

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Ana B. Damjanović

***IN VITRO* ISPITIVANJE ANTITUMORSKE
I ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI
EKSTRAKATA MAHONIJE,
Mahonia aquifolium (Pursh) Nutt.**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Ana B. Damjanović

***IN VITRO* INVESTIGATION OF
ANTITUMOR AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITIES OF EXTRACTS OF
MAHONIA,
Mahonia aquifolium (Pursh) Nutt.**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR

dr sc. Jelena Antić Stanković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

MENTOR

dr sc. Tatjana Stanojković, viši naučni saradnik,
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

ČLAN KOMISIJE

dr sc. Gordana Zdunić, viši naučni saradnik,
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif
Pančić“

Datum odbrane : _____

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja eksperimentalne onkologije, u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije i na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta broj 175011 „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“ pod rukovodstvom dr sc. Zorice Juranić, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Ispitivani ekstrakti su dobijeni iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, a hemijski su okarakterisani u Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki profesorki Jeleni Antić Stanković, koja me je pre osam godina uvela u svet nauke, pomogla mi svojim znanjem i iskustvom, i pružila izuzetan intelektualni i naučni doprinos mojoj doktorskoj disertaciji. Takođe, zahvaljujem se i svojoj mentorki dr sc. Tatjani Stanojković, koja je uvek imala razumevanja za moja intresovanja, koja je podržala moje ideje i dala mi vredne savete kako prilikom mog laboratorijskog rada, tako i tokom pisanja disertacije. Posebno se zahvaljujem dr sc. Gordani Zdunić na divnoj saradnji koju smo imali, a za koju se iskreno nadam da će se nastaviti i u budućnosti, i na pomoći da ova doktorska disertacija bude još kvalitetnija. Za pomoć oko hemijske karakterizacije ekstrakata zahvaljujem se dr sc. Dejanu Gođevcu i svim njegovim saradnicima. Od srca se zahvaljujem i dr sc. Zorici Juranić, mom prvom šefu, koja je verovala u mene, omogućila mi da radim na njenom projektu i budem deo njenog divnog tima.

Zahvaljujem se i kolegama iz Laboratorije za modifikatore biološkog odgovora, dr sc. Željku Žižak, dr sc. Irini Besu Žižak, dr sc. Nini Petrović i Nađi Grozdanić na saradnji koju smo imali svih ovih godina. Posebnu zahvalnost dugujem laboratorijskom tehničaru Tatjani Petrović za sve sate koje je provela uz mene nesebično me učeći radu u laboratoriji i na ogromnoj pomoći prilikom mog eksperimentalnog rada na ovoj disertaciji.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, koji su mi omogućili da se školujem i da se razvijam. Zahvaljujem se Nikoli na podršci i razumevanju. Zahvaljujem se svojoj najvoljenijoj Mini za osmeh koji mi je dao snagu da istrajem.

A posebno se zahvaljujem divnim ljudima, doktorima nauka i naučnicama, koje su sa mnom svih ovih godina delile i dobro i zlo. Dr sc. Ani Krivokući hvala za pomoć oko analize genske ekspresije, koja je bila bitan deo moje disertacije, i još veće hvala za to što mi je bila perpetuum mobile dobre energije, koja me je terala da idem dalje. Hvala mom najdivnijem šefu dr sc. Ivani Matić što me je naučila kako se bavi naukom i što mi je bila od neizmerne pomoći prilikom mog laboratorijskog rada. Hvala Milici Nedeljković za pomoć oko tehničkog dela prilikom pisanja i sređivanja moje disertacije, i hvala za predivni, kreativni svet koji nosi u sebi, a koji je podelila sa mnom i njime mi ulepšala svaki moj dan. Mojoj najdražoj dr sc. Branki Kolundžiji hvala što me je naučila da volim nauku, da istražujem i da se pitam. Hvala joj što mi je pomogla da uobličim svoje ideje i da ih ostvarim kroz svoj rad. I hvala mojoj dr sc. Mariji Đorđić Crnogorac za pruženu ruku svaki put kada sam pala. Devojke, hvala vam što me nikada niste pustile da budem sama u poslu i u životu. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem vama.

