

Antifungalna aktivnost etarskog ulja *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) na rast izolata *Candida albicans*

**Mirjana D. Marčetić^{1*}, Dragana D. Božić², Marina T. Milenković²,
Mirjana M. Kovačević³, Nada N. Kovačević¹**

¹ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakognoziju,
Vojvode Stepe 450, Beograd

² Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za mikrobiologiju i
imunologiju, Vojvode Stepe 450, Beograd

³ Poliklinika Beo-lab plus, Resavska 58-60, Beograd

* Autor za korespondenciju: Mirjana Marčetić, Tel. +381 11 3951 358,
e-mail: mirjana.marcetic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Ispitivano je delovanje etarskih ulja korena, herbe i ploda devesilja, *Seseli rigidum* iz dve prirodne populacije na 28 izolata *Candida albicans* i jedan standardni soj *C. albicans* ATCC 10259. Sojevi *C. albicans* koji su korišćeni u ovom ispitivanju izolovani su iz orofaringealnog brisa, vaginalnog i/ili cervikalnog brisa, brisa oka, brisa rane, fecesa i urina.

Ispitivani sojevi su pokazali visok stepen rezistencije prema delovanju kontrolnog antimikotika flukonazola, a u nešto manjoj meri i amfotericina B. Etarska ulja devesilja, primenjena u koncentracijama 50-200 µg/ml, uzrokovala su inhibiciju rasta ispitivanih sojeva (28,6-46,4% testiranih sojeva). Inhibitorski efekat na tri soja *C. albicans* ostvaren je sa etarskim uljem korena, sa oba lokaliteta, već pri koncentraciji od 50 µg/ml. Dominantno jedinjenje u ovim etarskim uljima je predstavljao falkarinol (57,5% i 88,8%). Slabiju aktivnost su ispoljila etarska ulja herbe i ploda devesilja, koja su u koncentraciji od 100 µg/ml inhibirala rast pojedinih ispitivanih sojeva. Kod etarskog ulja ploda uočeno je nešto izraženije delovanje etarskog ulja populacije iz Brđanske klisure, koje je sadržalo veću količinu α-pinena i β-felandrena, a manju količinu sabinena.

Dobijeni rezultati su pokazali da etarska ulja korena, herbe i ploda devesilja ispoljavaju značajnu antifungalnu aktivnost na pojedine rezistentne sojeve *C. albicans*.

Ključne reči: antifungalna aktivnost, *Seseli rigidum*, etarsko ulje, *Candida albicans*

Uvod

Infekcije izazvane vrstama iz roda *Candida* predstavljaju značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta širom sveta. Učestalost invazivnih infekcija izazvanih pripadnicima ovog roda je u poslednje dve decenije u stalnom porastu usled povećanja broja imunokompromitovanih osoba (1-3). Sam rod obuhvata preko 100 različitih vrsta, od kojih oboljenja ljudi najčešće izaziva *Candida albicans*, kao i nekoliko tzv. non-*albicans* vrsta: *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* i nedavno opisana *C. auris*. *Candida albicans* je široko rasprostranjena vrsta, koja predstavlja sastavni deo mikrobiote kože i sluzokože orofaringealnog i gastrointestinalnog trakta i vulvovaginalne regije. Infekcije su najčešće endogenog porekla, ali je moguć i egzogeni put širenja direktnim kontaktom sa lezijama na sluzokoži obolele osobe (najčešće seksualnim putem) ili unosom kontaminiranih lekova ili endoproteza (veštačkih srčanih ventila, intravenskih ili urinarnih katetera i sl.) (4, 5). Spektar infekcija koje izaziva *C. albicans* se kreće od blagih infekcija kože, sluzokože i noktiju, do teških infekcija kardiovaskularnog i nervnog sistema, kostiju, zglobova, oka i kandidemije, nastalih usled hematogene diseminacije. *Candida albicans* se i dalje smatra glavnim uzročnikom kandidemije, mada se poslednjih godina u različitim delovima sveta non-*albicans* vrste izoluju u više od 50 % slučajeva (6). U faktore rizika za razvoj sistemskih mikoza spadaju transplantacija koštane srži ili nekog drugog organa, neutropenija, primena imunosupresivne terapije, maligne bolesti i AIDS, a češće se javljaju kod starijih osoba ili prevremeno rođene dece. U lečenju sistemskih infekcija se koriste samo 4 grupe antimikotika: azoli (flukonazol, itrakonazol, posakonazol i vorikonazol), polieni (amfotericin B), ehinokandini (mikafungin, anidulafungin i kaspofungin) i pirimidinski analog flucitozin.

