višeslojnim biofilmovima, a još važnija je činjenica da predstavlja barijeru koja sprečava prolazak antimikrobnih agenasa do ćelija. Imajući ovo u vidu, mnoga antibiofilm jedinjenja za ciljno mesto imaju upravo matriks biofilma čija bi dezintegracija dovela do izloženosti ćelija ovim agensima (Mishra i sar., 2020). Stoga, kako bi se stekao još bolji uvid u mehanizam antibiofilm delovanja FA ekstrakta i emodina, ispitan je njihov efekat na najčešće komponente ekstracelularnog matriksa *S. aureus* – ekstracelularne polisaharide i eDNK.

Kada su polisaharidi u biofilmu u pitanju, oni su važni za njegovu arhitekturu, s obzirom da omogućavaju difuziju hranljivih materija i adheziju, kao i da sprečavaju fagocitozu bakterijskih ćelija (Little i sar., 2014). Prema literaturi, polisaharidi rastvorni u vodi su od značaja jer mogu poslužiti kao izvor energije i hrane u nepovoljnim uslovima (Liu i sar., 2017). S druge strane, polisaharidi nerastvorni u vodi doprinose stabilnosti biofilma i omogućavaju adheziju, te je od većeg značaja inhibitorni efekat na njima. Destabilizacija ovih glukana omogućila bi uspešnije lečenje infekcija izazvanih biofilmovima. Tako su Islam i sar. (2008) u svom istraživanju pokazali da je jedinjenje 1-dezoksinoirimidin kod *Streptococcus mutans* dovelo do veće inhibicije nerastvornih glukana u odnosu na one rastvorne u vodi. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata moglo se primetiti da su u matriksu biofilma testiranih sojeva dosta zastupljeniji bili glukani rastvorni u vodi, na kojima je inhibitorni efekat bio izraženiji. Xiang i sar., 2017 su u svom istraživanju predložili da aloe-emodin deluje na biofilm sprečavajući produkciju ekstracelularnog matriksa. Inhibitorni efekat test supstanci inače nije bio izražen na svim sojevima; inhibicija je uočena kod oba ATCC soja, Gp19 i Gp29. Uz to, efekat FA ekstrakta i emodina na glukane nerastvorne u vodi bio je izuzetno slab ili nije dovodio do značajnih promena, dok je u slučaju tretmana Gp7 soja ekstraktom čak uočeno značajno povećanje njihove produkcije.

Glavni konstituent matriksa biofilma *S. aureus* je PIA, koji je dugački linearni polisaharid katjonske prirode čija dužina doprinosi rastvorljivosti u vodi. Upravo PIA može biti razlog većoj

zastupljenosti polisaharida rastvornih u vodi. Slični rezultati dobijeni su u studiji Koo i sar., (2003) gde je supstanca apigenin povećavala udeo polisaharida rastvornih u vodi u poređenju sa kontrolom kod *S. mutans*. S druge strane, apigenin je negativno uticao na sintezu nerastvornih EPS, te su adhezija i dalja akumulacija *S. mutans* u biofilmu bili redukovani. Slično, Liu i sar. (2019) pokazali su da surfaktin može sprečiti formiranje biofilma delovanjem na glukane nerastvorne u vodi kod soja *S. mutans*. Međutim, nasuprot ovim literaturnim podacima, u ovom istraživanju, kod pojedinih sojeva i određenih tretmana došlo je i do dodatne produkcije nerastvornih glukana. Dobijeni rezultati inhibitornog efekta test supstanci na glukane rastvorne u vodi i sa druge strane odsustvo efekta na glukane nerastvorne u vodi, ili čak njihovo povećanje, mogu ukazivati na preraspodelu neophodne energije u biofilmu. Može se reći da je energija preusmerena na produkciju nerastvornih glukana kako bi se održala stabilnost biofilma i sprečio prolazak agenasa do ćelija. Dodatno, rezultat se može objasniti indukcijom stresa od strane test supstanci, što je vodilo ka povećanoj produkciji nerastvornih polisaharida. Kako je već napomenuto da oni doprinose stabilnosti biofilma, ovakav rezultat ide u prilog ovoj činjenici. Svi ovi podaci, literaturni i dobijeni u ovom istraživanju, ukazuju na veliku ulogu polisaharida u matriksu biofilma i na njihov doprinos opstanku i otpornosti biofilma.

Druga važna komponenta u matriksu biofilma *S. aureus* je eDNK, čije prisustvo može biti rezultat ćelijske lize ili aktivnog izbacivanja (Schwartz i sar., 2016). Ona može interagovati sa ostalim komponentama matriksa doprinoseći strukturi biofilma i odbrani od antimikrobnih agenasa, a može imati i ulogu u formiranju biofilma (Karygianni i sar., 2020). Okshevsky i sar. (2015) ukazuju da se umesto enzimske razgradnje eDNK u borbi protiv bakterijskih biofilma treba fokusirati na destabilizaciju veza između eDNK i ostalih komponenata ćelijskog matriksa. Stoga, ispitan je efekat FA ekstrakta i emodina na koncentraciju ove komponente matriksa. FA ekstrakt kao i emodin su doveli do smanjivanja količine eDNK kod pojedinih sojeva. Kod soja ATCC 43300 količina eDNK je smanjena pod uticajem FA i emodina, ali je istovremeno smanjena i biomasa biofilma, što može ukazivati na činjenicu da je eDNK bila u velikoj meri zastupljena u biofilmu ovog soja i da je doprinosila njegovoj stabilnosti. Slični rezultati dobijeni su u studiji Yan i sar. (2017), gde je dolazilo do značajne redukcije koncentracije eDNK u biofilmu *S. aureus* tretiranog emodinom. Brackman i sar. (2016) su pokazali da jedinjenje hamamelitanin značajno smanjuje količinu eDNK u biofilmu sojeva *S. ureus*. Uklanjanje, odnosno smanjenje količine eDNK u matriksu utiče na osetljivost biofilma, s obzirom da ova komponenta doprinosi adheziji kao i zaštiti od antimikrobnih agenasa. Sa druge strane, u slučaju pojedinih sojeva obe supstance su dovela i do povećanja u količini eDNK u matriksu biofilma. Tako se primećuje da su kod soja ATCC 25923 rezultati u skladu sa rezultatima bojenja kristal violetom gde se vidi da je na istoj koncentraciji FA ekstrakt povećavao i biomasu biofilma i količinu eDNK u njemu. Mlynek i sar. (2016) su pokazali da određene koncentracije amoksicilina takođe dovode do povećanog prisustva eDNK u matriksu *S. aureus*. Slične rezultate dobili su i Doroshenko i sar. (2014) koji su biofilme tretirali meticilinom i vankomicinom što je do povećanja eDNK. Takođe, pokazano je i da nikotin povećava količinu eDNK u matriksu biofilma *S. aureus* (Shi i sar., 2019). U svim ovim studijama utvrđeno je da testirane supstance dovode do ćelijske lize, što posledično vodi ka oslobađanju dodatne eDNK i samim tim do povećane biomase i zaštite biofilma od antimikrobnih agenasa. Dodatno, pokazano je da povećane količine eDNK u matriksu sprečavaju prolazak vankomicina, ali i drugih antibiotika do ćelija, tako što ga vezuju za sebe (Doroshenko i sar., 2014; Brackman i sar., 2016). Suprotno navedenim podacima, Xiang i sar. (2017) pokazali su da aloe-emodin nema nikakvog uticaja na količinu eDNK u biofilmu sojeva *S. aureus*.

Još jedno od bitnih ciljnih mesta u borbi sa biofilmovima jesu ćelije perzisteri. Perzisteri predstavljaju subpopulacije ćelija, dormantne fenotipske varijante sposobne da prežive nepovoljne uslove, uključujući i izuzetno visoke antibiotske tretmane (Chang i sar., 2020). Jasno je da bi smanjenje broja ovih ćelija u biofilmu bilo od značaja u tretiranju infekcija izazvanih bakterijskim biofilmovima. Prema tome, sledeći korak je bilo ispitivanje da li FA ekstrakt i emodin imaju sposobnost da redukuju broj ćelija perzistera u formiranim biofilmovima *S. aureus*. Pored svih antibiofilm aktivnosti, obe test supstance su se pokazale kao umereno uspešne i u smanjenju broja

ćelija perzistera. Da pojedina jedinjenja poseduju ovu sposobnost pokazano je i u radu Orman i Brynildsen (2015), gde je azot oksid delovao na redukciju perzisternih ćelija *E. coli*. Gosh i sar. (2015) su u svom radu pokazali da aril-alkil-lizini redukuju brojnost perzistera kod MRSA sojeva *S. aureus*. Zna se da ova jedinjenja deluju preko ćelijske membrane, te je predložen i potencijalni mehanizam delovanja na perzistere. Smatra se da, iako metabolički drugačije od planktonskih ćelija, perzisterne ćelije zadržavaju osetljivost na agense koji deluju na ovaj način, te da je upravo to mehanizam preko kog su ova jedinjenja smanjila njihovu brojnosti. Kako je prethodno pominjano da emodin deluje na permeabilnost membrane sojeva *S. aureus*, možemo da pretpostavimo da na isti način deluje i na ćelije perzistera, obzirom da je kod svih sojeva doveo do smanjenja njihove brojnosti u već formiranim biofilmovima. Pored toga, Mina i Marques (2016) su pokazali i da cis-2-dekanoinska kiselina znatno smanjuje broj ćelija perzistera i omogućava bolji efekat antibiotika ciprofloksacina kod soja *S. aureus*. Lee i sar. (2016) pokazuju i da halogenizovani indoli mogu ubijati ćelije perzistera kod sojeva *S. aureus* i *E. coli*. Dodatno, Song i Wood (2020) su dali pregled bakterijskih vrsta na čije perzistere modifikovani indoli imaju efekta, a među kojima je i *S. aureus*. Bojer i sar. (2018) su pokazali aktivnost fenol-rastvornih modulina na perzistere *S. aureus* i to u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi rasta. Na osnovu svih do sada poznatih podataka o jedinjenjima koja redukuju broj ćelija perzistera i njihovog mehanizma dejstva, predložene su i tri grupe jedinjenja: a) koja direktno ubijaju perzistere zaobilazeći potrebu za metabolički aktivnim ćelijskim procesima, b) povećavaju osetljivost perzistera na antibiotike kroz reanimaciju, odnosno prelazak u metabolički aktivnu formu osetljiviju na delovanje jedinjenja i c) sposobna da ometaju ili sprečavaju formiranje perzistera (Dafraine i sar., 2018). Ipak, ne postoji striktna granica u mehanizmima delovanja ovih grupa jedinjenja, te često neka jedinjenja mogu delovati na više načina. Međutim, u dobijenim rezultatima, nasuprot ostalim sojevima, izuzetak predstavljaju sojevi Gp19 i Gp7, kod kojih je FA ekstrakt doveo do povećanja broja ovih ćelija. Potencijalno objašnjenje za ovakva dešavanja dali su Conlon i sar. (2016) koji su pokazali da smanjenje proizvodnje ATP-a dovodi do povećanog broja perzistera *S. aureus*. Ovu tvrdnju su dokazali tretiranjem ćelija arsenatom u cilju smanjenja intracelularnog ATP-a, što je rezultiralo višestrukim povećanjem broja perzistera. S obzirom da je kod ovih sojeva dolazilo do smanjenja aerobne respiracije u biofilmu u tretmanu FA ekstraktom, možemo smatrati da je upravo smanjena respiracija vodila smanjenju ATP-a i samim tim povećanju broja perzistera.

U potrazi za novim strategijama u borbi sa rezistencijom, značajno mesto imaju takozvana antivirulentna jedinjenja. Ova jedinjenja ne utiču na sam bakterijski rast, već utišavaju njihove faktore virulencije koji im omogućavaju preživljavanje i povećavaju patogenost (Xue i sar., 2019). Jedan od važnih faktor virulencije kod sojeva *S. aureus* je njihov karotenoidni pigment stafiloksantin, koji se ponaša kao antioksidant i štiti od negativnog uticaja ROS-a koje produkuju neutrofili domaćina (Ni i sar., 2018). Inhibicija sinteze ovog pigmenta učinila bi ćelije osetljivijim na dejstvo terapeutika, te imajući ovo u vidu, ispitan je efekat FA ekstrakta i emodina na produkciju stafiloksantina. Njihov efekat na produkciju pigmenta bio je veoma slab, a najizraženiji kod soja ATCC 43300. Bez obzira na ovakve rezultate, literaturni podaci pokazuju da pojedina jedinjenja imaju sposobnost inhibicije sinteze stafiloksantina kod MRSA sojeva. Sakai i sar. (2011) su u svom istraživanju ispitali i pokazali da jedinjenja koja su poznata kao inhibitori lipidnog metabolizma (ksantohumol, rulenin, dihidrobisvertinol, zaragoinska kiselina) inhibiraju i produkciju stafiloksantina. Takođe su pokazali i da dva antrahinona poreklom iz aktinomiceta (6-deozoksi-8-O-metilrabelomicin i tetrangomicin) ostvaruju isti efekat na MRSA sojevima. S obzirom da su i ekstrakt i emodin pokazali određenu inhibitornu aktivnost na stafiloksantinu upravo kod MRSA soja, možemo reći da antrahinoni mogu biti dobri antivirulentni agensi. Lee i sar. (2012) ispitali su antivirulentni potencijal 12 flavonoida i pokazali da je najsnažniji efekat na produkciju stafiloksantina imao flavon. Dalje, Leejae i sar. (2013) su pokazali da rodomirten, jedinjenje iz lista *Rhodomyrtus tomentosa* uspešno inhibira sintezu stafiloksantina i povećava njegovu osetljivost na vodonik peroksid. Postoje podaci da je prirodno jedinjenje mirtenol pokazalo inhibitornu aktivnost na pigmentu kod MRSA sojeva i dodatno ih oslabilo za delovanje imunskog sistema domaćina (Selvaraj i sar., 2019). Pinto i sar. (2020) su pokazali da mircetin može smanjiti količinu pigmenta

kod MSSA sojeva. Ipak, iako dosta podataka ukazuje na sposobnost prirodnih jedinjenja da deluju na produkciju stafiloksantina, kod većine naših sojeva test supstance nisu bile naročito uspešne, čak su štaviše izazivale i dodatnu produkciju pigmenta. Slično su dokazali ponovo Pinto i sar. (2020), u čijem radu mircetin nije uopšte imao uticaj na produkciju pigmenta kod MRSA sojeva. Možemo reći i da naše test supstance, izazivajući povećanu produkciju pigmenta, podižu antioksidativnu zaštitu ćelija koju im pruža upravo pigment.

Budući da su i FA ekstrakt i emodin pokazali antibiofilm aktivnost kao i delovanje na pojedine komponente matriksa i na strukturu biofilma, da bi se dobila kompletnija slika i ispitao potencijalni mehanizam delovanja, ispraćen je njihov efekat na ekspresiju odabranih gena. Odabrani su geni koji su od značaja za soj *S. aureus*, oni koji učestvuju u formiranju biofilma i posebno matriksa (*icaA* i *icaD*) i oni koji su uključeni u metabolizam i odgovorni za prelazak sa aerobne na anaerobnu respiraciju (*srrA* i *srrB*), ali i mikro RNK odgovorna za regulaciju brojnih virulentnih faktora (RNA III).