Za Zabavište...

„*In vitro* ispitivanje antitumorske i antimikrobne aktivnosti ekstrakata mahonije, *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.“

Rezime

Na osnovu podataka o upotrebi vrste *Mahonia aquifolium* u tradicionalnoj medicini definisan je cilj našeg istraživanja, ispitivanje antitumorske i antimikrobne aktivnosti ekstrakata kore mahonije.

Ispitivanjem citotoksičnosti vodenog i etanolnog ekstrakta na humanim malignim ćelijskim linijama je dokazano da ekstrakti imaju selektivnu citotoksičnu aktivnost, a najviši intenzitet dejstva su pokazali na HeLa ćelijama adenokarcinoma cerviksa. Fluorescentnom mikroskopijom i analizom faza ćelijskog ciklusa je pokazano da ekstrakti indukuju apoptozu u HeLa ćelijama. Primenom inhibitora kaspaza pokazano je da ekstrakti indukuju apoptozu preko spoljašnjeg puta aktivacije. Ispitivanja na endotelijalnim EA.hy926 ćelijama pokazala su antiangiogenetski i antimigratorni efekat ekstrakata.

Primena tretmana doksorubicin/ekstrakt ukazala je na izraženo sinergističko dejstvo ekstrakta sa doksorubicinom na A549 ćelijama karcinoma pluća. Ekstrakti povećavaju zadržavanje leka u ćeliji i pojačavaju efekat doksorubicina na smanjenje migracije A549 ćelija i njihovo grupisanje u kolonije. Antimetastatski potencijal kombinacije doksorubicin/ekstrakt potvrđen je analizom ekspresije gena odgovornih za invazivnost.

Oba ekstrakta ispoljavaju antimikrobni efekat, koji je najizraženiji na bakterijskoj vrsti *Staphylococcus aureus*. Ekstrakti dovode do smanjenja produkcije biofilma i glikokaliksa. Sa antibioticima i antimikoticima ekstrakti su delovali sinergistički.

Hemijskom analizom potvrđeno je da su za aktivnost ekstrakata *M. aquifolium* odgovorni alkaloidi tipa berberina. Na intenzitet citotoksičnosti najviše utiču berberin, palmatin i berbamin.

Rezultati su pokazali da *M. aquifolium* može naći svoje mesto u terapiji malignih ili infektivnih oboljenja, pojedinačno i u kombinaciji sa postojećim lekovima.

Ključne reči: *Mahonia aquifolium*, citotoksičnost, apoptoza, invazivnost, antimikrobni efekat, glikokaliks, biofilm, alkaloidi tipa berberina.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska mikrobiologija; Eksperimentalna onkologija

UDK broj: 579.61:[582.675.3:616-092.4(043.3)]

***“In vitro* investigation of antitumor and antimicrobial activities of extracts of mahonia, *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.”**

Abstract

The goal of our research was investigation of antitumor and antimicrobial activities of *Mahonia aquifolium* extracts and it was based on its use in traditional medicine. Water and ethanol extract exerted selective cytotoxic activity on examined malignant cell lines, and the best activity was observed against cervical adenocarcinoma, HeLa, cells. Fluorescence microscopy and cell cycle analysis showed that both extracts induce apoptosis in HeLa cells. Experiments with caspase inhibitors showed that extracts induce a caspase-dependent apoptosis through extrinsic pathway. Both extracts inhibit the migration of EA.hy926 cells, and exerted anti-angiogenic effect.

The investigation of the doxorubicin/extract treatment showed synergistic effect of extracts with doxorubicin against lung carcinoma A549, cells. Extracts were shown to prolong doxorubicin retention time in A549 cells. A549 cells treated with doxorubicin/extract were shown to have lower migratory and colony formation potentials than the cells treated with doxorubicin alone. Antimetastatic effect of the treatment was confirmed with analysis of expression of genes responsible for malignant cells invasiveness.