Ograničen broj lekova koji se koriste kao prva terapijska linija, njihova velika toksičnost, kao i porast učestalosti rezistencije *Candida* spp. na antimikotike dodatno otežavaju lečenje ovih infekcija i povećavaju učestalost smrtnih ishoda (7). Rezistencija *Candida* spp. na antimikotike može biti urođena i stečena. Urođena rezistencija na flukonazol se javlja kod *C. krusei*, smanjena osetljivost na amfotericin B, ehinokandine i flukonazol kod *C. auris*, a smanjena osetljivost na ehinokandine i flukonazol kod *C. guilliermondii*. Stečena rezistencija se javlja nakon dugotrajne upotrebe antimikotika, najčešće pogađa vrste *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr* i *C. lusitaniae*, a nastaje usled mutacije gena za ciljne molekule, smanjene koncentracije leka u gljivičnim ćelijama (usled smanjenog ulaska leka ili prisustva efluksnih pumpi koje aktivno izbacuju lek iz ćelija) i smanjene intracelularne aktivacije leka (6). Kao i kod urođene rezistencije, stečenom rezistencijom je najviše pogođena grupa azola.

Jedan od potencijalnih pristupa u borbi protiv rezistencije predstavlja upotreba biljnih proizvoda, koji samostalno ili u kombinaciji sa konvencionalnim antimikoticima postižu terapijski efekat. U odnosu na klasične antimikrobne lekove, na ovakve

kombinacije mikroorganizmi ne stiču, ili teže stiču rezistenciju, što predstavlja jednu od najznačajnijih prednosti.

Devesilje, *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) je subendemična biljka raprostranjena na prostoru Balkanskog poluostrva, Rumunije i Ukrajine (8). *S. rigidum* je višegodišnja, zeljasta biljka sa štitasto razgranatom, uspravnom stabljikom i krutim, dvostruko perasto deljenim listovima. Cvetovi su sakupljeni u krupne štitove, a krunični listići su mali, beli ili ružičasti. Plod je šizokarpijum, jajastog oblika i orašice imaju 5 istaknutih rebara (9).

U dosadašnjim ispitivanjima u vrstama roda *Seseli* utvrđeno je prisustvo etarskih ulja, kumarina, flavonoida, lignana, seskviterpenskih laktona i poliacetilena (10-14). Vrste roda *Seseli* tradicionalno su primenjivane kod urinarnih tegoba, kašlja i prehlade, tegoba sa varenjem, za pospešivanje lučenja žuči, kod reumatizma i za lečenje upala i otoka (11, 14-16). Etarsko ulje vrsta roda *Seseli* je pokazalo antibakterijsko (15, 17-19), antifungalno (16, 17, 20) i umereno citotoksično delovanje (16, 21). Etilacetatni ekstrakti herbe vrsta *S. andronakii*, *S. campestre*, *S. gummiferum* subsp. *corymbosum*, *S. petraeum*, *S. resinorum* i *S. tortuosum* i kumarini izolovani iz *S. gummiferum* subsp. *corymbosum* ispoljili su antinociceptivnu i antiinflamatornu aktivnost, bez indukcije akutne toksičnosti ili oštećenja gastrične mukoze (11, 13).

Cilj rada je bilo ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskog ulja korena, herbe i ploda devesilja, *S. rigidum* iz dve prirodne populacije. Ispitano je delovanje prema 28 izolata gljivice *Candida albicans*, a kao pozitivne kontrole korišćeni su antimikotici flukonazol i amfotericin B.