Dominantan put formiranja biofilma kod *S. aureus* jeste preko sinteze PIA, kodirane konzervisanim *ica* operonom prisutnim kod većine izolata ovog soja (Goerke i Wolz, 2010; Haaber i sar., 2012). Ova tvrdnja je potvrđena u našem radu, s obzirom da je kod svih izolata bio prisutan ovaj operon. Operon se sastoji od gena *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*, ali glavni geni odgovorni za produkciju PIA jesu *icaA* i *icaD* (Schilcher i Horswill, 2020), te je zato ispraćen efekat test supstanci na ova dva gena. Posmatrajući dobijene rezultate, primećeno je da za ekspresiju ovih gena nema statistički značajnih promena u tretmanima, ali da one ipak postoje. Kod izolata Gp41 pod tretmanom FA ekstraktom se uočava jasna situacija – ekspresija oba gena je smanjena, dok je bojenje kristal violetom pokazalo da nema značajne promene u biomasi biofilma. Ipak, eDNK je u tretmanu FA ekstraktom povišena, što može ići u prilog dobijenim rezultatima i govoriti da upravo eDNK u ovom biofilmu doprinosi biomasi, te se ne vide značajne promene u ukupnoj količini. Sa druge strane, FA ekstrakt je doveo do povišene ekspresije oba gena kod izolata Gp19 i Gp7. Kod ovih sojeva nema značajnih promena u biomasi. Ovakav rezultat možemo objasniti pojavom da je ekstrakt, stimulišući ekspresiju gena održavao količinu ekstracelularnih polisaharida, što se vidi i u rezultatima kvantifikacije polisaharida, dok je s druge strane smanjivao količinu eDNK. Na ovaj način održavala se količina biomase kao i u netretiranim biofilmovima. Kod ostalih sojeva FA ekstrakt nije dovodio do značajnih promena u ekspresiji ovih gena. Kada je u pitanju emodin, možemo primetiti da je on dovodio do smanjene ekspresije oba gena kod sojeva ATCC 43300 i Gp29, što se ogledalo i u smanjenoj biomasi biofilma kvantifikovanoj bojenjem kristal violetom. Dodatno, ovim rezultatima u prilog ide i rezultat da je emodin smanjio i količinu ekstracelularnih polisaharida ali i eDNK. Prema tome, kod ovih sojeva emodin deluje na biofilm smanjujući produkciju glavnog adhezina i polisaharida – PIA, ali i drugih komponenti matriksa. Poznato je da komponente matriksa mogu međusobno interagovati i samim tim održavati biofilm, a smanjena količina komponenti smanjuje i njihovu interakciju, što čini biofilm osetljivijim na delovanje antibiofilm agenasa. Suprotno se primećuje kod sojeva ATCC 25923, Gp41 i Gp7 gde je došlo do povišene ekspresije oba gena pod uticajem emodina, ali njihova biomasa nije bila promenjena ili je došlo do blagog smanjenja. Interesantno je da je kod ovih sojeva produkcija polisaharida bila smanjena ili nepromenjena, dok je eDNK bila povišena. Kako se matriks biofilma osim polisaharida i eDNK sastoji i od proteina, potrebno je ispratiti efekat i na njih, jer objašnjenje ovakvog rezultata možda leži u efektu baš na pomenutu komponentu.

Kada je u pitanju metabolizam *S. aureus*, veoma važnu ulogu ima dvokomponentni sistem *srrAB*, koji se sastoji iz transmembranskog senzornog protein *SrrB* i specifične histidin kinaze *SrrA* koja funkcioniše kao intracelularni regulator odgovora. Ovaj sistem reaguje na promene kiseonika kao i respiratorni status. Dodatno, pokazana je i veza između ovog sistema i formiranja biofilmova. *srrAB* može stimulisati formiranje biofilmova, posebno u mikroaerofilnim i anaerobnim uslovima, kada utiče na ćelijsku lizu i oslobađanje DNK što promoviše formiranje biofilma (Rudra i Boyd, 2020). Kako je praćen efekat test supstanci na aerobnu respiraciju sojeva u biofilmu i samu vezu biofilma i metabolizma, sledeći korak u rasvetljavanju mehanizma delovanja supstanci bilo je ispitivanje njihovog efekta na ekspresiju gena *srrA* i *srrB*. Analizirajući dobijene rezultate

primećuje se da su obe test supstance imale efekat na ekspresiju *srrA* gena. FA ekstrakt je snizio ekspresiju oba gena kod sojeva ATCC 25923 i Gp29, dok je njihova aerobna respiracija ostala nepromenjena. S obzirom da ova promena nije statistički značajna možemo smatrati da iz tog razloga ne dolazi do značajne promene u nivou respiracije. Kod sojeva Gp41 i Gp7, smanjena je ekspresija *srrA* gena pod delovanjem FA ekstrakta, a takođe je zabeležena i smanjena respiracija u biofilmu ovih sojeva. Ovakva pojava može ukazivati na metaboličku promenu, tačnije prelazak na anaerobni metabolizam u cilju zaštite od delovanja supstance ili jednostavno inhibiciju metabolizma ćelija u biofilmu. Nadalje, što se tiče emodina, kod soja ATCC 43300 primećeno je blago smanjenje ekspresije gena što je u skladu i sa smanjenom respiracijom ali i sa destrukcijom biofilma uočenom kvantifikacijom biomase biofilma kristal violetom. Suprotno tome, iako je biofilm soja Gp41 bio dezintegrisan, ekspresija gena *srrAB* kompleksa je bila blago povišena, što je dovelo do pretpostavke da je emodin bio okidač za metaboličku promenu u cilju zaštite od njegovog delovanja.

Rudra i Boyd (2020) navode da ekspresija *srrAB* kompleksa može potisnuti transkripciju RNAPIII. Ona je jedan od glavnih efektor *quorum sensing* sistema, multifunkcionalna RNK pod čijom kontrolom su brojni faktori virulencije *S. aureus* ali i njihovi odgovori na stres iz spoljašnje sredine (Bronesky i sar., 2016). U skladu sa tim zabeleženo je smanjenje ekspresije RNAPIII pod uticajem emodina kod soja Gp41, gde je ekspresija *srrA* bila povišena. S druge strane, ekstrakt je blago smanjio ekspresiju *srrA*, ali značajno RNAPIII. Takođe, u skladu sa navodima, primećena je suprotna situacija kod sojeva ATCC 43300 i Gp19. Naime, kod soja ATCC 43300 obe test supstance stimulišu ekspresiju RNAPIII, a kod soja Gp19 samo emodin, dok ujedno obe supstance smanjuju ekspresiju *srrAB* kompleksa. Interesantno je da obe test supstance kod sojeva ATCC 25923 i Gp29 dovode do značajnog smanjenja ekspresije RNAPIII iako se ne primećuje povećanje regulacije *srrAB* kompleksa. Smanjenje ekspresije RNAPIII može voditi ka povećanoj proizvodnji adhezina i liganda neophodnih za interakciju sa ćelijama domaćina (Proctor i sar., 2019), što bi moglo da objasni nepromenjenju ili blago povećanu biomasu biofilma ovih sojeva. Novije studije u vezi sa mikro nekodirajućim RNK pokazuju da one imaju ulogu u metabolizmu i formiranju biofilma, kao i da mogu da preusmere upotrebu ugljenika za proizvodnju ekstracelularnog matriksa (Marincola i sar., 2019). Sa druge strane, smanjenje RNAPIII omogućava bakterijama da pređu iz virulentnog u mirniji tip, s obzirom da je RNAPIII deo *agr quorum sensing* sistema koji kontroliše faktore virulencije kod *S. aureus* (Tuchscherr i sar., 2011). Smanjen nivo RNAPIII, koji omogućava lak prelazak na manje virulentne forme koje proizvode više adhezina, predstavlja odličnu strategiju za preživljavanje *S. aureus* (Proctor i sar., 2014), ali otežava borbu čoveka sa ovim patogenom.

Pored bakterijske rezistencije, kancer se smatra vrlo izazovnim problemom današnjice sa kojim se susreće čovečanstvo. Uzimajući u obzir problem kancera i njegovog lečenja, jasno je da je neophodno pronaći nove agense koji bi bili od pomoći u njegovom rešavanju. Osim pojave rezistencije kancera na dostupne hemioterapeutike, posledice i neželjeni efekti do kojih dovode medikamenti kao i česta neselektivna toksičnost podjednako predstavljaju probleme u terapiji. Stoga, prirodna jedinjenja mogu imati veoma dobre efekte u terapiji kancera i ublažavanju propratnih tegoba, te se sledeća celina disertacije bavila ispitivanjem citotoksičnog potencijala FA ekstrakta i emodina. Budući da se *F. alnus* prvenstveno koristi kao laksativ i da je većina istraživanja usmerena upravo u ovom smeru, oskudni su literaturni podaci o ovim aktivnostima krušine. Dodatno, poznato je da preparati na bazi krušine, kao i ostali bogati antrahinonima, mogu prouzrokovati oštećenja epitelnih ćelija creva, te dalje dovesti do razvoja kolorektalnog karcinoma (Srinivas i sar., 2007). Iz tog razloga, za ispitivanje su odabrane ćelijske linije hepatokarcinoma (HepG2) i kancera kolona (HCT116), ali i normalna ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5), s obzirom da hemioterapeutici često ispoljavaju neselektivni efekat.

FA ekstrakt je u MTT testu pokazao snažan inhibični efekat na vijabilnost kancerskih ćelijskih linija, dok na normalnoj ćelijskoj liniji efekta nije ni bilo. Sličan efekat dobijen je i u studiji Kosalec i sar. (2012) gde je doza od 500 µg/mL dovela do smanjene vijabilnosti HPBL ćelija. Azadkhan i Farahani (2016) pokazali su da ekstrakt krušine smanjuje vijabilnost HEK ćelija, međutim, na dosta višim koncentracijama nego u našoj studiji. Ekstrakt *Rhamnus frangula*, koja

pripada istoj familiji, pokazao je inhibitorski efekat na vijabilnost MCF ćelija (Shokoohian i sar., 2015). Ispitujući efekat velikog broja biljnih ekstrakata na vijabilnost ćelijskih linija, Lombardi i sar. (2017) su ukazali da ekstrakt *Rhamnus frangula* u velikoj meri smanjuje vijabilnost ćelija SW872, SW982, HS 39.T, HS 5.T, HL-60, M14WM, MCF-7 i HT29 i na dosta nižim koncentracijama (25 µg/mL). Razlike u rezultatima navedenih studija se pre svega mogu pripisati različitoj osetljivosti ćelijskih linija koje su korišćene, ali i samom ekstraktu i načinu njegovog dobijanja. Ovakva citotoksična aktivnost koja je zabeležena na kancerskim ćelijskim linijama može se pripisati fenolnim i flavonoidnim jedinjenjima kojima je FA ekstrakt bogat. Prirodni polifenoli, kao najzastupljeniji antioksidanti, imaju sposobnost da deluju kao hemopreventivni ili hemioterapeutski agensi (Robles-Fernandez i sar., 2013). Polifenoli imaju više zaštitivnih efekata među kojima su antioksidativni, antiproliferativni, efekat na indukciju apoptoze i različite signalne puteve u ćelijama, što ih sve čini efikasnim hemopreventivnim agensima (Sharma i sar., 2018). U studiji Campbell i sar. (2004) pokazano je da izolovani polifenoli poput katehina, kvercetina, epikatehina, ali i fenolnih kiselina kao što su siringinska, kafeinska, ferulična imaju efekat na ćelije karcinoma dojke (T47D, MCF7, MDA-MB-231) i prostate (DU-145, PC3, LNCaP) u dozno i vremenski zavisnom maniru. Dodatno, kora krušine je izuzetno bogata antrahinonima za koje je takođe pokazano da mogu imati antikancerski efekat. Ono što je primećeno jeste da boljoj citotoksičnoj aktivnosti antrahinona doprinose fenolne hidroksilne grupe na antrahinonskom prstenu (Li i Jiang, 2018).

Jedan od najproučavanijih antrahinona i ujedno najdominantnija komponenta FA ekstrakta jeste emodin. On je takođe pokazao efekat na smanjenje vijabilnosti kancerskih ćelijskih linija, naročito na HepG2 ćelijskoj liniji, na svim testiranim koncentracijama. U literaturi je potvrđeno da je emodin uspešan inhibitor mnogih vrsta kancera uključujući i karcinome kolona i jetre (Monisha i sar., 2016). Osnovni mehanizmi njegove citotoksičnosti jesu stvaranje ROS, inhibicija ekspresije kazein kinaze II, protein kinaze C, kinaze regulisane ekstracelularnim signalom (Lee i sar., 2017). Zhou i sar. (2019) su pokazali da emodin efikasno inhibira vijabilnost HepG2 ćelija u dozno i vremenski zavisnom maniru, što se podudara sa dobijenim rezultatima u ovoj studiji. Najraniji podaci o citotoksičnoj aktivnosti emodina pojavili su se 1976. godine i to za ćelije limfocitne leukemije P-388, a zatim 1984. godine za ćelije mišije leukemije L1210 (Srinivas i sar., 2007). Pokazano je da on ima efekat na vijabilnost HSC-2 i HSG ćelija, dok ne utiče na normalne ćelijske linije. Dodatno, pokazano je da ima antiproliferativno dejstvo, sprečava pojavu metastaza, povećava osetljivost ćelija kancera na radioterapije i hemioterapije i utičena multirezistentne ćelije kancera. Često se njegova antikancerska aktivnost pripisuje njegovom prooksidativnom delovanju u ćelijama. Dalje, Sharma i Tiku (2014) su pokazali odsustvo citotoksičnog delovanja emodina na normalnim ćelijskim linijama, što je sugerisalo da bi one mogle biti otpornije na emodin u odnosu na ćelije kancera. Navedeni podaci o odsustvu citotoksičnog efekta emodina na normalnim ćelijskim linijama jesu u skladu sa dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji. Jasno je da je za antikancersku aktivnost emodina odgovoran veliki broj puteva i mehanizama, te se sledeći deo disertacije bavio utvrđivanjem potencijalnog mehanizma njegovog delovanja, ali i samog FA ekstrakta, na odabrane ćelijske linije. Ispitivan je efekat na ćelijski ciklus, tip ćelijske smrti, mitohondrijski membranski potencijal i genotoksičnost.

Često se citotoksični efekat ne ostvaruje direktno već preko nekih drugih procesa esencijalnih za ćeliju kao što je ćelijski ciklus. Nekontrolisan ćelijski ciklus, izmenjene kontrolne tačke ćelijskog ciklusa kao i izbegavanje ćelijske smrti su jedne od glavnih odlika malignih ćelija, a upravo te njihove osobine mogu biti iskorišćene kao targeti za delovanje novih agenasa (Hanahan i Weinberg, 2011). Dobijeni rezultati su pokazali da i FA ekstrakt i emodin remete ćelijski ciklus svih testiranih ćelijskih linija, s tim da je efekat nešto izraženiji na kancerskim ćelijskim linijama, HepG2 i HCT 116. Obe test supstance su dovodile do zastoja u S fazi ćelijskog ciklusa i blagog nagomilavanja u G2/M fazi. Poznato je da u S fazi dolazi do sinteze DNK molekula i da su ćelije u ovoj fazi veoma osetljive na delovanje faktora iz okolne sredine, te ovako dobijeni rezultat nije iznenađujući. Očekuje se da polifenoli iz ekstrakta, kao najzastupljenija grupa sekundarnih metabolita koja je kvantifikovana, delom budu odgovorni za ovakav rezultat. Shin i sar. (2013) u

svom radu govore da različiti polifenoli mogu uticati na odvijanje ćelijskog ciklusa i to raznim mehanizmima. Najnovija studija Abutaha i sar. (2022) je ukazala da prirodni polifenoli zaustavljaju ćelijski ciklus u S fazi kod HepG2 ćelijske linije, što može uticati na sintezu DNK i posledično na dalji ćelijski ciklus. Malik i sar. (2021) ukazuju na značaj antrahinona koji imaju antikancersku aktivnost, te da je mnogi ostvaruju delovanjem na ćelijski ciklus. Ova grupa autora je navela da brojni antrahinoni izazivaju zastoj ćelijskog ciklusa u S fazi (između ostalog i kod HCT 116 ćelijske linije), ali i da se mogu vezati za molekule DNK, inhibirati topoizomerazu II i na taj način ispoljiti svoju citotoksičnost. Nadalje, brojni su podaci koji pokazuju antikancersku (citotoksičnu) aktivnost emodina koju ostvaruje na raznim ćelijskim linijama uključujući i HepG2 i to baš zaustavljanjem ćelijskog ciklusa i izazivanjem apoptoze (Semwal i sar., 2021). Hsu i sar. (2010) su u svom istraživanju ukazali da emodin dovodi do zastoja u G2/M fazi i dovodi do pada u broju ćelija u S fazi na ćelijama hepatokarcinoma. Slične rezultate su u svojoj studiji prikazali i Suboj i sar. (2012) za aloe-emodin koji je dovodio do zastoja ćelijskog ciklusa ćelija kancera kolona (SW480, SW620, RKO i WiDr), posebno u G2/M tački. G2/M kontrolna tačka ćelijskog ciklusa ima značaj u prevenciji uvođenja oštećenih ćelija u mitozu i dalju proliferaciju. Shodno tome, od značaja je uočeni trend u dobijenim rezultatima gde obe test supstance kod svih ćelijskih linija dovode do blagog nakupljanja ćelija u ovoj fazi. Brojni su mehanizmi putem kojih emodin ostvaruje ovo delovanje, a najčešće je to delovanje na ekspresiju različitih gena, kao i delovanje na ciklin kinaze koje regulišu faze ćelijskog ciklusa.