Extracts exerted antimicrobial effect. The best effect was observed against *Staphylococcus aureus*. Extracts showed potential to inhibit production of biofilm and glycocalyx. The use of extracts with antibiotics and antimycotics showed synergistic effect.

Chemical analysis confirmed that berberine type alkaloids are the most responsible for activities of *M. aquifolium*. The compounds with the highest cytotoxic activity are: berberine, palmatine, and berbamine.

The results of our research suggested that *M. aquifolium* may be used in therapy of malignant or infective diseases, alone or in combination with other drugs.

Keywords: *Mahonia aquifolium*, cytotoxicity, apoptosis, invasiveness, antimicrobial effect, glycocalyx, biofilm, berberine type alkaloids.

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical microbiology; Experimental oncology

UDC number: 579.61:[582.675.3:616-092.4(043.3)]

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Upotreba biljaka u savremenoj medicini.....	1
1.2. Rod <i>Mahonia</i>	4
1.2.1. Opis i rasprostranjenost vrsta roda <i>Mahonia</i>	4
1.2.2. Hemijski sastav vrsta roda <i>Mahonia</i>	4
1.2.3. Pregled poznatih farmakoloških dejstava i aktivnosti vrsta roda <i>Mahonia</i> u tradicionalnoj medicini.....	7
1.3. <i>Mahonia aquifolium</i>	9
1.3.1. Opis i rasprostranjenost vrste <i>M. aquifolium</i>	9
1.3.2. Pregled poznatih farmakoloških dejstava i aktivnosti vrste <i>M. aquifolium</i> u tradicionalnoj medicini.....	9
1.4. Alkaloidi izolovani iz vrsta roda <i>Mahonia</i> i njihovi farmakološki efekti	12
1.5. Antitumorski potencijal biljne vrste <i>M. aquifolium</i>	16
1.5.1. Kombinovani tretman ekstrakata vrste <i>M. aquifolium</i> i doksorubicina	17
1.6. Antimikrobna aktivnost biljne vrste <i>M. aquifolium</i>	18
1.6.1. Antibiotici i interakcija sa ekstraktima biljne vrste <i>M. aquifolium</i>	22
2. Ciljevi istraživanja	23
3. Materijal i metode	25
3.1. Ekstrakti biljne vrste <i>M. aquifolium</i>	25
3.2. Hemijska karakterizacija biljnih ekstrakata	26
3.2.1. HPLC-MS analiza	26
3.2.2. NMR spektroskopija	27
3.3. Ćelijske linije	27
3.4. Ispitivanje citotoksične aktivnosti <i>in vitro</i>	28
3.4.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata <i>M. aquifolium</i> na odabranim ćelijskim linijama.....	28
3.4.2. Ispitivanje citotoksične aktivnosti doksorubicina i ekstrakata <i>M. aquifolium</i> na A549 ćelijskoj liniji.....	29
3.4.3. Određivanje preživljavanja ćelija.....	29
3.4.4. Evaluiranje interakcije izoblografičkom analizom.....	30
3.5. Određivanje tipa ćelijske smrti.....	31
3.6. Analiza ćelijskog ciklusa.....	32