Eksperimentalni deo

Biljni materijal, izolacija i analiza etarskog ulja

Biljni materijal je prikupljan iz dve prirodne populacije na teritoriji Republike Srbije. Nadzemni deo i koren devesilja, *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) u fazi cvetanja sakupljeni su u junu 2010. godine, a plod u septembru 2010. godine u Brđanskoj klisuri (Herbarski uzorak 3228 HFF, Herbarijum Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu) i Golupcu (Herbarski uzorak 3233 HFF, Herbarijum Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu).

Etarsko ulje je izolovano iz osušenog i usitnjenog biljnog materijala destilacijom pomoću vodene pare u aparaturi po Klevendžeru tokom 2,5 časa, postupkom datim u Ph. Eur. 9.0. (22).

Kvalitativna i kvantitativna analiza etarskih ulja urađena je primenom metoda gasne hromatografije (GC) i gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS), pod ranije opisanim uslovima (23).

Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskog ulja i antifungalnih agenasa na rast izolata Candida albicans

Ispitivana je aktivnost etarskog ulja korena, herbe i ploda devesilja bujon-mikrodilucionom metodom (24) na 28 izolovanih vanbolničkih sojeva *C. albicans*, kao i na standardnom laboratorijskom soju *C. albicans* (ATCC 10259) (Tabela I). Identifikacija izolata *C. albicans* do nivoa vrste komercijalnim testovima Candi-fast (ELITech Group, Francuska) i ispitivanje osetljivosti na konvencionalne antimikotike urađeni su u mikrobiološkoj laboratoriji Beo-lab plus, Beograd.

Tabela I Poreklo izolovanih sojeva *C. albicans*

Table I The origin of the isolated strains of *C. Albicans*

| <i>C. albicans</i> Broj soja | Poreklo izolata | <i>C. albicans</i> Broj soja | Poreklo izolata |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1. | orofaringealni bris | 16. | orofaringealni bris |
| 2. | orofaringealni bris | 17. | orofaringealni bris |
| 3. | koprokultura | 18. | vaginalni i cervikalni bris |
| 4. | vaginalni i cervikalni bris | 19. | vaginalni i cervikalni bris |
| 5. | orofaringealni bris | 20. | koprokultura |
| 6. | cervikalni bris | 21. | koprokultura |
| 7. | koprokultura | 22. | vaginalni i cervikalni bris |
| 8. | vaginalni i cervikalni bris | 23. | vaginalni bris |
| 9. | koprokultura | 24. | vaginalni bris |
| 10. | vaginalni i cervikalni bris | 25. | urinokultura |
| 11. | bris oka | 26. | orofaringealni bris |
| 12. | koprokultura | 27. | vaginalni bris |
| 13. | bris rane | 28. | cervikalni bris |
| 14. | vaginalni i cervikalni bris | ATCC 10259 | standardni soj |
| 15. | vaginalni i cervikalni bris | | |

Prekonoćne kulture svakog soja kandidate su pripremljene u *Sabouraud* bujonu, tako da je finalna suspenzija sadržala inokulum 2×10^5 ćelija gljiva/ml (CFU/ml). Etarska ulja su rastvarana u dimetilsulfoksidu (DMSO) do koncentracije 5 mg/ml, a zatim razblažena u *Sabouraud* bujonu do radnih koncentracija (6,25-200 µg/ml).

Suspenzijama ćelija gljiva dodat je indikator rasta 2,3,5-trifeniltetrazolijum hlorid (TTC, Sigma, USA) (0,05%). TTC je redoks indikator, koji se koristi za detekciju ćelijske respiracije i samim tim za diferenciranje metabolički aktivnih od metabolički neaktivnih ćelija. Pod uticajem ćelijskih dehidrogenaza dolazi do enzimske redukcije TTC, koji je bezbojan do 1,3,5-trifenilformazana (TFF), koji je crvene boje.