Svi prethodno navedeni literaturni podaci o delovanju emodina na faze ćelijskog ciklusa u skladu su sa dobijenim rezultatima u našoj studiji. Budući da literaturni nalazi dodatno govore i da remećenje ćelijskog ciklusa emodinom vodi ka apoptozi (Semwal i sar., 2021), kao i da su u ovom istraživanju FA ekstrakt i emodin sa porastom koncentracije povećavali broj ćelija u SubG1 fazi (apoptotičnih ćelija) svih ćelijskih linija, sledeći korak u istraživanju se odnosio na ispitivanje sposobnosti test supstanci da indukuju apoptozu i da se utvrdi tip ćelijske smrti. Mehanizmi kojima se kontroliše ćelijski ciklus povezani su i sa mehanizmima regulacije ćelijske smrti. Rezultati dobijeni primenom Annexin V-FITC/7-AAD bojenjem potvrdili tip ćelijske smrti. I u ovom slučaju, efekat je bio izraženiji na kancerskim ćelijskim linijama, dok je na normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 uočen samo na dve najviše testirane koncentracije. U prilog ovakvom rezultatu ide i činjenica da je apoptoza regulisana događajima koji su kod kancerskih ćelija izmenjeni, te da su ovi procesi pogodna ciljna mesta za delovanje novih agenasa. Yu i sar. (2013) u svom radu pokazuju da emodin uvodi HepG2 ćelije u apoptozu zaustavljanjem ćelijskog ciklusa što se podudara sa rezultatima naše studije. Štaviše, pokazano je i da emodin aktivira kaspaze (kaspaza 8 i kaspaza 9) koje su u ćeliji prisutne u neaktivnoj formi i potreban im je pokretač za uvođenje u proces apoptoze. Dodatno, ova grupa autora je pokazala i da emodin pokreće i p53 signalni put koji vodi ka apoptozi. Još jedna grupa autora je pokazala da emodin uvodi ćelije hepatokarcinoma u apoptozu i to povećanjem ekspresije p53, ali i zastojem u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Shieh i sar., 2004). Aloe-emodin takođe aktivira kaspazu 9 i dovodi do ulaska u apoptozu (Suboj i sar., 2012). Saunders i sar. (2019) su primenom Annexin V-FITC/7-AAD pokazali da emodin kod ćelija kolorektalnog karcinoma indukuje apoptozu i to u dozno i vremenski zavisnom maniru. U ovom slučaju, broj ćelija u kasnoj apoptozi se povećao nakon 72 h. Wang i sar. (2018) su takođe pokazali efekat emodina na apoptozu HCT 116 ćelija i aktivaciju kaspaza.

Primećeno je da sa porastom testiranih koncentracija obe test supstance raste broj ćelija u kasnoj apoptozi, a da na najvišoj koncentraciji ćelije naglo ulaze u nekrozu. Ovakav efekat je nešto izraženiji za emodin, posebno na HCT 116 ćelijskoj liniji. Nekroza je vid nekontrolisane ćelijske smrti koja se najčešće javlja pri izlaganju visokih doza toksičnih supstanci, te ćelija gubi osnovna svojstva regulacije semipermeabilnosti membrane i energetskog metabolizma. U tom smislu su Leist i sar. (1997) pokazali da se indukovana ćelijska apoptoza može završiti nekrozom kada su intracelularni nivoi ATP-a niski. Dodatno, u ovom procesu dolazi do narušavanja ćelijske membrane i okolne inflamacije zdravog tkiva. Zbog toga, poželjnije je delovanje test supstanci na indukciju apoptoze nego nekroze. Ono što nije bilo poželjno jeste da je emodin povećao broj nekrotičnih ćelija kod MRC-5 ćelijske linije, ali pre svega u visokim primenjenim dozama in vitro.

Iako je apoptoza uobičajen mehanizam citotoksičnog delovanja emodina, signalni putevi u različitim ćelijama mogu da variraju. Spoljašnji faktori mogu da indukuju apoptozu delovanjem kroz unutrašnji put (mitohondrijalni) i spoljašnji (aktivacija receptora smrti), a ishod oba puta je aktivacija kaspaza. Povećanje permeabilnosti spoljašnje membrane mitohondrija preko promene membranskog potencijala, kao i oslobađanje intracelularnih proteina su karakteristike mitohondrijalnog puta apoptoze (Saunders i sar., 2019). Prema tome, ispraćen je i efekat test supstanci na mitohondrijski membranski potencijal. Kao i u prethodnim testovima, FA ekstrakt i emodin su u manjoj ili većoj meri remetili MMP kod svih ćelijskih linija. FA ekstrakt je indukovao dozno-zavisno odogovor, dok je emodin efekat imao na dve najviše koncentracije. Rezultati koji su dobijeni u disertaciji, u skladu su sa podacima u dostupnoj literaturi. Xie i sar. (2014) su pokazali da emodin dovodi do gubljenja MMP HCT 116 ćelijskih linija kao i da pokreće p53 put i uvodi ćelije u apoptozu. Takođe, pokazali su i da emodin deluje na inhibiciju Bcl-2 proteina te dovodi do oslobađanja citohroma c i pokretanja unutrašnjeg puta apoptoze. Sa druge strane, u studiji Zhang i sar. (2017) ispitan je efekat emodina na funkcije mitohondrija kod HepG2 ćelija i pokazano da on remeti MMP u dozno-zavisnom maniru, što je slučaj i sa dobijenim rezultatima naše studije, kao i da ulazi u same mitohondrije. Detaljnije je pokazano i da snižava nivo ATP-a i da vodi u apoptozu upravo delovanjem preko mitohondrija. Saunders i sar. (2019) su primenom JC-1 boje dokazali da emodin remeti MMP ćelija kolorektalnog karcinoma. Liu i sar. (2012) su takođe korišćenjem JC-1 boje na ćelijama kancera pankreasa pokazali da dolazi do smanjenja MMP u ćelijama tretiranim emodinom. U još jednoj studiji, pokazano je da emodin dovodi do gubitka MMP kod ćelija kancera kolona LS1034 (Wei i sar., 2013).

Još jedna dodatna aktivnost koja je ispitana bila je genotoksičnost FA ekstrakta i emodina, s obzirom da se citotoksičnost agenasa može ispoljiti i genotoksičnim delovanjem. Rezultati koji su dobijeni pokazali su da su obe test supstance ispoljile genotoksičan efekat na svim ćelijskim linijama. Ovo je u skladu sa rezultatima Brkanac i sar. (2015) koju su pokazali takođe genotoksičan efekat ekstrakta *Frangula alnus* i emodina na humanim perifernim limfocitima (HPBL). Dodatno i neke ranije studije pokazale su da emodin ima genotoksičan efekat na raznim ćelijskim linijama (Westendorf i sar., 1990; Mueller i sar., 1999; Li i sar., 2010).

Iz ugla bezbednosti primene ovih supstanci, ne ide u prilog činjenica o genotoksičnosti, kao ni uočeni efekat na ćelijski ciklus, apoptozu i membranski potencijal na normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5. Međutim, činjenica da su uočeni efekti bili izraženiji na kancerskim ćelijama pruža mogućnost da se odgovarajućim izborom koncentracija postigne željeni antikancerski efekat uz minimizovanje efekta na normalnim ćelijama, što svakako zahteva dalja istraživanja. Kako je dolazilo do zastoja ćelijskog ciklusa u S fazi i kasnijeg nagomilavanja u G2/M fazi, možemo reći da su oštećenja na molekulu DNK dovela do ovakvog rezultata, kao i da oštećenja nisu uspešno reparirana. Sama fragmentacija molekula DNK je odlika apoptotičnih ćelija. Ovakva oštećenja mogu da aktiviraju p53 signalni put i dovesti do apoptoze. Obzirom na genotoksični efekat test supstanci kao i literaturne podatke o aktivaciji p53 signalnog puta apoptoze od strane emodina, možemo povezati dobijene rezultate u ovoj studiji. Genotoksični i pro-apoptotski efekat test supstanci na ćelijskim linijama u disertaciji mogu ukazivati da nije došlo do adekvatne reparacije oštećenja, što je za posledicu imalo ćelijsku smrt. Dodatno, pojedini literaturni podaci govore i da emodin može indukovati oštećenja na molekulu DNK što je u skladu sa dobijenim rezultatima genotoksičnog efekta (Shieh i sar., 2004; Yu i sar., 2013; Wei i sar., 2013). Pokazano je i da aloe-emodin poseduje genotoksični potencijal (Özenver i sar., 2018).

Uzimajući u obzir dobijene rezultate o efektima na ćelijski ciklus, apoptozu i mitohondrijski potencijal, primećuje se problem koji se ogleda u rezultatima vijabilnosti MRC-5 ćelijske linije u MTT testu. Naime, u ovom testu je pokazano da obe test supstance nisu citotoksične na normalnim fibroblastima, dok je u ostalim testovima pokazano da ipak dolazi do apoptotičnog efekta i kod njih. Obzirom da se radi o emodinu, kao i ekstraktu koji je bogat ovom supstancom, objašnjenje se može naći u literaturnim podacima Wang i sar. (2006) koji su ukazali na problem MTT testa kada se ispituje citotoksičnost emodina. Pouzdanost MTT testa, kao i njegova osetljivost, mogu biti izmenjeni faktorima kao što su zapremina ćelije, antioksidativni potencijal i obojenost test

supstance. Kako su test supstance izuzetno obojene, primećena je povećana OD vrednost na najvišim testiranim koncentracijama, te autori smatraju da je upravo njihova obojenost mogla dati lažne rezultate o odsustvu citotoksičnosti, poput ovih dobijenih u disertaciji.

Svi navedeni testovi i rezultati pokazuju da se citotoksičnost FA ekstrakta i emodina ostvaruju kroz apoptozu, koja se najčešće realizuje preko mitohondrijalnog puta. Literaturni podaci ukazuju da često dolazi do aktivacije raznih kaspaza kao i povišene ekspresije p53 puta, što bi trebalo dalje ispitivati. Dodatno, primećuje se i da genotoksični efekat doprinosi uspešnoj inhibiciji vijabilnosti kancerskih ćelija. Činjenice da je uočena veća genotoksičnost emodina, te da je ona potvrđena i u prethodno publikovanim rezultatima, ukazuju da je emodin svakako doprineo genotoksičnosti FA ekstrakta, ali se uključenost i drugih konstituenata ekstrakta ne može isključiti bez daljih istraživanja. Međutim, da bi se dalje rasvetlili mehanizmi antikancerskog delovanja uočeni ovoj studiji, neophodno je dalje ispitati efekat na ekspresiju određenih gena uključenih u procese regulacije ćelijskog ciklusa i indukcije apoptoze.

Sumirajući sve rezultate dobijene u doktorskoj disertaciji možemo reći da su FA ekstrakt i emodin dobri kandidati za dalja istraživanja u svrhu dobijanja novih antibakterijskih, antibiofilm i antikancerskih agenasa. Svakako za bezbednu i adekvatnu primenu potrebna su i dodatna istraživanja.

6. Zaključci

Rezultati dobijeni u disertaciji su ukazali da su postavljeni ciljevi ispunjeni i omogućili su izvođenje sledećih zaključaka:

1. Kvalitativna GC×GC-MS analiza pokazala je da su u ekstraktu od ukupnih jedinjenja najzastupljeniji bili etil ester 4-etoksi-benzoeve kiseline, 1-metil-3,5-bis[(trimetilsilil)oksi]-benzen, trimetil-(2,6 di-terc-butyl-fenoksi)-silan, azelainska kiselina i 2-metil-antrahinon. Sa druge strane, kvantitativna LC-MS/MS analiza pokazala je da je ekstrakt izuzetno bogat fenolnim jedinjenjima, a da je najdominantnija komponenta antrahinon emodin (15126±907), zatim flavonoid katehin, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska i vanilinska kiselina.
2. FA ekstrakt ima dobru sposobnost inhibicije DPPH radikala sa EC₅₀ vrednošću 7 µg/mL dok antioksidativni efekat emodin nije pokazao. Dodatno, FA ekstrakt je pokazao i značajnu sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije u TBA testu (EC₅₀ 120 µg/mL). Emodin je u ovom testu pokazao slabu sposobnost inhibicije ovog procesa, sa najvećim procentom inhibicije od 23,72% na koncentraciji od 75 µg/mL.
3. FA ekstrakt i emodin su u mikrodilucionom testu pokazali dobru antibakterijsku aktivnost na svim testiranim sojevama *S. aureus*. Najosetljiviji sojevi na delovanje FA ekstrakta bili su ATCC 43300, Gp19 i Gp29 sa MIK vrednošću od 62,5 µg/mL. Na delovanje emodina najosetljiviji su bili sojevi Gp29 i Gp7, kod kojih je MIK vrednost iznosila 3,125 µg/mL. MBK vrednosti nisu detektovane. Klinički izolati bili su osetljiviji od ATCC sojeva.
4. Metoda šahovske table je pokazala da samo emodin sa vankomicinom ispoljava sinergistički efekat na Gp41, a aditivni na Gp29 soju.
5. Efekat na formiranje biofilma je uočen za obe test supstance. FA ekstrakt je uspešno inhibirao formiranje biofilma sojeva ATCC 25923, ATCC 43300, Gp41, Gp29, a osetljiviji su bili referentni sojevi. Najveći procenat inhibicije zabeležen je kod ATCC 25923 na MIK koncentraciji i to 91%. Emodin je inhibirao proces formiranja biofilma kod svih sojeva, a najveći procenat inhibicije je bio kod soja Gp29 (73%) na MIK koncentraciji. Kombinovani efekat emodina i vankomicina na sojevima Gp41 i Gp29 bio je u nivou delovanja samog emodina.
6. Efekat na već formirane biofilme sojeva *S. aureus* bio je nešto manje izražen. FA ekstrakt je ispoljio efekat dezintegracije na sojevima ATCC 43300 i Gp41, dok je kod soja ATCC 25923 pojačao produkciju biofilma. Emodin je doveo do destrukcije biofilma sojeva ATCC 43300, Gp41, Gp29 i Gp7, pri čemu je najveći procenat bio zabeležen kod soja ATCC 43300 (31%, koncentracija 2MIK). Kombinovani tretman emodina i vankomicina je kod soja Gp29 bio nešto uspešniji od tretmana emodinom.
7. FA ekstrakt je uspešno inhibirao produkciju ekstracelularnih polisaharida rastvornih u vodi kod oba ATCC soja i Gp19 izolata, sa najvećim procentom inhibicije kod ATCC 43300 (76%). Emodin je uspešno inhibirao produkciju kod oba ATCC soja, Gp19 i Gp29. Najveći procenat inhibicije je ostvaren kod soja Gp19 (79,9%). Nije bilo značajnih promena u produkciji polisaharida nerastvornih u vodi, sa izuzetkom efekta FA ekstrakta na soju ATCC 43300 (43% inhibicije).
8. Koncentracija eDNK je redukovana kod sojeva ATCC 43300 i Gp19 u tretmanu sa obe supstance, i dodatno u soju Gp7 tretiranom FA ekstraktom.
9. Obe test supstance dovodile su do blagog smanjenja broja ćelija perzistera u formiranim biofilmovima svih testiranih sojeva, osim Gp7.
10. FA ekstrakt i emodin nisu pokazali značajan efekat na inhibiciju produkcije pigmenta stafiloksantina, pri čemu su maksimalne inhibicije dobijene na soju ATCC 43300 i iznosile su 11,3% (FA ekstrakt) i 19,9% (emodin).