U mikrotitracionu ploču sa 96 mesta je dodato po 100 µl razblaženja etarskog ulja u triplikatu i po 100 µl suspenzije ćelija gljiva. Kao negativna kontrola su postavljena dva triplikata ćelija gljiva u medijumu bez dodatka etarskog ulja. Nakon 48h kultivacije u termostatu na 35°C u aerobnim uslovima očitana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Minimalna inhibitorna koncentracija je predstavljala najnižu koncentraciju etarskog ulja, pri kojoj nije uočen vidljiv rast mikroorganizma (vizuelnim očitavanjem boja medijuma je ostala nepromenjena). Kao kontrolni antimikotici primenjeni su flukonazol i amfotericin B. Svaki eksperiment je ponovljen tri puta, a kao rezultat predstavljene su dobijene srednje vrednosti.

Rezultati i diskusija

Hemijski sastav ispitivanih etarskih ulja korena, herbe i ploda devesilja je utvrđen GC i GC-MS analizama i prikazan u prethodnom istraživanju (23). Karakterističan sastojak u etarskom ulju korena *S. rigidum* bio je poliacetilen falkarinol (19, 25). Alifatični poliacetileni tipa falkarinola prisutni su u mnogim vrstama familije Apiaceae i pokazuju niz bioloških aktivnosti, poput antimikrobnog i citotoksičnog delovanja (26-28). Etarsko ulje korena populacije iz Brđanske klisure sadržalo je veću koncentraciju falkarinola (88,8%) od ulja populacije iz Golupca (57,5%) (Tabela II) (19, 23). U etarskom ulju herbe devesilja glavne sastojke su predstavljali monoterpeni: α -pinen (57,4% i 44,7%), sabinen (5,5% i 16,1%) i limonen (6,7% i 8,4%), a u etarskom ulju ploda monoterpeni α -pinen (23,3% i 21,1%) i sabinen (12,9% i 19,2%), kao i seskviterpen β -felandren (17,4 i 12,6%) (19, 23).

Tabela II Sastav etarskog ulja korena, herbe i ploda *S. rigidum* iz dve prirodne populacije (23)

Table II The composition of the essential oil of *S. rigidum* root, aerial parts and fruit from two natural populations (23)

| | Sadržaj (%) ^a | | | | | |
|--------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|---------|-------|------|
| | Brđanska klisura | | | Golubac | | |
| | Koren ^b | Herba ^c | Plod ^d | Koren | Herba | Plod |
| α -Pinen | 0,2 | 57,4 | 23,3 | 4,3 | 44,7 | 21,1 |
| Kamfen | tr ^e | 5,8 | 2,3 | 0,2 | 2,2 | 0,8 |
| Sabinen | tr | 5,5 | 12,9 | 1,2 | 16,1 | 19,2 |
| β -Pinen | tr | 3,1 | 2,1 | 0,6 | 6,0 | 4,6 |
| Limonen | tr | 6,7 | tr | 0,8 | 8,4 | tr |
| β -Felandren | - | tr | 17,4 | tr | tr | 12,6 |
| δ -Amorfen | 0,3 | - | - | 7,2 | - | - |
| Falkarinol | 88,8 | - | 2,9 | 57,5 | 0,3 | 2,7 |

^a Relativni udeo jedinjenja u etarskom ulju; ^b etarsko ulje korena; ^c etarsko ulje herbe; ^d etarsko ulje ploda; ^e tragovi (<0.1%).

Ispitana je aktivnost etarskog ulja korena, herbe i ploda devesilja na rast 28 izolovanih vanbolničkih sojeva *C. albicans* od kojih je 28,6% iz vaginalnog i cervikalnog brisa, 10,7% iz vaginalnog brisa, 7,1% iz cervikalnog brisa, 21,4% iz orofaringealnog brisa, 21,4% iz koprokulture, 3,6% iz brisa oka, 3,6% iz brisa rane i 3,6% iz urinokulture, kao i na standardni laboratorijski soj *C. albicans* ATCC 10259.

Tabela III Antifungalna aktivnost etarskog ulja korena, herbe i ploda *S. rigidum* na rast izolata i standardnog soja *C. albicans*

Table III Antifungal activity of essential oil of *S. rigidum* root, aerial parts and fruit on the growth of *C. albicans* isolates and standard strain

| <i>C. albicans</i> Broj soja | Brđanska klisura ^a | | | Golubac ^b | | | Kontrola ^c | |
|---------------------------------|-------------------------------|-------|------|----------------------|-------|------|-----------------------|------------|
| | Koren | Herba | Plod | Koren | Herba | Plod | Amfotericin B | Flukonazol |
| MIK ^d (µg/ml) | | | | | | | | |
| 1. | 200 | >200 | >200 | 200 | >200 | >200 | 0,05 | <4 |
| 2. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | >64 |
| 3. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | >64 |
| 4. | 100 | 100 | >200 | 100 | 200 | >200 | 0,05 | <4 |
| 5. | 200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | 32 |
| 6. | 200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | 16 |
| 7. | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0,05 | >64 |
| 8. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | 64 |
| 9. | 200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | >64 |
| 10. | 100 | 100 | 100 | 50 | 100 | 100 | 0,75 | <4 |
| 11. | >200 | >200 | >200 | 200 | >200 | >200 | >50 | <4 |
| 12. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,38 | >64 |
| 13. | 50 | 100 | 100 | 50 | 100 | 200 | 12,5 | 32 |
| 14. | 50 | 100 | 100 | 50 | 200 | 100 | 0,75 | 16 |
| 15. | 50 | 100 | 100 | 50 | 100 | 100 | 12,5 | 32 |
| 16. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 12,5 | >64 |
| 17. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 12,5 | >64 |
| 18. | 200 | 200 | 100 | 200 | 200 | 100 | 0,05 | <4 |
| 19. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,75 | >64 |
| 20. | 200 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 25 | >64 |
| 21. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 6,25 | >64 |
| 22. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | >64 |
| 23. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,75 | >64 |
| 24. | 200 | 200 | 100 | 200 | 100 | 100 | 3,12 | >64 |
| 25. | >200 | 200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | <4 |
| 26. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 6,25 | >64 |
| 27. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,05 | >64 |
| 28. | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | >200 | 0,75 | <4 |
| ATCC 10259 | 100 | 200 | 100 | 200 | 100 | 200 | 12,5 | <4 |

^a etarsko ulje korena, herbe ili ploda devesilja populacije iz Brđanske klisure; ^b etarsko ulje korena, herbe ili ploda devesilja populacije iz Golupca; ^c kontrola -antimikotici amfotericin B i flukonazol; ^d minimalna inhibitorna koncentracija (µg/ml);

Tabela IV Osetljivost izolata *C. albicans* na delovanje etarskih ulja korena, herbe i ploda *S. rigidum*

Table IV The sensibility of *C. albicans* isolates on effect of essential oil of *S. rigidum* root, aerial parts and fruit

| MIK ^a (µg/ml) | Etarsko ulje korena | | Etarsko ulje herbe | | Etarsko ulje ploda | |
|-----------------------------|------------------------|---------|---------------------|---------|---------------------|---------|
| | Brđanska klisura | Golubac | Brđanska klisura | Golubac | Brđanska klisura | Golubac |
| | % izolata ^b | | | | | |
| 50 | 10,7 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 10,7 | 10,7 | 25 | 21,4 | 28,6 | 25 |
| 200 | 25 | 14,3 | 10,7 | 10,7 | 0 | 3,6 |
| >200 | 53,6 | 60,7 | 64,3 | 67,9 | 71,4 | 71,4 |

^a minimalna inhibitorna koncentracija (µg/ml);

^b % izolata *Candida albicans* koji su osetljivi na određenu MIK i % izolata za koje MIK nije utvrđena (>200).