11. SEM mikroskopija je pokazala da FA ekstrakt dovodi do morfoloških promena kod već formiranih biofilmova svih sojeva, kao i da utiče na formiranje ćelijskih agregata kod sojeva Gp19 i Gp29. Kod soja ATCC 43300 uočena je i blaga destrukcija biofilma.
12. AFM 3D topografije su pokazale da obe test supstance izazivaju izuzetno uočljive morfološke i strukturne promene u arhitekturi, organizaciji matriksa i hrapavosti biofilmova. Značajna destrukcija biofilma primećena je kod soja Gp41 u tretmanu emodinom.
13. Analiza aerobne respiracije je pokazala da je u slučaju planktonske forme ona bila značajno redukovana kod sojeva ATCC 25923, Gp41, Gp29 primenom obe test supstance, i dodatno u soju Gp7 primenom FA ekstrakta. U slučaju kombinovanog efekta sa vankomicinom, pojačavanje efekta je uočeno kod tretmana soja Gp41 emodinom. U slučaju praćenja respiracije u već formiranim biofilmovima uočeno je da je FA ekstrakt modulirao potrošnju O₂ i produkciju CO₂ (smanjenje respiracije) kod sojeva Gp41, Gp19 i Gp7, dok je emodin samo smanjio produkciju CO₂ kod sojeva ATCC 43300 i Gp41. Nasuprot ovim rezultatima, kod soja ATCC 25923 emodin je doveo do intenzivnije respiracije.
14. PCR metodom potvrđeno je prisustvo odabranih gena kod svih sojeva *S. aureus*. Obe test supstance pokazale su modulatorni efekat na ekspresiju *icaA*, *icaD*, *srrA* i *srrB* gena kod svih sojeva, pri čemu je ostvareni uticaj bio specifičan za soj. Dodatno, značajan *species*-specifičan efekat je bio primećen i u slučaju ekspresije RNA III kod oba ATCC soja, Gp41 i Gp29.
15. Generalno posmatrano, efekat FA ekstrakta i emodina na biofilm je pokazao dualno i *species* specifično dejstvo koje je zavisilo u velikoj meri od primenjene doze. Iako su za pojedine parametre biofilma dobijeni negativni rezultati, može se istaći da su ovo dobri antibiofilm agensi, koji deluju na različitim ciljnim mestima. Shodno tome, neophodno je pažljivo izabrati efektivne doze, u kojima bi antibiofilm svojstva bila najoptimalnije iskorišćena, tj. koje bi minimalizovale negativne efekte (pre svega indukciju odbrambenih mehanizama bakterija) i favorizovale inhibitorno dejstvo na biofilm.
16. FA ekstrakt i emodin su u MTT testu pokazali značajan efekat na metaboličku aktivnost ćelija hepatokarcinoma (HepG2) i kancera kolona (HCT 116), dok na ćelijskoj liniji normalnih fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) nije bilo efekta.
17. Praćenje ćelijskog ciklusa je pokazalo da su kod sve tri ćelijske linije test supstance dovodile do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u S fazi, blagog nagomilavanja ćelija u G2/M fazi, kao i do značajnog porasta broja ćelija u subG1 fazi na većim koncentracijama.
18. Analiza tipa ćelijske smrti pokazuje da obe test supstance na svim koncentracijama, u dozno-zavisnom maniru dovode do povećanja broja ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi, kao i da se blago povećava broj ćelija u nekrozi kod kancerskih ćelijskih linija. Kod normalne ćelijske linije ovaj efekat je primećen na dve najviše koncentracije (25 µg/mL i 50 µg/mL). Efekat emodina je bio izraženiji, a HCT116 ćelijska linija pokazala se osetljivijom.
19. Kvantifikacijom mitohondrijskog membranskog potencijala primećeno je da obe test supstance, kod sve tri ćelijske linije, u dozno-zavisnom maniru dovode do njegovog remećenja. Efekat emodina je takođe bio izraženiji, posebno na koncentracijama 25 µg/mL i 50 µg/mL.
20. Rezultati komet testa su pokazali da obe test supstance ispoljavaju genotoksični efekat na svim ćelijskim linijama i da se efekat povećava sa porastom koncentracija.
21. Sumirajući rezultate dobijene ispitivanjem efekata na humanim ćelijskim linijama, može se istaći da FA ekstrakt i emodin poseduju dobar citotoksični potencijal, koji bi mogao biti iskorišćen u daljim ispitivanjima antikancerske aktivnosti, ali neophodan je pažljiv odabir efektivnih koncentracija, kojim bi se minimizovao štetan efekat na normalnim ćelijama.
22. Prema dobijenim rezultatima u disertaciji, može se zaključiti da FA ekstrakt i emodin imaju dobru antibakterijsku aktivnost, ali još važnije da imaju izuzetnu antibiofilm aktivnost sagledanu i ispitivanu na više nivoa. Takođe, postoji i dobra citotoksična aktivnost koja se ogleda kroz efekat na ćelijski ciklus, apoptozu i remećenje mitohondrijskog membranskog potencijala, kao i dobru genotoksičnu aktivnost. Na osnovu toga, može se reći da su FA

ekstrakt i emodin dobri kandidati za nove antibiofilm agense prirodnog porekla, ali i za agense koji bi imali potencijalnu primenu u terapiji kancera. Ipak, dodatna ispitivanja su neophodna, posebno kada je u pitanju citotoksična aktivnost i bezbednost primene ovih supstanci.

7. Literatura

Abutaha, N., AL-Mekhlafi, F. A., Almutairi, B. O., Wadaan, M. A. 2022. S-phase cell cycle arrest, and apoptotic potential of *Echium arabicum* phenolic fraction in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J. King Saud Univ. Sci.*, 34(1), 101735.

Abushaheen, M. A., Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D.D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A.A., Shaik, J., Jhugroo, P. 2020. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.

Aguilera, A., Gómez-González, B. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.*, 9(3), 204-217.

Alam, M. M., Islam, M., Wahab, A., Billah, M. 2019. Antimicrobial resistance crisis and combating approaches. *J. Med.*, 20(1), 38-45.

Alimova, S., Baishanbo, A., Yessimsiitova, Z., Ablaihanova, N., Ydyrys, A. 2017. A brief overview on medicinal plant *Frangula alnus*. *XABAPIIII*, 4.

Al-Shabib, N. A., Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., Khan, R. A., Khan, J. M. 2017. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Cont.*, 79, 325-332

Ammar, R. B., Sghaier, M. B., Boubaker, J., Bhourri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhleb, I., Kilani, S., Ghediraa, K., Chekir-Ghedira, L. 2008. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chem. Biol*, 174(1), 1-10.

Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., Lakhssassi, N. 2019. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, 9(11), 258.

Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., Costerton, J. W. 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33(26), 5967-5982.

Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaioli, S., Montanaro, L. 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 5, 7.

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., Shirtliff, M. E. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445-459.

Atkin, K. E., MacDonald, S. J., Brentnall, A. S., Potts, J. R., Thomas, G. H. 2014. A different path: revealing the function of staphylococcal proteins in biofilm formation. *FEBS letters*, 588(10), 1869-1872.

Azadkhah, R., Farahani, M. S. 2016., The Effects of *Frangula alnus* miller on HEK Cells in Cell culture. Proceedings of 2016 International Conference on Biological and Environmental Science, ISBN 978-93-84422-68-4.

- Bakkiyaraj, D., Nandhini, J. R., Malathy, B., Pandian, S. K. 2013. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling*, 29(8), 929-937.
- Bazargani, M. M., Rohloff, J. 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food cont*, 61, 156-164.
- Bayles, K. W. 2007. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*, 5(9), 721-726.
- Bayles, K.W., Horswill, A.R., Kaplan, J. B. 2016. Effects of low-dose amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60(5), 2639-2651.
- Bhaskar, P. V., Bhosle, N. B. 2005. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Curr. Sci.*, 45-53.
- Bigger, J. W. 1944. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Ir. J. Med. Sci.* (1926-1967), 19(11), 553-568.
- Bojer, M. S., Lindemose, S., Vestergaard, M., Ingmer, H. 2018. Quorum sensing-regulated phenol-soluble modulins limit persister cell populations in *Staphylococcus aureus*. *Front microbiol*, 9, 255.
- Boncler, M., Golanski, J., Lukasiak, M., Redzynia, M., Dastyh, J., Watala, C. 2017. A new approach for the assessment of the toxicity of polyphenol-rich compounds with the use of high content screening analysis. *PloS one*, 12(6), e0180022.
- Brackman, G., Breyne, K., De Rycke, R., Vermote, A., Van Nieuwerburgh, F., Meyer, E., Van Chalemergh, C., Coenye, T. 2016. The quorum sensing inhibitor hamamelitannin increases antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms by affecting peptidoglycan biosynthesis and eDNA release. *Sci. Rep.*, 6(1), 1-14.
- Brkanac, S. R., Gerić, M., Gajski, G., Vujčić, V., Garaj-Vrhovac, V., Kremer, D., Domijan, A. M. 2015. Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 73(3), 923-929.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*, 28(1), 25-30.
- Bronesky, D., Wu, Z., Marzi, S., Walter, P., Geissmann, T., Moreau, K., Vandenesch, F., Caldelari, I., Romby, P. 2016. *Staphylococcus aureus* RNAIII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression. *Annu. Rev. Microbiol.*, 70, 299-316.
- Budzyńska, A., Wickowska-Szakiel, M., Sadowska, B., Kalemba, D., Rozalska, B. 2011. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol.J. Microbiol.*, 60(1), 35.
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. 2017. Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food microbiol*, 65, 294-301.

- Calabrese, E. J., Baldwin, L. A. 2001. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends Pharmacol Sci*, 22(6), 285-291.
- Campbell, J. K., Canene-Adams, K., Lindshield, B. L., Boileau, T. W. M., Clinton, S. K., Erdman Jr, J. W. 2004. Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. *J. Nutr.*, 134(12), 3486S-3492S.
- Campbell, M., Zhao, W., Fathi, R., Mihreteab, M., Gilbert, E. S. 2019. *Rhamnus prinoides* (gesho): A source of diverse anti-biofilm activity. *J. Ethnopharmacol.*, 241, 111955.
- Campbell, M., Cho, C. Y., Ho, A., Huang, J. Y., Martin, B., Gilbert, E. S. 2020. 4-Ethoxybenzoic acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and potentiates biofilm sensitivity to vancomycin. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 56(3), 106086.
- Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C. R. 2021. Extracellular DNA (eDNA). A Major Ubiquitous Element of the Bacterial Biofilm Architecture. *Int. J. Mol. Sci.* 22(16), 9100.
- Cao, F., Peng, W., Li, X., Liu, M., Li, B., Qin, R., Jiang, W., Cen, Y., Pan, X., Yan, Z., Xiao, K., Zhou, H. 2015. Emodin is identified as the active component of ether extracts from *Rhizoma Polygoni Cuspidati*, for anti-MRSA activity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93(6), 485-493.
- Cha, S. M., Jang, E. J., Choi, S. M., Cha, J. D. 2017. Combination of emodin with antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Int. J. Eng. Res*, 3(3), 2395-6992
- Chalothorn, T., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Pannara, S., Tansakul, C. 2019. Synthesis and antibacterial activity of emodin and its derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Tetrahedron Lett.*, 60(35), 151004.
- Chambers, H. F., DeLeo, F. R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7(9), 629-641.
- Chang, J., Lee, R. E., Lee, W. 2020. A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: A role of persister cells. *Arch. Pharm. Res.*, 1-9.
- Charyulu, E. M., Sekaran, G., Rajakumar, G. S., Gnanamani, A. 2009. Antimicrobial activity of secondary metabolite from marine isolate, *Pseudomonas* sp. against Gram positive and negative bacteria including MRSA., NISCAIR Online Periodicals Repository
- Chatterjee, S., Biswas, N., Datta, A., Dey, R., Maiti, P. 2014. Atomic force microscopy in biofilm study. *Microscopy*, 63(4), 269-278.
- Chua, S. L., Liu, Y., Yam, J. K. H., Chen, Y., Vejborg, R. M., Tan, B. G. C., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Yang, L. 2014. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nat. Commun.*, 5(1), 1-12.
- Cirillo, C., Capasso, R. 2015. Constipation and botanical medicines: an overview. *Phytother Res*, 29(10), 1488-1493.
- Coenye, T., Honraet, K., Rigole, P., Jimenez, P. N., Nelis, H. J. 2007. In vitro inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on hydroxyapatite by subinhibitory concentrations of anthraquinones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(4), 1541-1544.

- Conlon, K. M., Humphreys, H., O'Gara, J. P. 2002. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.*, 184(16), 4400-4408.
- Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J.N., Cheung, A.L., Lewis, K. 2016. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat microbiol*, 1(5), 1-7.
- Costa, S. S., Junqueira, E., Palma, C., Viveiros, M., Melo-Cristino, J., Amaral, L., Couto, I. 2013. Resistance to antimicrobials mediated by efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 2(1), 83-99.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., Marrie, T. J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41(1), 435-464.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49(1), 711-745.
- Cowan, T. 2011. Biofilms and their management: from concept to clinical reality. *J wound care*, 20(5), 220-226.
- Crabbé, A., Jensen, P. Ø., Bjarnsholt, T., Coenye, T. 2019. Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms. *Trends microbiol*, 27(10), 850-863.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.*, 1830(6), 3670-3695.
- Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J., Townsend, S. D. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*, 10(8), 1231-1241.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Götz, F. 2001. In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. *Meth. Enzymol.*, 336, 239-255.
- Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J. R. 2004. Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 72(4), 2177-2185.
- Cushnie, T. T., Lamb, A. J. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob*, 38(2), 99-107.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28(3), 261-289.
- Davey, M. E., O'toole, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(4), 847-867.
- de Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z. 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, 44(5), 636-641.
- Defraigne, V., Fauvart, M., Michiels, J. 2018. Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist. Updat.*, 38, 12-26.

- Di Martino, P. 2018. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS microbiology*, 4(2), 274.
- Ding, X., Yin, B., Qian, L., Zeng, Z., Yang, Z., Li, H., Lu, Y., Zhou, S. 2011. Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J. Med. Microbiol.*, 60(12), 1827-1834.
- Ding, W. Y., Li, Y. H., Lian, H., Ai, X. Y., Zhao, Y. L., Yang, Y. B., Han, Q., Liu, X., Chen, X.Y., He, Z. 2017. Sub-minimum inhibitory concentrations of rhubarb water extracts inhibit *Streptococcus suis* biofilm formation. *Front pharmacol*, 8, 425.
- Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., Huyiligeqi, Ni, J. 2016. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Phytother Res*, 30(8), 1207-1218.
- Dong, D., Zielke, H. R., Yeh, D., Yang, P. 2018. Cellular stress and apoptosis contribute to the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Autism Res.*, 11(7), 1076-1090.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(9), 881.
- Doroshenko, N., Tseng, B. S., Howlin, R. P., Deacon, J., Wharton, J. A., Thurner, P. J., Gilmore, B.F., Parsek, M.R., Stoodley, P. 2014. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58(12), 7273-7282.
- Duan, F., Xin, G., Niu, H., Huang, W. 2017. Chlorinated emodin as a natural antibacterial agent against drug-resistant bacteria through dual influence on bacterial cell membranes and DNA. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Dumontet C. 2011. Antitubulin agents. *Bull Cancer.*; 98(11):1275-85.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. V., Vandenabeele, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.*, 11(13), 1050-1062.
- Dwyer, D. J., Belenky, P. A., Yang, J. H., MacDonald, I. C., Martell, J. D., Takahashi, N., Chan, C.T.Y., Lobritz, M.A., Braff, D., Schwarz, E.G., Ye, J.D., Pati, M., Vercruyse, M., Ralifo, P.S., Allison, K.R., Khalil, A.S., Ting, A.Y., Walker, G.C., Collins, J. J. 2014. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), E2100-E2109.
- Đukanović, S., Cvetković, S., Lončarević, B., Lješević, M., Nikolić, B., Simin, N., Bekvalac, K., Kekić, D., Mitić-Ćulafić, D. 2020. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of *Frangula alnus* bark ethyl-acetate extract. *Ind Crops Prod*, 158, 113013.
- Đukanović, S., Ganić, T., Lončarević, B., Cvetković, S., Nikolić, B., Tenji, D., Randjelović, D., Mitić-Ćulafić, D. 2021. Elucidating the antibiofilm activity of *Frangula* emodin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Appl. Microbiol.*
- Edwards, A. M., Massey, R. C. 2011. How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream?. *Trends Microbiol.*, 19(4), 184-190.

- Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Al-Mana, F. A., El-Shafei, A. A. 2020. Polyphenols of *Frangula alnus* and *Peganum harmala* leaves and associated biological activities. *Plants*, 9(9), 1086.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4), 495-516.
- European Medicines Agency (EMA), 2018. Assessment report on *Rhamnus frangula* L. cortex. EMA/HMPC/483550/2018
- Farha, M. A., Brown, E. D. 2015. Unconventional screening approaches for antibiotic discovery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1354(1), 54-66.
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., Iranshahy, M. 2019. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytother Res*, 33(1), 13-40.
- Finkel, S. E., Kolter, R. 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J. Bacteriol.*, 183(21), 6288-6293.
- Fisher, R. A., Gollan, B., Helaine, S. 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.*, 15(8), 453-464.
- Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14(9), 563-575.
- Fong, J. N., Yildiz, F. H. 2015. Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.*, 3(2), 3-2.
- Fouad, Y. A., Aanei, C. 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.*, 7(5), 1016.
- Francolini, I., Donelli, G. 2010. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Microbiol. Immunol.*, 59(3), 227-238.
- Frees, D., Gerth, U., Ingmer, H. 2014. Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304(2), 142-149.
- Gardete, S., Tomasz, A. 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Investig.*, 124(7), 2836-2840.
- Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., Sbhatu, D. B. 2019. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon*, 5(8), e02192.
- Ghosh, C., Manjunath, G. B., Konai, M. M., Uppu, D. S., Hoque, J., Paramanandham, K., Shome, B.R., Haldar, J. 2015. Aryl-alkyl-lysines: agents that kill planktonic cells, persister cells, biofilms of MRSA and protect mice from skin-infection. *PLoS One*, 10(12), e0144094.
- Gibbons, S., Moser, E., Kaatz, G. W. 2004. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. *Planta medica*, 70(12), 1240-1242.
- Gloag, E. S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L. M., Hunt, M.L.C., Lu, J., Osvath, S.R., Monahan, L.G., Cavaliere, R., Charles, I.G., Wand, M.P., Gee, L.M., Prabhakar, R.,

- Whitchurch, C. B. 2013. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), 11541-11546.
- Goerke, C., Wolz, C. 2010. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.*, 300(8), 520-525.
- Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrinš, M., Hallaert, T., Hauryliuk, V., Garcia-Pino, A., Sjödin, A., Kasvandik, S., Udekwu, K., Tenson, T., Kaldalu, N., Van Melderen, L. 2018. Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells. *MBio*, 9(3), e00640-18.
- Grdinić, V., Kremer, D. 2009. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Hrvatska ljekarnička komora, Zagreb.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y. 2020. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 10, 107.
- Haaber, J., Cohn, M. T., Frees, D., Andersen, T. J., Ingmer, H. 2012. Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics. *PloS one*, 7(7), e41075.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov.*, 8(12), 536-544.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(2), 95-108.
- Hemmi, H., Akira, S. 2002. A novel Toll-Like receptor that recognizes bacterial DNA. In *Microbial DNA and Host Immunity* (pp. 39-47). *Humana Press*, Totowa, NJ.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Holler, J. G., Søndergaard, K., Slotved, H. C., Gúzman, A., Mølgaard, P. 2012. Evaluation of the antibacterial activity of Chilean plants traditionally used for wound healing therapy against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta medica*, 78(02), 200-205.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S. 2014. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792.
- Huang, P. H., Huang, C. Y., Chen, M. C., Lee, Y. T., Yue, C. H., Wang, H. Y., Lin, H. 2013. Emodin and aloe-emodin suppress breast cancer cell proliferation through ER α inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013.
- Hsiang, C. Y., Ho, T. Y. 2008. Emodin is a novel alkaline nuclease inhibitor that suppresses *Herpes simplex* virus type 1 yields in cell cultures. *Br. J. Pharmacol.*, 155(2), 227-235.
- Hsu, C. M., Hsu, Y. A., Tsai, Y., Shieh, F. K., Huang, S. H., Wan, L., Tsai, F. J. 2010. Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392(4), 473-478.

- Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., Rahman, A. 2021. *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *Int J Environ Res Public Health*, 18(14), 7602
- Islam, B., Khan, S. N., Haque, I., Alam, M., Mushfiq, M., Khan, A. U. 2008. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 62(4), 751-757
- Ismail, S., Shahid, F., Khan, A., Bhatti, S., Ahmad, S., Naz, A., Almatroudi, A., ul Qamar, M. T. 2021. Pan-vaccinomics approach towards a universal vaccine candidate against WHO priority pathogens to address growing global antibiotic resistance. *Comput. Biol. Med.*, 136, 104705.
- Iavicoli, I., Fontana, L., Agathokleous, E., Santocono, C., Russo, F., Vetrani, I., Fedele, M., Calabrese, E. J. 2021. Hormetic dose responses induced by antibiotics in bacteria: A phantom menace to be thoroughly evaluated to address the environmental risk and tackle the antibiotic resistance phenomenon. *Sci Total Environ*, 798, 149255.
- Izhaki, I. 2002. Emodin—a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155(2), 205-217.
- Jain, C., Khatana, S., Vijayvergia, R. 2019. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *Int. J. Pharm. Sci.*, 10(2), 494-498.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. 2018. Medicinal plants: Past history and future perspective. *J. HerbMed Pharmacol.*, 7(1).
- Jan, R. 2019. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv. Pharm. Bull.*, 9(2), 205.
- Ji, X., Liu, X., Peng, Y., Zhan, R., Xu, H., Ge, X. 2017. Comparative analysis of methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* exposed to emodin based on proteomic profiling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 494(1-2), 318-324.
- Jodynis-Liebert, J., Kujawska, M. 2020. Biphasic dose-response induced by phytochemicals: experimental evidence. *J. Clin. Med.*, 9(3), 718.
- Jones, E. A., McGillivray, G., Bakaletz, L. O. 2013. Extracellular DNA within a nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. *J. Innate Immun.*, 5(1), 24-38.
- Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B. 2016. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin Microbiol Rev*, 29(2), 401-427.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D. H. 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *J. Bacteriol.*, 185(16), 4693-4698.
- Kaplan, J. Á. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.*, 89(3), 205-218.
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., Thurnheer, T. 2020. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol*, 28(8), 668-681.

- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kim, K. H., Sederstrom, J. M. 2015. Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Curr Protoc Mol Biol*, 111(1), 28-6.
- Kinkel, T. L., Roux, C. M., Dunman, P. M., Fang, F. C. 2013. The *Staphylococcus aureus* SrrAB two-component system promotes resistance to nitrosative stress and hypoxia. *MBio*, 4(6), e00696-13.
- Kirmusaoğlu, S. 2016. Staphylococcal biofilms: Pathogenicity, mechanism and regulation of biofilm formation by quorum sensing system and antibiotic resistance mechanisms of biofilm embedded microorganisms. *Microbial Biofilms—Importance and Applications*. Croatia: InTech, 189-209.
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., Bazzaz, B. S. F. 2019. Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control*, 8(1), 1-28.
- Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., Alarcon, E. I. 2018. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4(12), e01067.
- Koo, H., Hayacibara, M. F., Schobel, B. D., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Park, Y. K., Vacca-Smith, A.M., Bowen, W. H. 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52(5), 782-789.
- Kolarević, S., Milovanović, D., Avdović, M., Oalde, M., Kostić, J., Sunjog, K., Nikolić, B., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., 2016. Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Bot Serb*, 40, 29-36.
- Kosalec, I., Kremer, D., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Randić, M., Končić, M. Z. 2013. Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food chem*, 136(2), 335-341.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. J. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 3(4), a010306.
- Kot, B., Sytykiewicz, H., Sprawka, I. 2018. Expression of the biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm and planktonic conditions. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(11), 3487.
- Kremer, D., Kosalec, I., Locatelli, M., Epifano, F., Genovese, S., Carlucci, G., Končić, M. Z. 2012. Anthraquinone profiles, antioxidant and antimicrobial properties of *Frangula rupestris* (Scop.) Schur and *Frangula alnus* Mill. bark. *Food Chem.*, 131(4), 1174-1180.
- Lansiaux A., 2011. Antimetabolites. *Bull Cancer.*; 98(11):1263-74.
- Lansiaux A. i Pourquier P. 2011. Molecular determinants of response to topoisomerase II

inhibitors. *Bull Cancer.*; 98(11):1299-1310.

Lázaro-Díez, M., Remuzgo-Martínez, S., Rodríguez-Mirones, C., Acosta, F., Icardo, J. M., Martínez-Martínez, L., Ramos-Vivas, J. 2016. Effects of subinhibitory concentrations of ceftaroline on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms. *PLoS One*, 11(1), e0147569.

Lee, Y. S., Kang, O. H., Choi, J. G., Oh, Y. C., Keum, J. H., Kim, S. B., Jeong, G.S., Kim, Y.C., Shin, D.W., Kwon, D. Y. 2010. Synergistic effect of emodin in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharm. Biol.*, 48(11), 1285-1290.

Lee, J. H., Park, J. H., Cho, M. H., Lee, J. 2012. Flavone reduces the production of virulence factors, staphyloxanthin and α -hemolysin, in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.*, 65(6), 726-732

Lee, J. H., Park, J. H., Cho, H. S., Joo, S. W., Cho, M. H., Lee, J. 2013. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 29(5), 491-499.

Lee, J. H., Kim, Y. G., Ryu, S. Y., Lee, J. 2016. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.*, 6(1), 1-11.

Lee, K. H., Lee, M. S., Cha, E. Y., Sul, J. Y., Lee, J. S., Kim, J. S., Park, J.B., Kim, J. Y. 2017. Inhibitory effect of emodin on fatty acid synthase, colon cancer proliferation and apoptosis. *Mol. Med. Rep.*, 15(4), 2163-2173.

Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., Nicotera, P. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*, 185(8), 1481-1486.

Leejae, S., Hasap, L., Voravuthikunchai, S. P. 2013. Inhibition of staphyloxanthin biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by rhodomyrone, a novel antibiotic candidate. *J. Med. Microbiol.*, 62(3), 421-428.

Lewis, K. 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(3), 503-514.

Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4), 999-1007.

Lewis, K. 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Bacterial biofilms*, 107-131.

Li, Y., Luan, Y., Qi, X., Li, M., Gong, L., Xue, X., Wu, X., Wu, Y., Chen, M., Xing, G., Zao, J., Ren, J. 2010. Emodin triggers DNA double-strand breaks by stabilizing topoisomerase II-DNA cleavage complexes and by inhibiting ATP hydrolysis of topoisomerase II. *Toxicol. Sci.*, 118(2), 435-443.

Li, L., Song, X., Yin, Z., Jia, R., Li, Z., Zhou, X., Zou, Y., Li, L., Yin, L., Yue, G., Ye, G., Lv, C., Shi, W., Fu, Y. 2016. The antibacterial activity and action mechanism of emodin from *Polygonum cuspidatum* against *Haemophilus parasuis* in vitro. *Microbiol res*, 186, 139-145.

Li, Y., Jiang, J. G. 2018. Health functions and structure–activity relationships of natural anthraquinones from plants. *Food Funct*, 9(12), 6063-6080.

- Little, D. J., Li, G., Ing, C., DiFrancesco, B. R., Bamford, N. C., Robinson, H., Nitz, M., Pomes, R., Howell, P. L. 2014. Modification and periplasmic translocation of the biofilm exopolysaccharide poly- β -1, 6-N-acetyl-d-glucosamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(30), 11013-11018.
- Liu, Y., Tay, J. H. 2001. Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(2), 111-117.
- Liu, G. Y., Nizet, V. 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.*, 17(9), 406-413.
- Liu, J. X., Zhang, J. H., Li, H. H., Lai, F. J., Chen, K. J., Chen, H., Luo, J., Guo, H.C., Wang, Z.H., Lin, S. Z. 2012. Emodin induces Panc-1 cell apoptosis via declining the mitochondrial membrane potential. *Oncol. Rep.*, 28(6), 1991-1996.
- Liu, M., Peng, W., Qin, R., Yan, Z., Cen, Y., Zheng, X., Pan., X., Jiang, W., Li, B., Li, X., Zhou, H. 2015. The direct anti-MRSA effect of emodin via damaging cell membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(18), 7699-7709.
- Liu, M., Wu, X., Li, J., Liu, L., Zhang, R., Shao, D., Du, X. 2017. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the ica operon. *Food Cont.*, 73, 613-618.
- Liu, J., Li, W., Zhu, X., Zhao, H., Lu, Y., Zhang, C., Lu, Z. 2019. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103(11), 4565-4574.
- Lobritz, M. A., Belenky, P., Porter, C. B., Gutierrez, A., Yang, J. H., Schwarz, E. G., Dwweyer, D.J., Khalil, A.S., Collins, J. J. 2015. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), 8173-8180.
- Loeb, L. A. 2001. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 61(8), 3230-3239.
- Lombardi, V. R., Carrera, I., Cacabelos, R. 2017. In vitro screening for cytotoxic activity of herbal extracts. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017.
- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2(7), a000398.
- Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., Domingues, F. 2014. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, 30(1), 69-79.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., Laufs, R. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. bacterial.*, 178(1), 175-183.
- Maikranz, E., Spengler, C., Thewes, N., Thewes, A., Nolle, F., Jung, P., Bischoff, M., Santen, L., Jacobs, K. 2020. Different binding mechanisms of *Staphylococcus aureus* to hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Nanoscale*, 12(37), 19267-19275.

- Maleš, Ž., Kremer, D., Randić, Z., Randić, M., Pilepić, K., Bojić, M. 2010. Quantitative analysis of glucofrangulins and phenolic compounds in Croatian Rhamnus and Frangula species. *Acta Biol Crac Ser Bot.* 52/2: 108–113
- Malik, E. M., Müller, C. E. 2016. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Med. Res. Rev.*, 36(4), 705-748.
- Malik, M. S., Alsantali, R. I., Jassas, R. S., Alsimaree, A. A., Syed, R., Alsharif, M. A., Kalpana, K., Morad, M., Althagafi, I.I., Ahmed, S. A. 2021. Journey of anthraquinones as anticancer agents—a systematic review of recent literature. *RSC Advances*, 11(57), 35806-35827.
- Malmir, M., Serrano, R., Silva, O. 2017. Anthraquinones as potential antimicrobial agents-A review. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs.* Formatex, 55-61.
- Manandhar, S., Luitel, S., Dahal, R. K. 2019. In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. *J. Trop. Med.*, 2019
- Manivasagan, P., Kang, K. H., Sivakumar, K., Li-Chan, E. C., Oh, H. M., Kim, S. K. 2014. Marine actinobacteria: an important source of bioactive natural products. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 38(1), 172-188.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R., Bayles, K. W. 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PloS one*, 4(6), e5822.
- Manojlovic, N. T., Solujic, S., Sukdolak, S., Milosev, M. 2005. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia*, 76(2), 244-246.
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., Baradaran, B. 2017. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. *Adv. Pharm. Bull.*, 7(3), 339.
- Marincola, G., Wencker, F. D., Ziebuhr, W. 2019. The many facets of the small non-coding RNA RsaE (RoxS) in metabolic niche adaptation of Gram-positive bacteria. *J. Mol. Biol.*, 431(23), 4684-4698.
- Martínez, J. L., Baquero, F., Andersson, D. I. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5(12), 958-965.
- Mashruwala, A. A., Van De Guchte, A., Boyd, J. M. 2017. Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Elife*, 6, e23845.
- Matthews, H. K., Bertoli, C., de Bruin, R. A. 2022. Cell cycle control in cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23(1), 74-88.
- Medina, E., Pieper, D. H. 2016. Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. How to overcome the antibiotic crisis, 3-33.
- Milanov, D., Ašanin, R., Vidić, B., Petrović, J., Krnjajić, D. 2008. Biofilm—organizacija ivota bakterija u prirodnim ekosistemima. *Vet Arh*, 1, 5-15.
- Mina, E. G., Marques, C. N. 2016. Interaction of *Staphylococcus aureus* persister cells with the host when in a persister state and following awakening. *Sci. rep.*, 6(1), 1-10.