Ispitivana etarska ulja su inhibirala rast 28,6-46,4% testiranih sojeva *C. albicans* u rasponu koncentracija 50- 200 µg/ml (Tabela III i IV). U opsegu testiranih koncentracija, MIK nije detektovan kod 53,6-71,4% testiranih sojeva (Tabela III i IV). Najizraženiji inhibitorni efekat (50 µg/ml) na rast određenih sojeva ostvaren je sa etarskim uljem korena devesilja sa oba lokaliteta (etarsko ulje korena-Brđanska klisura na 10,7% i etarsko ulje korena - Golubac na 14,3% izolata, Tabela IV). Najveću osetljivost su pokazali izolati iz vaginalnog i cervikalnog brisa (3/13 izolata MIK 50 µg/ml, 2/13 izolata MIK 100 µg/ml), koprokulture (2/6 izolata MIK 100 µg/ml) i brisa rane (1/1 izolat MIK 50 µg/ml). Dominantno jedinjenje u etarskom ulju korena obe populacije je bio falkarinol (88,8% i 57,5%). Ranije istraživanje je pokazalo da falkarinol i falkarindiol deluju antifungalno i da u koncentracijama 20-200 µg/ml inhibiraju germinaciju spora gljivica (26). U našem ispitivanju, nešto bolju antifungalnu aktivnost je ispoljilo etarsko ulje korena populacije iz Golupca, sa manjim sadržajem falkarinola (57,5%), a više δ-amorfena (7,2%) i α-pinena (4,3%). Prirodni proizvodi, poput etarskih ulja su smeše velikog broja komponenti, koje ostvaruju delovanje na različita ciljna mesta unutar ćelije mikroorganizama i mogu ispoljiti aditivni ili

sinergistički efekat (29, 30). U našem ispitivanju uzrok različite osetljivosti ispitivanih sojeva može biti i njihovo različito poreklo (različiti klinički uzorci).

Slabija aktivnost uočena je kod etarskog ulja herbe devesilja, kao i kod etarskog ulja ploda. U koncentraciji od 100 µg/ml etarsko ulje herbe iz Brđanske klisure pokazalo je inhibitorno delovanje na rast 25% ispitivanih izolata, a etarsko ulje herbe iz Golupca na rast 21,4% ispitivanih izolata. Etarsko ulje ploda populacije iz Brđanske klisure je ispoljilo nešto bolji efekat na rast izolata *C. albicans* (MIK 100 µg/ml za 28,6% izolata) od etarskog ulja ploda populacije iz Golupca (MIK 100 µg/ml za 25% izolata). Etarsko ulje ploda populacije iz Brđanske klisure je sadržalo veću količinu α -pinena (23,3%) i β -felandrena (17,4%), a manju količinu sabinena (12,9%).

Visok stepen rezistencije ispitivanih sojeva uočen je i prema delovanju kontrolnog antifungalnog agensa flukonazola, a u nešto manjoj meri amfotericina B. Najveći broj izolata (65,5%) je bio osetljiv na dejstvo amfotericina B (MIK < 1 µg/ml) dok je 55,1% izolata pokazalo rezistenciju na flukonazol (MIK > 4 µg/ml).

Delovanje etarskih ulja korena, herbe i ploda je bilo izraženije od ranije ispitivane antifungalne aktivnosti etarskog ulja cvasti devesilja na sojeve *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium ochrochloron*, *P. funiculosum* i *Trichoderma viride* (MIK 10-50 µl/ml) (17). Takođe, aktivnost etarskog ulja plodova *S. tortuosum* L. i *S. montanum* L. na sojeve *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guillermondii*, *C. parapsilosis* je bila znatno slabija (0,64-5 µl/ml i 0,64-10 µl/ml,) (16), kao i aktivnost etarskog ulja herbe *S. annuum* na 15 sojeva gljivica (12,5-50 µl/ml,) (20). Duarte i sar. (31) su ispitivali antifungalno delovanje etarskog ulja 35 tradicionalno korišćenih brazilskih biljnih vrsta. Etarsko ulje 13 vrsta je inhibiralo rast standardnog soja *C. albicans* (MIK 250-2000 µg/ml). Najbolje delovanje su pokazala etarska ulja listova *Achillea millefolium* L., *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (Asteraceae) i *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) (MIK 250 µg/ml). U poređenju sa literaturnim podacima može se uočiti značajna antifungalna aktivnost etarskog ulja devesilja na pojedine ispitivane rezistentne izolate *C. albicans*.