- Mishra, N. N., Liu, G. Y., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Proctor, R. A., McKinnell, J., Bayer, A. S. 2011. Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55(2), 526-531.
- Mishra, R., Panda, A. K., De Mandal, S., Shakeel, M., Bisht, S. S., Khan, J. 2020. Natural anti-biofilm agents: Strategies to control biofilm-forming pathogens. *Front Microbiol.*, 11, 2640.
- Mitić-Ćulafić, D., Žegura, B., Nikolić, B., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., Filipič, M. 2009. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem. Toxicol.*, 47(1), 260-266.
- Miyae, S., Suzuki, E., Komiyama, Y., Kondo, Y., Morikawa, M., Maeda, S. 2018. Bacterial memory of persisters: bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony–biofilm culture. *Front. microbiol*, 9, 1396.
- Mlynek, K. D., Callahan, M. T., Shimkevitch, A. V., Farmer, J. T., Endres, J. L., Marchand, M., Bayles, K.W., Horswill, A.R., Kaplan, J. B. 2016. Effects of low-dose amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60(5), 2639-2651.
- Molin, S., Tolker-Nielsen, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14(3), 255-261.
- Monisha, B. A., Kumar, N., Tiku, A. B. 2016. Emodin and its role in chronic diseases. *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*, 47-73.
- Morgan, D. J., Okeke, I. N., Laxminarayan, R., Perencevich, E. N., Weisenberg, S. 2011. Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases*, 11(9), 692-701.
- Morgan-Sagastume, F., Larsen, P., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. 2008. Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water res.*, 42(4-5), 843-854.
- Murakami, A. 2020. Hormesis-Mediated Mechanisms Underlying Bioactivities of Phytochemicals. *Curr. Pharmacol. Rep*, 1-10.
- Mueller, S. O., Schmitt, M., Dekant, W., Stopper, H., Schlatter, J., Schreier, P., Lutz, W. K. 1999. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. *Food chem toxicol*, 37(5), 481-491.
- Mulcahy, M. E., McLoughlin, R. M. 2016. Host–bacterial crosstalk determines *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Trends Microbiol.*, 24(11), 872-886.
- Nazir, R., Zaffar, M. R., Amin, I. 2019. Bacterial biofilms: the remarkable heterogeneous biological communities and nitrogen fixing microorganisms in lakes. *Freshw. Biol.*, 307-340.
- Neethirajan, S., DiCicco, M. 2014. Atomic force microscopy study of the antibacterial effect of fosfomycin on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Applied Nanoscience*, 4(6), 703-709.

- Nejabatdoust, A., Baghaei Daemi, H., Salehzadeh, A., Azimi, S. C., Darafkan, S., Fallah Digsara, F., Pourebrahim, M., Seighalani, R. 2020. Comparing of Effects of Hydro-alcoholic, Ethanolic, and Methanolic Extracts of the *Frangula alnus*: Chemical Composition, Antimicrobial, and Synergism. *J Genet Resour*, 6(1), 20-33.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79(3), 629-661.
- Nguyen, H. T., Nguyen, T. H., Otto, M. 2020. The staphylococcal exopolysaccharide PIA–Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 18, 3324-3334
- Ni, S., Li, B., Chen, F., Wei, H., Mao, F., Liu, Y., Xu, Y., Qiu, X., Li, X., Liu, W., Hu, L., Ling, D., Wang, M., Zheng, X., Zhu, J., Lan, Li, J. 2018. Novel staphyloxanthin inhibitors with improved potency against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *ACS Med. Chem. Lett.*, 9(3), 233-237.
- Niu, G., Li, W. 2019. Next-generation drug discovery to combat antimicrobial resistance. *Trends Biochem. Sci.*, 44(11), 961-972.
- Novick, R. P., Geisinger, E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.*, 42, 541-564.
- Nwodo, U. U., Green, E., Okoh, A. I. 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(11), 14002-14015.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54(1), 49-79.
- Okwu, M. U., Olley, M., Akpoka, A. O., Izevbuwa, O. E. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review. *AIMS microbiology*, 5(2), 117.
- Okshevsky, M., Regina, V. R., Meyer, R. L. 2015. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 33, 73-80.
- Omar, A., Wright, J. B., Schultz, G., Burrell, R., Nadworny, P. 2017. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*, 5(1), 9.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. 2014. Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chem.*, 143, 48-53.
- Orman, M. A., Brynildsen, M. P. 2015. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat commun*, 6(1), 1-13.
- Özenver, N., Saeed, M., Demirezer, L. Ö., Efferth, T. 2018. Aloe-emodin as drug candidate for cancer therapy. *Oncotarget*, 9(25), 17770.
- Pankey, G. A., Sabath, L. D. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*, 38(6), 864-870.

- Parasuraman, S. 2018. Herbal drug discovery: challenges and perspectives. *Curr Pharmacogenomics Person Med.*, 16(1), 63-68.
- Parastan, R., Kargar, M., Solhjoo, K., Kafilzadeh, F. 2020. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. *Gene Reports*, 20, 100739.
- Pasparakis, M., Vandenabeele, P. 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311-320.
- Penchovsky, R., Traykovska, M. 2015. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do?. *Expert Opin. Drug Discov*, 10(6), 631-650.
- Penesyan, A., Paulsen, I. T., Gillings, M. R., Kjelleberg, S., Manefield, M. J. 2020. Secondary effects of antibiotics on microbial biofilms. *Front microbiol*, 11, 2109.
- Pinto, H. B., Brust, F. R., Macedo, A. J., Trentin, D. S. 2020. The antivirulence compound myricetin possesses remarkable synergistic effect with antibacterials upon multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*, 149, 104571.
- Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C., Van Dijck, P. 2020. Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Front. microbiol*, 11, 952.
- Porporato, P. E., Filigheddu, N., Bravo-San Pedro, J. M., Kroemer, G., Galluzzi, L. 2018. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell res*, 28(3), 265-280.
- Proctor, R. A., Von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., Peters, G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*, 4(4), 295-305.
- Proctor, R. A., Kriegeskorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., Peters, G. 2014. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 4, 99.
- Proctor, R. 2019. Respiration and small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectr.*, 7(3), 7-3.
- Qian, W., Liu, M., Fu, Y., Zhang, J., Liu, W., Li, J., Li, X., Li, Y., Wang, T. 2020. Antimicrobial mechanism of luteolin against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and its antibiofilm properties. *Microb. Pathog.*, 142, 104056.
- Raafat, D., Otto, M., Reppschläger, K., Iqbal, J., Holtfreter, S. 2019. Fighting *Staphylococcus aureus* biofilms with monoclonal antibodies. *Trends Microbiol.*, 27(4), 303-322.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P.K. Pharmacology. Data status 2005
- Robles-Fernandez, I., Rodriguez-Serrano, F., Alvarez, P. J., Ortiz, R., Rama, A. R., Prados, J., Melguzio, C., Alvarez-Manzaneda, E., Aranega, A. 2013. Antitumor properties of natural compounds and related molecules. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 8(3), 203-215.
- Rodis, N., Tsapadikou, V. K., Potsios, C., Xaplanteri, P. 2020. Resistance Mechanisms in Bacterial Biofilm Formations: A Review. *J Emerg Intern Med*, 4(2), 30.

- Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G. 2016. Counting on natural products for drug design. *Nat. chem.*, 8(6), 531-541.
- Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., Scherpe, S., Davies, A.P., Harris, L.G., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K.M., Rangunath, C., Kaplan, J.B., Mack, D. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, 28(9), 1711-1720.
- Rolta, R., Kumar, V., Sourirajan, A., Upadhyay, N. K., Dev, K. 2020. Bioassay guided fractionation of rhizome extract of *Rheum emodi* wall as bio-availability enhancer of antibiotics against bacterial and fungal pathogens. *J. ethnopharmacol.*, 257, 112867.
- Rudra, P., Boyd, J. M. 2020. Metabolic control of virulence factor production in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 55, 81-87.
- Sacco, S. C., Velázquez, N. S., Renna, M. S., Beccaria, C., Baravalle, C., Pereyra, E. A., Monecke, S., Calvino, L.F., Dallard, B. E. 2020. Capacity of two *Staphylococcus aureus* strains with different adaptation genotypes to persist and induce damage in bovine mammary epithelial cells and to activate macrophages. *Microb. Pathog.*, 142, 104017.
- Sadowska, B., Paszkiewicz, M., Podsędek, A., Redzyna, M., Różalska, B. 2014. *Vaccinium myrtillus* leaves and *Frangula alnus* bark derived extracts as potential antistaphylococcal agents. *Acta Biochim. Pol.*, 61(1)
- Sajc, L., Kovačević, N., Grubišić, D., Vunjak-Novaković, G. 1999. *Frangula* species: in vitro culture and the production of anthraquinones. In *Medicinal and Aromatic Plants XI* (pp. 157-176). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sakai, K., Koyama, N., Fukuda, T., Mori, Y., Onaka, H., Tomoda, H. 2012. Search method for inhibitors of staphyloxanthin production by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.*, 35(1), 48-53.
- Salam, A. M., Quave, C. L. 2018. Opportunities for plant natural products in infection control. *Curr. Opin. Microbiol.*, 45, 189-194.
- Salopek, M., Sušan, I., Bival Štefan, M., & Jablan, J. 2016. *Krkavina (Frangula alnus Mili.)*-botanički podaci, fitokemijski sastav i biološki učinci. *Farmaceutski glasnik*, 72(10), 651-670.
- Sato, A., Yamaguchi, T., Hamada, M., Ono, D., Sonoda, S., Oshiro, T., Nagashima, M., Kato, K., Okazumi, S., Katoh, R., Ishii, Y., Tateda, K. 2019. Morphological and biological characteristics of *Staphylococcus aureus* biofilm formed in the presence of plasma. *Microb. Drug Resist.*, 25(5), 668-676.
- Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., Raut, S. 2016. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 7, 56-66.
- Saunders, I. T., Mir, H., Kapur, N., Singh, S. 2019. Emodin inhibits colon cancer by altering BCL-2 family proteins and cell survival pathways. *Cancer Cell Int*, 19(1), 1-15.
- Schilcher, K., Horswill, A. R. 2020. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 84(3), e00026-19.

- Schwartz, K., Ganesan, M., Payne, D. E., Solomon, M. J., Boles, B. R. 2016. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Mol. Microbiol.*, 99(1), 123-134.
- Selvaraj, A., Jayasree, T., Valliammai, A., Pandian, S. K. 2019. Myrtenol attenuates MRSA biofilm and virulence by suppressing sarA expression dynamism. *Front microbiol*, 10, 2027.
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., Viljoen, A. 2021. Emodin-A natural anthraquinone derivative with diverse pharmacological activities. *Phytochem*, 190, 112854.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., Grossart, H. P. 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. microbiol.*, 4, 47.
- Serra, D. O., Hengge, R. 2019. A c-di-GMP-based switch controls local heterogeneity of extracellular matrix synthesis which is crucial for integrity and morphogenesis of *Escherichia coli* macrocolony biofilms. *J. Mol. Biol.*, 431(23), 4775-4793.
- Sharma, R., Tikku, A. B. 2014. Emodin, an anthraquinone derivative, protects against gamma radiation-induced toxicity by inhibiting DNA damage and oxidative stress. *Int. J. Radiat. Biol.* 90(4), 275-283.
- Sharma, A., Kaur, M., Katnoria, J. K., Nagpal, A. K. 2018. Polyphenols in food: Cancer prevention and apoptosis induction. *Curr. Med. Chem.*, 25(36), 4740-4757.
- Sheffield, C., Crippen, T. 2012. Invasion and survival of *Salmonella* in the environment: The role of biofilm. *Salmonella-A Diversified Superbug*, 1, 3-28.
- Shieh, D. E., Chen, Y. Y., Yen, M. H., Chiang, L. C., Lin, C. C. 2004. Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. *Life sciences*, 74(18), 2279-2290.
- Shi, L., Wu, Y., Yang, C., Ma, Y., Zhang, Q. Z., Huang, W., Zhu, X.Y., Yan, Y.J., Wang, J.X., Zhu, T., Qu, D., Zheng, C.Q., Zhao, K. Q. 2019. Effect of nicotine on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence factors. *Sci. rep.*, 9(1), 1-13.
- Shin, S. Y., Yoon, H., Ahn, S., Kim, D. W., Bae, D. H., Koh, D., Lee, Y.H., Lim, Y. 2013. Structural properties of polyphenols causing cell cycle arrest at G1 phase in HCT116 human colorectal cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(8), 16970-16985.
- Shokoohian, B., Ahmadi, R., Molseghi, M., Mahdavi, E. Effects of Rhamnus frangula Extract on MCF7 Cells in Cell Culture. International Conference of Social Science, Medicine and Nursing (SSMN-2015).
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., Singh, R. 2017. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol. J.*, 11, 53.
- Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., Mučaji, P. 2016. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1717.
- Smirnova, T. A., Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R., Romanova, Y. M. 2010. Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Microbiology*, 79(4), 413-423.

- Somerville, G. A., Proctor, R. A. 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(2), 233-248.
- Song, J. M., Park, K. D., Lee, K. H., Byun, Y. H., Park, J. H., Kim, S. H., Kim, J.H., Seong, B. L. 2007. Biological evaluation of anti-influenza viral activity of semi-synthetic catechin derivatives. *Antiviral Res.*, 76(2), 178-185.
- Song, S., Wood, T. K. 2020. Combatting persister cells with substituted indoles. *Front Microbiol*, 11.
- Srinivas, G., Babykutty, S., Sathiadevan, P. P., Srinivas, P. 2007. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med. Res. Rev.*, 27(5), 591-608.
- Srivastava, S., Bhargava, A. 2016. Biofilms and human health. *Biotechnol. Lett*, 38(1), 1-22.
- Stachelek, M., Zalewska, M., Kawecka-Grochocka, E., Sakowski, T., Bagnicka, E. 2021. Overcoming bacterial resistance to antibiotics: the urgent need—a review. *Ann. Anim. Sci.*, 21(1), 63-87.
- Stapleton, P. D., Taylor, P. W. 2002. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science progress*, 85(1), 57-72.
- Stark, G. R., Taylor, W. R. 2004. Analyzing the G2/M checkpoint. *Checkpoint Controls and Cancer*, 51-82.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, 40(2), 175-179.
- Stewart, P. S. 2003. Diffusion in biofilms. *J. bacterial.*, 185(5), 1485-1491.
- Suboj, P., Babykutty, S., Gopi, D. R. V., Nair, R. S., Srinivas, P., Gopala, S. 2012. Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF-κB. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45(5), 581-591.
- Suresh, M. K., Biswas, R., Biswas, L. 2019. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.*, 309(1), 1-12.
- Sutherland, I. W. 2001. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9(5), 222-227.
- Svenningsen, M. S., Veress, A., Harms, A., Mitarai, N., Semsey, S. 2019. Birth and resuscitation of (p) ppGpp induced antibiotic tolerant persister cells. *Sci. rep.*, 9(1), 1-13
- Sydiskis, R. J., Owen, D. G., Lohr, J. L., Rosler, K. H., Blomster, R. N. 1991. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35(12), 2463-2466.
- Šantić, Ž., Pravdić, N., Bevanda, M., Galić, K. 2017. The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. *Psychiatr. Danub.*, 29(Suppl 4), 787-792.

- Takó, M., Kerekes, E. B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., Vágvölgyi, C. 2020. Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. *Antioxidants*, 9(2), 165.
- Tayeb-Fligelman, E., Tabachnikov, O., Moshe, A., Goldshmidt-Tran, O., Sawaya, M. R., Coquelle, N., Colletier, J.F., Landau, M. 2017. The cytotoxic *Staphylococcus aureus* PSM α 3 reveals a cross- α amyloid-like fibril. *Science*, 355(6327), 831-833.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 9(3), 231-241.
- Țebrencu, C. E., Crețu, R. M., Mitroi, G. R., Iacob, E., Ionescu, E. 2015. Phytochemical evaluation and HPTLC investigation of bark and extracts of *Rhamnus Frangula* Linn. *Phytochem Rev*, 14(4), 613-621.
- Tenji, D., Micic, B., Sipos, S., Miljanovic, B., Teodorovic, I., Kaisarevic, S. 2020 Fish biomarkers from a different perspective: evidence of adaptive strategy of *Abramis brama* (L.) to chemical stress. *Environ. Sci. Eur.*, 32(1), 1–15.
- Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.*, 119(6), S3-S10.
- Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., Dzobo, K. 2018. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(6), 1578.
- Tian, B., Hua, Y. 2005. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chem*, 91(3), 413-418.
- Tiwari, K. B., Gatto, C., Wilkinson, B. J. 2018. Interrelationships among Fatty Acid Composition, Staphyloxanthin Content, Fluidity, and Carbon Flow in the *Staphylococcus aureus* Membrane. *Molecules*, 23(5), 1201.
- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler Jr, V. G. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 28(3), 603-661.
- Trentin, D. S., Silva, D. B., Amaral, M. W., Zimmer, K. R., Silva, M. V., Lopes, N. P., Giordani, L.B., Macedo, A. J. 2013. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PloS one*, 8(6), e66257
- Troeman, D. P. R., Van Hout, D., Kluytmans, J. A. J. W. 2019. Antimicrobial approaches in the prevention of *Staphylococcus aureus* infections: a review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 74(2), 281-294.
- Tuchscher, L., Medina, E., Hussain, M., Völker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R.A., Becker, K., Peters, G., Löffler, B. 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO molecular medicine*, 3(3), 129-141

- Uribe-Alvarez, C., Chiquete-Félix, N., Contreras-Zentella, M., Guerrero-Castillo, S., Peña, A., Uribe-Carvajal, S. 2016. *Staphylococcus epidermidis*: metabolic adaptation and biofilm formation in response to different oxygen concentrations. *FEMS Pathogen Dis*, 74(1), ftv111.
- Van Houdt, R., Michiels, C. W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.*, 109(4), 1117-1131.
- Vargas, F., Díaz, Y., Carbonell, K. 2004. Antioxidant and scavenging activity of emodin, aloemodin, and rhein on free-radical and reactive oxygen species. *Pharm. Biol.*, 42(4-5), 342-348.
- Vasilchenko, A. S., Rogozhin, E. A. 2019. Sub-inhibitory effects of antimicrobial peptides. *Front microbiol*, 10, 1160.
- Ventola, C. L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacol. Ther.*, 40(4), 277.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.*, 36(3), 131-149.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med*, 10(8), 789-799.
- Von Borowski, R. G., Zimmer, K. R., Leonardi, B. F., Trentin, D. S., Silva, R. C., de Barros, M. P., Macedo, A.J., Baggio Gnoatto, S.C., Gosman, G., Zimmer, A. R. 2019. Red pepper *Capsicum baccatum*: Source of antiadhesive and antibiofilm compounds against nosocomial bacteria. *Ind Crops Prod*, 127, 148-157.
- Von Wintersdorff, C. J., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., Savelkoul, S.V.M., Wolfs, P. F. 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.*, 7, 173.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., Ivanova, E. P. 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J. M., Yao, Y., Fischer, E. R., DeLeo, F. R., Otto, M. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.*, 279(52), 54881-54886.
- Wainwright, J., Hobbs, G., Nakouti, I. 2021. Persister cells: Formation, resuscitation and combative therapies. *Arch. Microbiol.*, 203(10), 5899-5906.
- Wang, X., Ge, J., Wang, K., Qian, J., Zou, Y. 2006. Evaluation of MTT assay for measurement of emodin-induced cytotoxicity. *Assay Drug Dev Technol.*, 4(2), 203-207.
- Wang, Y., Luo, Q., He, X., Wei, H., Wang, T., Shao, J., Jiang, X. 2018. Emodin induces apoptosis of colon cancer cells via induction of autophagy in a ROS-dependent manner. *Oncol. res*, 26(6), 889.
- Wang, X., Zhang, H., Chen, X. 2019. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2), 141-160.

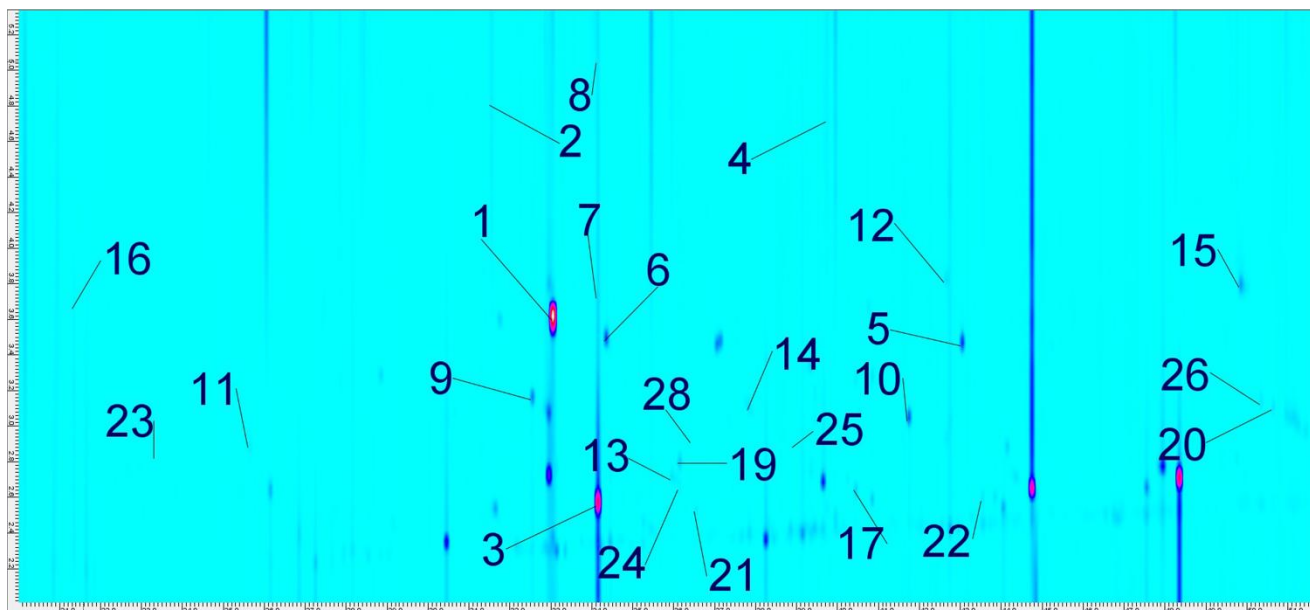
- Wei, W. T., Lin, S. Z., Liu, D. L., Wang, Z. H. 2013. The distinct mechanisms of the antitumor activity of emodin in different types of cancer. *Oncol. Rep.*, 30(6), 2555-2562.
- Wen, S., Zhu, D., Huang, P. 2013. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Med. Chem.*, 5(1), 53-67.
- Westendorf, J., Marquardt, H., Poginsky, B., Dominiak, M., Schmidt, J., Marquardt, H. 1990. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*, 240(1), 1-12.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., Mattick, J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487.
- Wild, C. P. 2019. The global cancer burden: necessity is the mother of prevention. *Nat. Rev. Cancer.*, 19(3), 123-124.
- Wille, J., Coenye, T. 2020. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box?. *Biofilm*, 2, 100027.
- Williams, G. H., Stoeber, K. 2012. The cell cycle and cancer. *J. Pathol.*, 226(2), 352-364.
- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T.D., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, C.D., Holmes, A. E. 2017. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A mini-review. *J. Eng. Technol.*, 6(4).
- Windham, I. H., Chaudhari, S. S., Bose, J. L., Thomas, V. C., Bayles, K. W. 2016. SrrAB modulates *Staphylococcus aureus* cell death through regulation of cidABC transcription. *J. Bacteriol.*, 198(7), 1114-1122.
- Wright, G. D. 2019. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. *Microb. Biotechnol.*, 12(1), 55-57.
- Xiang, H., Cao, F., Ming, D., Zheng, Y., Dong, X., Zhong, X., Mu, D., Li, B., Zhong, L., Cao, J., Wang, L., Ma, H., Wang, T., Wang, D. 2017. Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(17), 6671-6681.
- Xie, M. J., Ma, Y. H., Miao, L., Wang, Y., Wang, H. Z., Xing, Y. Y., Xi, T., Lu, Y. Y. 2014. Emodin-provoked oxidative stress induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through a p53-mitochondrial apoptotic pathway. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(13), 5201-5205.
- Xue, L., Chen, Y. Y., Yan, Z., Lu, W., Wan, D., Zhu, H. 2019. Staphyloxanthin: a potential target for antivirulence therapy. *Infect Drug Resist*, 12, 2151.
- Ya, C. U. I., Liu-Jing, C. H. E. N., Huang, T., Jian-Qiong, Y. I. N. G., Juan, L. I. 2020. The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin. *Chin.J. Nat. Med.*, 18(6), 425-435.
- Yan, X., Gu, S., Shi, Y., Cui, X., Wen, S., Ge, J. 2017. The effect of emodin on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic form and biofilm formation in vitro. *Arch. Microbiol.*, 199(9), 1267-1275.

- Yang, Y. B., Wang, S., Wang, C., Huang, Q. Y., Bai, J. W., Chen, J. Q., Chen, X.Y., Li, Y. H. 2015. Emodin affects biofilm formation and expression of virulence factors in *Streptococcus suis* ATCC700794. *Arch. Microbiol.*, 197(10), 1173-1180.
- Yang, S. K., Low, L. Y., Soo-Xi Yap, P., Yusoff, K., Mai, C. W., Lai, K. S., Erin Lim, S. H. 2018. Plant-derived antimicrobials: insights into mitigation of antimicrobial resistance. *Rec. Nat. Prod.*, 12(4), 295-316.
- Yu, J. Q., Bao, W., Lei, J. C. 2013. Emodin regulates apoptotic pathway in human liver cancer cells. *Phytother Res*, 27(2), 251-257.
- Zapotoczna, M., O'Neill, E., O'Gara, J. P. 2016. Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS pathogens*, 12(7), e1005671.
- Zhang, L., He, D., Li, K., Liu, H., Wang, B., Zheng, L., Li, J. 2017. Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells. *Biomed. Pharmacother.*, 90, 222-228.
- Zhou, J., Bi, S., Chen, H., Chen, T., Yang, R., Li, M., Fu, M., Jia, A. Q. 2017. Anti-biofilm and antivirulence activities of metabolites from *Plectosphaerella cucumerina* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.*, 8, 769.
- Zhou, R. S., Wang, X. W., Sun, Q. F., Ye, Z. J., Liu, J. W., Zhou, D. H., Tang, Y. 2019. Anticancer effects of emodin on HepG2 cell: Evidence from bioinformatic analysis. *Biomed Res. Int.*, 2019.
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V.A., Zorov, S.D., Balakireva, A.D., Juhaszovae, M., Sollot, S.J., Zorov, D. B. 2018. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.*, 552, 50-59.

<https://florafinder.org/>

8. Prilozi

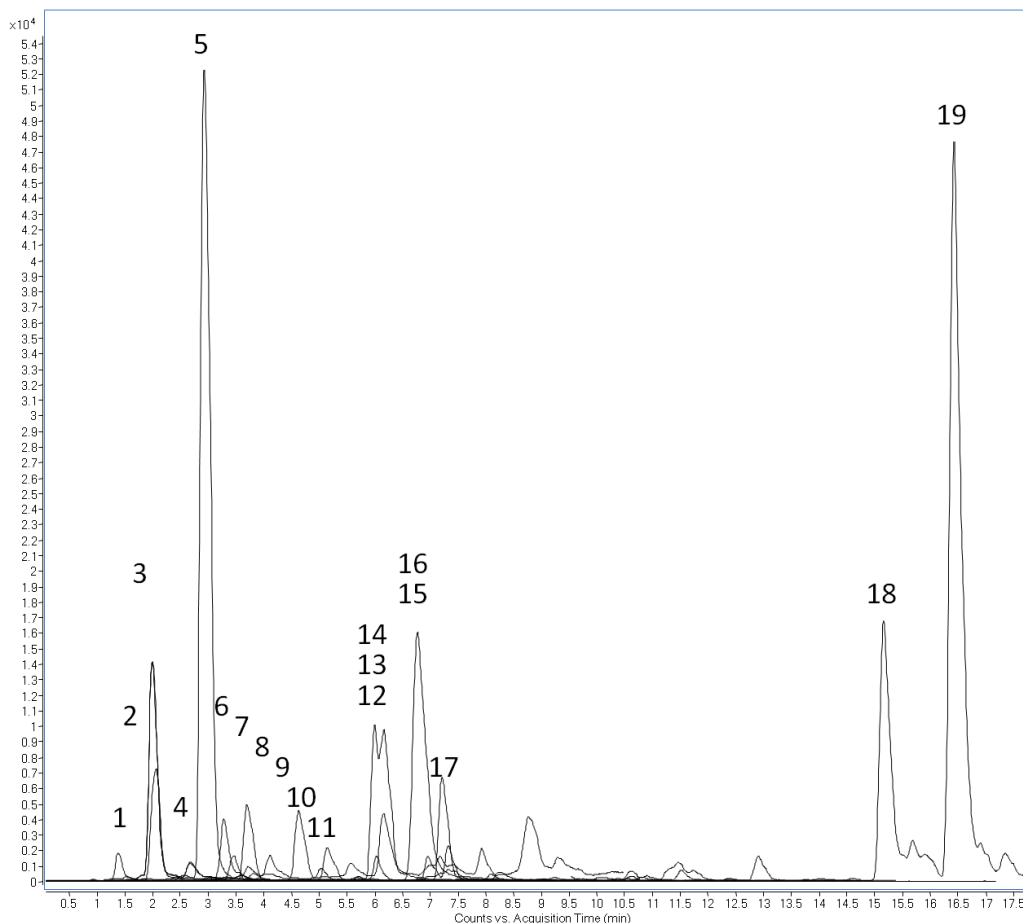
8.1. GC×GC-MS analiza



Slika 8.1. 2D GC×GC-MS hromatogram FA ekstrakta.

- (1) Benzoeva kiselina, 4-etoksi-, etil estar; (2) Benzen, 1-metil-3,5-bis[(trimetilsilil)oksi]-; (3) Trimetil (2,6 ditert-butilfenoksi) silan; (4) Azelainska kiselina, bis(trimetilsilil) estar; (5) 1-[(Trimetilsilil)oksi]-2-metilantrahinon; (6) 2',4'-Dimetoksi-3'-metilpropiofenon; (7) 2,4,6-Tri-t-butilbenzentiol; (8) 3,4,4'-Triaminodifenilsulfon; (9) 4,5,6,7-Tetrametilftalid; (10) Trimetilsilil 3,5-dimetoksi-4-(trimetilsililoksi) benzoat; (11) Benzoeva kiselina trimetilsilil estar; (12) 1,2-Benzendikarboksilna kiselina, bis(8-metilnonil) estar; (13) Benzoeva kiselina, 4-[(trimetilsilil)oksi], trimetilsilil estar; (14) 1,4,5,7-Tetrametil-furo[3,4-d]piridazin; (15) 2-[4-(4-Metoksifenil)-3-fenilpirazol-1-il]-4-feniltiazol; (16) 2-propanska kiselina, 2-metil-, oksibis(2,1-etandiloksi-2,1-etandiil) estar; (17) Benzoeva kiselina, 3,4-bis[(trimetilsilil)oksi]-, trimetilsilil estar; (18) 2H-1-Benzopiran, 3,4-dihidro-2-[3,4-bis[(trimetilsilil)oksi]fenil]-3,5,7-tris[(trimetilsilil)oksi]-, (2R-trans)-; (19) Benzensirćetna kiselina, 4-[(trimetilsilil)oksi]-, trimetilsilil estar; (20) Heksandiolna kiselina, bis(2-etilheksil) estar; (21) Dodekanska kiselina, trimetilsilil estar; (22) 3-Vanil-1,2-bis(trimetilsililoksi)propan; (23) 2-propanska kiselina, 3-metoksi-3-[(trimetilsilil)oksi]-, metil estar; (24) α -N-Normetadol; (25) Benzoeva kiselina, 3-metoksi-4-[(trimetilsilil)oksi]-, trimetilsilil estar; (26) 2-[4-(4-Metoksifenil)-3-fenilpirazol-1-il]-4-feniltiazol; (27) Orcinol, trimetilsilil etar; (28) Pirimidin, 5-metil-2,4-bis[(trimetilsilil)oksi]-