Terpenska jedinjenja utiču na permeabilnost ćelijske membrane, kao i na biosintezu ergosterola, značajnog sastojka u ćelijskoj membrani gljivica. Posledično dolazi do poremećaja propustljivosti membrane, disbalansa kalcijumovih jona i narušene homeostaze. Silva i sar. (32) su uočili da etarsko ulje ploda korijandra (*Coriandrum sativum* L.) dovodi do poremećaja membranskog potencijala i integriteta ćelijske membrane soja *C. albicans*. Takođe, terpenska jedinjenja mogu uticati i na ushodnu ili nishodnu regulaciju transkripcije gena, što dovodi do poremećaja strukture membrane i onemogućene biosinteze ergosterola u ćelijama gljiva (33).

Zaključak

Etarska ulja korena, herbe i ploda devesilja, *S. rigidum* iz dve prirodne populacije ispoljila su značajnu antifungalnu aktivnost na pojedine izolate *C. albicans*. Najbolje

delovanje je pokazalo etarsko ulje korena iz obe populacije sa visokim sadržajem falkarinola. Dobijena aktivnost je najverovatnije posledica uticaja terpena na permeabilnost ćelijskog zida gljiva. Ovi rezultati su naročito značajni u odnosu na izraženu rezistenciju ispitivanih sojeva prema kontrolnim antimikoticima flukonazolu i amfotericinu B.

Zahvalnica

Rad je realizovan u okviru naučnog projekta 173021, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura:

1. Pfaller MA, Diekma DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:133-63.
2. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang C, Webster KM. Clinical characteristics of 2019 patients with candidemia: data from PATH Alliance Registry. *Clin Infect Dis.* 2009;48:1695-1703.
3. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. In: Lion T, editor. *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols. Methods Mol Biol*, vol 1508. New York: Humana Press; 2017.
4. Dignani MC. *Candida*. In: Anaisie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Clinical mycology* 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 2009.
5. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier Inc.; 2013. p. 605-83.
6. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis.* 2017;15:216(3):S445-51.
7. Gudlagsson O, Gillespie S, Lee K, Vandle Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekma D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003; 37:1172-77.
8. Ball PW. *Seseli* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, editors. *Flora Europaea*, Vol. III. London: Cambridge University Press; 1968. p. 334-338.
9. Nikolić V. *Apiaceae*; Rod *Seseli* L. In: Josifović M, editor. *Flora SR Srbije*, Vol. V. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti; 1973.

10. Barrero AJ, Herrador MM, Arteaga P. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Seseli varyedanum*. *Phytochemistry* 1994;37:1351-8.
11. Küpeli E, Tosun A, Yesilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Seseli* L. species (Apiaceae) growing in Turkey. *J Ethnopharmacol.* 2006;104:310-4.
12. Vučković I, Trajković V, Macura S, Tešević V, Janačković P, Milosavljević S. A novel cytotoxic lignan from *Seseli annuum* L. *Phytother Res.* 2007;21:790-2.
13. Tosun A, Akkol EK, Yeşilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of coumarins from *Seseli gummiferum* subsp. *corymbosum* (Apiaceae). *Z Naturforsch C* 2009;64(1-2):56-62.
14. Abbaskhan A, Choudhary MI, Ghayur MN, Parween Z, Shaheen F, Gilani AU *et al.* Biological activities of Indian celery, *Seseli diffusum* (Roxb. ex Sm.) Sant. & Wagh. *Phytother Res.* 2012;26:783-6.
15. Tosun A, Özkal N, Yildiz S. Antimicrobial activity screening of some *Seseli* L. species growing in Turkey. *J. Fac. Pharm, Ankara* 2004;33(3):151-5.
16. Gonçalves MJ, Tavares AC, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J *et al.* Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lánz from Portugal. *Ind Crops Prod.* 2012;39:204-9.
17. Stojkovic S, Petrovic S, Kukic J, Dzamic A, Ristic M, Milenkovic M *et al.* Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Seseli rigidum* flower essential oil. *Chem Nat Compd.* 2009;45:253-6.
18. Skalicka-Wozniak K, Los R, Glowniak K, Malm A. Comparison of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction techniques for antibacterial volatile compounds from the fruits of *Seseli libanotis*. *Nat Prod Commun* 2010;5:1427-30.
19. Marčetić M, Božić D, Milenković M, Lakušić B, Kovačević N. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of different parts of *Seseli rigidum*. *Nat Prod Commun.* 2012;7(8):1091-4.
20. Milosavljević S, Tešević V, Vučković I, Jadrantin M, Vajs V, Soković M *et al.* Composition and antifungal activity of the essential oil of *Seseli annuum* wild-growing in Serbia. *Fitoterapia* 2007;78:319-22.
21. Shahabipour S, Javidnia K, Firuzi O, Miri R. Chemical constituents and cytotoxic activity of the essential oil of *Libanotis transcaucasica* Schischk from Iran. *Res Pharm Sci* 2012; 7(5): S745.
22. European Pharmacopoeia, 9th Edition, Strasbourg: Council of Europe; 2016.
23. Živković L, Čabarkapa A, Marčetić M, Kovačević N, Bajić V, Jovičić S, Spremo-Potporević B. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic properties of essential oils of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) *Arch. Biol. Sci., Belgrade* 2016;68(1):135-44.
24. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI document M100-S17, ISBN 1-56238-625-5; 2017.
25. Marčetić DM, Lakušić SB, Lakušić VD, Kovačević NN. Variability of the Root Essential Oils of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) from Different Populations in Serbia. *Chem Biodivers.* 2013;10:1653-66.
26. Christensen L, Brandt K. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41:683-93.