8.2. LC-MS/MS analiza



Slika 8.2. SRM hromatogram etil-acetatnog ekstrakta FA. (1) Galna kiselina, tR 1.36 min, (169→125); (2) Katehin, tR 1.96 min, (289→245); (3) Protokatehinska kiselina, tR 1.99 min, (153→109); (4) 2,5-Dihidroksibenzoeva kiselina, tR 2.64 min, (153→109); (5) *p*-hidroksibenzoeva kiselina, tR 2.94 min, (137→93); (6) Eskuletin, tR 3.11 min, (177→133); (7) Kafeinska kiselina, tR 3.28 min, (179→135); (8) Vanilinska kiselina, tR 3.44 min, (167→108); (9) Siringinska kiselina, tR 3.70 min, (197→182); (10) *p*-kumarinska kiselina, tR 4.63 min, (163→119); (11) Ferulinska kiselina, tR 5.15 min, (193→134); (12) Luteolin -7-O-glukozid, tR 6.00 min, (447→285); (13) Rutin, tR 6.05 min, (609→300); (14) Elaginska kiselina, tR 6.17 min, (301→301); (15) Kvercetin-3-O-glukozid, tR 6.17 min, (463→300); (16) Kaempferol-3-O-glukozid, tR 7.14 min, (447→284); (17) Kvercitrin, tR 7.23 min, (447→300); (18) Diosmetin, tR 10.85 min, (299→284); (19) Emodin, tR 16.41, (269→225). tR – retenciono vreme

8.3. DPPH test

Tabela 8.1. Procenat inhibicije DPPH radikala FA ekstraktom

FA (µg/mL)	6,25	12,5	25	50	100	200	400
% inhibicije	2,5±0,12	54,6±0,11	66,5±0,09	73,3±0,04	62,3	52±0,06	32,5±0,23
Ask.kis (µg/mL)	0,31	0,625	1,25	2,5	5	10	20
% inhibicije	43,6	53,8±0,01	82,2±0,06	96±0,01	95,7±0,01	96	96,5±0,01

8.4. TBA test

Tabela 8.2. Procenat inhibicije lipidne peroksidacije FA ekstraktom i emodinom

FA ($\mu\text{g/mL}$)	9	18,2	37,5	75	150	300
% inhibicije	29 \pm 0,03	24 \pm 0,1	36,2 \pm 0,02	31,8 \pm 0,01	57 \pm 0,01	58,9 \pm 0,01
E ($\mu\text{g/mL}$)	0,31	0,625	1,25	2,5	5	10
% inhibicije	nd	19 \pm	11,9 \pm 0,04	23,2 \pm 0,05	3 \pm 0,8	nd
BHT ($\mu\text{g/mL}$)	9	18,2	37,5	75	150	300
% inhibicije	26,1 \pm 0,01	38,7 \pm 0,02	49,4	54,8 \pm 0,01	61,3 \pm 0,01	71,5

8.5. Efekat FA ekstrakta i emodina na preživljavanje sojeva *S. aureus*

Tabela 8.3. Procenat preživljavanja *S. aureus* sojeva pod tretmanom FA ekstraktom

	% preživljavanja na odabranim koncentracijama (mg/mL)							
	0,0156	0,0312	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
ATCC 25923	104,3 \pm 2,6	80,1 \pm 1,8	76,3 \pm 1,79	70,7 \pm 3,1	58,8 \pm 0,34	39,9 \pm 4,1	67 \pm 4,6	97,2 \pm 3,09
ATCC 43300	94 \pm 0,4	57 \pm 1,8	32,1 \pm 0,61	58,9 \pm 3,2	63,6 \pm 2,3	68,5 \pm 2,1	74,9 \pm 2,4	93,3 \pm 3,09
Gp41	118,3 \pm 0,1	60 \pm 7,73	58,2 \pm 0,59	30,8 \pm 0,65	33,9 \pm 0,98	31 \pm 1,01	40,8 \pm 2,3	113,7 \pm 1,7
Gp19	102 \pm 4,64	79,1 \pm 2,29	36,7 \pm 4,2	43 \pm 6,3	44,2 \pm 0,67	45,5 \pm 0,4	70,5 \pm 0,3	94,6 \pm 3,1
Gp29	75,6 \pm 1,8	47,6 \pm 2,8	16,6 \pm 1,9	23,7 \pm 3,9	33,2 \pm 2,02	32,1 \pm 1,8	75,7 \pm 1,5	124 \pm 1,62
Gp7	113,4 \pm 0,84	94,7 \pm 2,3	81,8 \pm 2,1	35 \pm 0,3	38,2 \pm 1,9	43,4 \pm 3,1	86,1 \pm 0,5	109,3 \pm 0,93

Tabela 8.4. Procenat preživljavanja *S. aureus* sojeva pod tretmanom emodinom

	% preživljavanja na odabranim koncentracijama ($\mu\text{g/mL}$)							
	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	200
ATCC 25923	100,9 \pm 2,54	69,5 \pm 1,8	40,2 \pm 1,8	43,2 \pm 1,5	22,7 \pm 0,35	53,1 \pm 2,4	82 \pm 4,8	117 \pm 5,5
ATCC 43300	106,2 \pm 4,5	66,9 \pm 3,9	48,5 \pm 3,4	31,3 \pm 1,3	51,4 \pm 0,3	70,7 \pm 0,2	90,8 \pm 2,4	100,7 \pm 3,1
Gp41	107,3 \pm 3,6	55,6 \pm 2,1	45,3 \pm 2,5	17,7 \pm 0,3	28,8 \pm 3,3	49,1 \pm 3,5	94,2 \pm 0,6	125,7 \pm 2,7
Gp19	118 \pm 1,7	60 \pm 1,9	32,7 \pm 1,54	44,6 \pm 2,7	41,5 \pm 2,7	47,7 \pm 1,1	47,4 \pm 1,3	62,3 \pm 4,3
Gp29	79,07 \pm 0,12	31,5 \pm 0,8	36,3 \pm 2,6	35,5 \pm 0,3	42,6 \pm 0,2	63,2 \pm 2,2	106,9 \pm 3,4	110,9 \pm 2,7
Gp7	75,9 \pm 1,8	33,1 \pm 1,1	34,9 \pm 0,5	39,3 \pm 2,7	45,3 \pm 1,7	62 \pm 0,5	98,5 \pm 0,2	111,3 \pm 2,9

8.6. Efekat FA ekstrakta i emodina na formiranje biofilмова sojeva *S. aureus*

Tabela 8.5. Procenat inhibicije formiranja biofilma sojeva *S. aureus* pod tretmanom FA ekstraktom

	% inhibicije formiranja biofilma na odabranim koncentracijama						
	1/64×MIK	1/32×MIK	1/16×MIK	1/8×MIK	1/4×MIK	1/2×MIK	MIK
ATCC 25923	32,4±6,1	30,8±1,7	37,2±3,2	56±7,4	70,7±7,8	84,1±0,7	91,6±0,1
ATCC 43300	18,6±10,9	16,9±11,5	32,8±6,9	34,3±5,1	45±9,1	71,6±1	73,6±9,9
Gp41	33,6±5,2	38,1±5,5	45,4±1,5	44,9±1,1	44±1,1	46,6±6,2	57,7±4,2
Gp19	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	9±9,4
Gp29	46,3±4,6	42,8±1,8	17,8±2,03	13,5±1,9	18,9±1,8	22,2±1,2	16,5±4,4
Gp7	nd	nd	nd	8,2±8,1	5,3±7,2	18,4±5,5	59±6,6

nd – inhibicija nije detektovana ili je došlo do povećanja biomase biofilma

Tabela 8.6. Procenat inhibicije formiranja biofilma sojeva *S. aureus* pod tretmanom emodinom

	% inhibicije formiranja biofilma na odabranim koncentracijama						
	1/64×MIK	1/32×MIK	1/16×MIK	1/8×MIK	1/4×MIK	1/2×MIK	MIK
ATCC 25923	57,5±5,4	56,9±6,8	53±5,6	59±1,1	62,2±6,1	63,6±4,7	65,8±6,3
ATCC 43300	35,9±7,9	38,5±8,6	40,8±7,1	44,4±5,8	36,5±4,5	51,2±5,8	45±5,5
Gp41	22,7±6,8	37,1±0,6	39,8±6,4	46,4±3	56,6±1,4	59,3±2,9	51±7,6
Gp19	12,8±5,1	13,8±2,9	12,1±5,4	16,2±4,5	28,9±3,2	18,5±9,4	16,6±7,1
Gp29	20,5±6,7	35,1±9,1	37,4±8,4	39,2±6,1	35,7±8,1	57,1±4,2	73,6±1,8
Gp7	nd	nd	nd	nd	6,1±5,1	25,9±7,9	40±6,3

nd – inhibicija nije detektovana ili je došlo do povećanja biomase biofilma

Tabela 8.7. Procenat inhibicije formiranja biofilma odabranih sojeva *S. aureus* u kombinovanom tretmanu

	Vankomicin	Emodin	V+E
% inhibicije formiranja biofilma			
Gp41	nd	85±1,4	87,6±1,6
Gp29	nd	85,1±2,9	88,6±0,9

nd – inhibicija nije detektovana ili je došlo do povećanja biomase biofilma

8.7. Efekat FA ekstrakta i emodina na već formirane biofilmove sojeva *S. aureus*

Tabela 8.8. Procenat ukupne biomase preformiranih biofilмова sojeva *S. aureus* pod tretmanom FA ekstraktom

	% ukupne biomase biofilma na odabranim koncentracijama			
	1/2×MIK	MIK	2×MIK	4×MIK
ATCC 25923	106,8±8,1	107,2±3,7	135,2±0,4	143,1±7,4
ATCC 43300	86,6±4,8	64±0,4	56,1±5,1	118,5±9,7
Gp41	111,1±2,1	114±5,8	110,6±8,5	114,4±4,9
Gp19	85,5±1,9	71,7±0,7	74,9±6,2	74,5±6,1
Gp29	105,1±13,6	104,4±14,3	114,1±5,8	108,2±8,9
Gp7	95,4±7,6	96,3±1,4	103,1±8,8	100,1±6,1

Tabela 8.9. Procenat ukupne biomase preformiranih biofilmova sojeva *S. aureus* pod tretmanom emodinom

	% ukupne biomase biofilma na odabranim koncentracijama			
	1/2×MIK	MIK	2×MIK	4×MIK
ATCC 25923	98,4±1,9	103,6±3,5	105,3±2,6	101,7±1,9
ATCC 43300	81,8±2,8	70±3,9	68±1,3	80,2±0,2
Gp41	101,1±2,7	99,9±2,2	86,1±0,9	85±0,3
Gp19	94±3,1	97,8±4,2	94±1,1	92,2±1,5
Gp29	114,6±2,3	106,7±2,6	77,1±0,7	93,3±2,8
Gp7	88±1,5	87,2±2,5	86,5±2,2	76,7±1,8

Tabela 8.10. Procenat ukupne biomase preformiranih biofilma odabranih sojeva *S. aureus* u kombinovanom tretmanu

	Vankomicin	Emodin	V+E
	% ukupne biomase biofilma		
Gp41	105,9±4,6	87±5,6	103,8±2
Gp29	87,4±2,2	58,6±4,1	46,8±3,4

8.8. Efekat FA ekstrakta i emodina na ekstracelularne polisaharide u biofilmovima sojeva *S. aureus*

Tabela 8.11. Procenat inhibicije ekstracelularnog polisaharidnog matriksa sojeva *S. aureus* pod tretmanima FA ekstraktom i emodinom

	FA		E	
	H ₂ O	NaOH	H ₂ O	NaOH
	% inhibicije			
ATCC 25923	69,1±0,03	1,2	52,1±0,01	15,4±0,01
ATCC 43300	76,1±0,02	43,6±0,01	73,2	nd
Gp41	nd	Nd	nd	nd
Gp19	75±0,03	Nd	79,9±0,01	nd
Gp29	nd	Nd	66±0,04	36,1±0,03
Gp7	4,2±0,01	Nd	nd	43,6±0,03

H₂O – polisaharidi rastvorni u vodi; NaOH – polisaharidi nerastvorni u vodi
 nd – nije detektovana inhibicija ili je došlo do povećane produkcije polisaharida

8.9. Efekat FA ekstrakta i emodina na aerobnu respiraciju sojeva *S. aureus*

Tabela 8.12. Procenat inhibicije I (%) potrošnje O₂ i produkcije CO₂ u planktonskoj i biofilm formi nakon 24/48h pri izlaganju FA ekstraktom i emodinom (E).

Sojevi		I (%) plankton		I (%) biofilm	
		FA (24 h)	E (48 h)	FA (24 h)	E (48 h)
ATCC 25923	O ₂	92,9	53,1	28,5	nd
	CO ₂	99	100	2,2	nd
ATCC 43300	O ₂	20,3	nd	nd	nd
	CO ₂	63,6	66,2	nd	48,7
Gp41	O ₂	93,2	85,1	72,8	37,7
	CO ₂	99,3	100	68,1	65,7
Gp19	O ₂	67,1	18,5	78,9	nd
	CO ₂	63,7	71,5	69,3	nd
Gp29	O ₂	93,1	58,5	nd	nd
	CO ₂	99,7	98,5	nd	nd
Gp7	O ₂	71,7	18,7	79,6	nd
	CO ₂	98,2	49,1	68,6	nd

nd – nije detektovana inhibicija

Tabela 8.13. Procenat inhibicije I (%) potrošnje O₂ i produkcije CO₂ u planktonskoj i biofilm formi nakon 24h pri kombinovanom tretmanu vankomicinom (V) i emodinom (E)

		I (%) plankton			I (%) biofilm		
		V	E	V+E	V	E	V+E
Gp41	O ₂	nd	53,8	77,8	11,1	16,4	16,2
	CO ₂	nd	100	100	12,9	37,4	39,6
Gp29	O ₂	nd	76,1	62,2	nd	5,3	nd
	CO ₂	nd	100	97,5	nd	9,4	3,6

nd – nije detektovana inhibicija

BIOGRAFIJA

Stefana Đukanović rođena je 7.1.1993. godine u Vršcu. Godine 2012. upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu na studijskom programu Biologija. Osnovne studije završila 2016. godine sa prosekom 8.60, a master studije upisala 2016. godine na matičnom fakultetu, na modulu Biologija mikroorganizama i odbranila master rad avgusta 2017. godine sa ocenom 10. Iste godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od maja 2018 .godine, Stefana je Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja na projektu „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata” (172058), na kom je godinu danas kasnije zaposlena kao istraživač-pripravnik. U martu 2021. izabrana je u zvanje istraživač-saradnik. Kao student doktorskih studija učestvuje u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju iz predmeta Mikrobiologija, Mikrobiološki praktikum i Metode u mikrobiologiji. Bavi se istraživanjem u oblasti mikrobiologije i genotoksikologije, naročito testiranjem antibakterijske, citotoksične i genotoksične aktivnosti ekstrakata biljaka koje se koriste u narodnoj medicini. Od školske 2017/18 učestvuje u realizaciji seminara iz Biologije u Istraživačkoj stanici Petnica, u svojstvu saradnika.

Član je Srpskog biološkog društva, Udruženja mikrobiologa Srbije, Društva genetičara Srbije, Evropskog društva za mutagenezu životne sredine i genomiku (European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, EEMGS) i Federacije evropskih mikrobioloških društava (Federation of European Microbiological Societies, FEMS). Do sada je objavila sedam naučnih radova u međunarodnim časopisima kategorije M21a, M22 i M23. Na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu učestvovala je sa 25 saopštenja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Стефана Д. Вулетић

број индекса Б3007/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Биолошка активност екстракта крушине (*Frangula alnus*) и његове доминантне компоненте,

емодина, у прокариотским и еукариотским тест системима

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.02.2022.

Вулетић С.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Стефана Д. Вулетић

Број индекса Б3007/2017

Студијски програм Биологија

Наслов рада Биолошка активност екстракта крушине (*Frangula alnus*) и његове доминантне компоненте, емолина, у прокариотским и еукариотским тест системима

Ментор др Драгана Митић-Ђулафић

Потписани/а Стефана Д. Вулетић

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

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

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

Потпис докторанда

Вулетић С.

У Београду, 28.02.2022.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Биолошка активност екстракта крушине (*Fragula alnus*) и његове доминантне компоненте, емодина, у прокариотским и еукариотским тест системима

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

Вукешит С.

У Београду, 28.02.2022.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.