27. Schinkovitz A, Stavri M, Gibbons S, Bucar F. Antimycobacterial polyacetylenes from *Levisticum officinale*. *Phytother Res.* 2008;22(5):681-4.
28. Christensen LP. Aliphatic C17-Polyacetylenes of the Falcarinol Type as Potential Health Promoting Compounds in Food Plants of the Apiaceae Family. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 2011;3:64-77.
29. Ma XH, Zheng CJ, Han LY, Xie B, Jia J, Cao ZW *et al.* Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. *Drug Discov Today* 2009;14:579-88.
30. Wagner H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 2011;82:34-7.
31. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97: 305-11.
32. Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonça DI, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 2011;19(1):42-7.
33. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* 2012;3:1-14.

Antifungal activity of the essential oil of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) on the growth of isolates of *Candida albicans*

**Mirjana D. Marčetić^{1*}, Dragana D. Božić², Marina T. Milenković²,
Mirjana M. Kovačević³, Nada N. Kovačević¹**

¹ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy,
Vojvode Stepe 450, Belgrade

² University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology and
Immunology, Vojvode Stepe 450, Belgrade

³ Beo-lab plus Laboratories, Resavska 58-60, Belgrade

*Correspondence author: Mirjana Marčetić, Tel. +381 11 3951 358,
e-mail: mirjana.marctic@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

The antimicrobial activity of the essential oils of root, aerial parts and fruit from two natural populations of *Seseli rigidum* was tested against 28 isolates of *Candida albicans* and one laboratory control strain of *C. albicans* ATCC 10259. Strains of *C. albicans* were isolated from oropharyngeal swabs, vaginal and/or cervical swabs, eye swabs, wound swabs, feces and urine.

The investigated strains showed high level of resistance towards the activity of control antimycotic agent fluconazole and to a lower extent towards amphotericin B. The *S. rigidum* essential oils, in the concentrations of 50-200 µg/ml, inhibited the growth of investigated strains (28.6-46.4% of tested strains). The essential oils of root from both localities showed antifungal effect at the concentration 50 µg/ml. The dominant compound in the root essential oils was faltarinol (57.5% and 88.8%). The lower activity was obtained with the essential oil of aerial parts or fruit. The 100 µg/ml of essential oil of aerial parts showed significant effect on *C. albicans* strains. The essential oil of fruit from population from Brdjanska gorge exerted somehow higher effect. It was characterised by higher α-pinene and β-phellandrene content and lower amount of sabinene.

The obtained results revealed the significant antifungal effects of *S. rigidum* root, aerial parts and fruit essential oils against resistant strains of *C. albicans*.

Keywords: antifungal activity, *Seseli rigidum*, essential oil, *Candida albicans*