3.6.1. Uticaj ekstrakata <i>M. aquifolium</i> na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.....	32
3.6.2. Uticaj doksorubicina i kombinovanog doksorubicin/ekstarkt tretmana na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	32
3.7. Određivanje ciljnih kaspaza	33
3.8. Analiza uticaja ekstrakata na sposobnost malignih ćelija za preuzimanje i zadržavanje doksorubicina, <i>in vitro</i>	34
3.9. Analiza migracije ćelija – <i>in vitro</i> "scratch"esej	34
3.9.1. Uticaj ekstrakata <i>M. aquifolium</i> na migraciju EA.hy926 ćelija.....	34
3.9.2. Uticaj doksorubicina i kombinovanog doksorubicin/ekstrakt tretmana na migraciju A549 ćelija, <i>in vitro</i>	35
3.10. Određivanje uticaja ekstrakata na proces angiogeneze <i>in vitro</i> : " <i>endothelial cell tube formation</i> " esej	35
3.11. Određivanje uticaja ekstrakata vrste <i>M. aquifolium</i> , doksorubicina i kombinovanog doksorubicin/ekstrakt tretmana na sposobnost ćelija da formiraju kolonije <i>in vitro</i> : " <i>colony formation assay</i> "	36
3.12. Analiza ekspresije seta gena u A549 ćelijama tretiranim ekstraktima, doksorubicinom i kombinovanim tretmanom	36
3.13. Ispitivanje antimikrobnog efekta ekstrakata, <i>in vitro</i>	37
3.14. Ispitivanje uticaja ekstrakata na produkciju glikokaliksa.....	38
3.14.1. Kongo-crveno agar metoda	38
3.14.2. Christensenov metod.....	39
3.15. Ispitivanje uticaja ekstrakata na produkciju biofilma.....	39
3.16. Ispitivanje efekata kombinovane primene ekstrakata i antibiotika/antimikotika sa različitim mehanizmom delovanja	40
4. Rezultati	41
4.1. Hemijska karakterizacija ekstrakata vrste <i>M. aquifolium</i>	41
4.2. Citotoksična aktivnost ekstrakata <i>M. aquifolium</i> , <i>in vitro</i>	47
4.3. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti indukovane ekstraktima <i>M. aquifolium</i>	50
4.4. Analiza ćelijskog ciklusa.....	52
4.5. Određivanje ciljnih kaspaza	54
4.6. Efekat ekstrakata na proces migracije ćelija	56
4.7. Efekat ekstrakata na proces angiogeneze	58
4.8. Efekat ekstrakata na citotoksičnu aktivnost doksorubicina, <i>in vitro</i>	59
4.9. Analiza ćelijskog ciklusa A549 ćelija nakon doksorubicin/ekstrakt tretmana.....	61
4.10. Uticaj ekstrakata na preuzimanje i zadržavanje doksorubicina.....	63
4.11. Uticaj kombinovanog tretmana doksorubicin/ekstrakt na migraciju ćelija.....	65

4.12. Uticaj ekstrakata i doksorubicina na formiranje ćelijskih kolonija	67
4.13. Analiza genske ekspresije A549 ćelija	69
4.14. Efekat ispitivanih ekstrakata na osetljivost mikroorganizama	71
4.15. Efekat ekstrakata na produkciju biofilma.....	72
4.16. Efekat ekstrakata na produkciju glikokaliksa.....	73
4.17. Efekat istovremene primene ekstrakata i antibiotika/antimikotika	75
5. Diskusija.....	77
6. Zaključak	95
7. Literatura.....	96
8. Prilozi	117

1. Uvod

1.1. Upotreba biljaka u savremenoj medicini

Upotreba biljaka u medicinske svrhe oduvek je prisutna kod ljudi. Već hiljadama godina, postepeno se otkrivaju različiti efekti biljaka i njihovih aktivnih principa. Danas, prirodni proizvodi dobijeni iz biljaka, predstavljaju dobar izvor novih lekova i drugih farmaceutskih proizvoda (Abelson, 1990). Da bi proces otkrivanja novih lekova bio što uspešniji, poseban značaj se pridaje etnobotaničkom pristupu, u okviru koga se prikupljaju saznanja o svim biljkama jednog regiona, kao i o njihovoj tradicionalnoj upotrebi u kulturi lokalnog stanovništva (Prance i sar., 1994). Od devedesetih godina prošlog veka na farmaceutskom tržištu sve više raste udeo lekova dobijenih od prirodnih proizvoda ili njihovih derivata. Ovo se posebno odnosi na preparate sa antikancerogenim ili antiinflamatornim delovanjem (Cragg i sar., 1997; Farnsworth i Soejarto, 1985; O'Neill i Lewis, 1993). Iako su se u početku prirodni proizvodi uglavnom ispitivali zbog svog potencijalnog antimikrobnog dejstva, u poslednje vreme istraživanja efekata biljnih vrsta obuhvataju širok spektar različitih oboljenja (Rosenthal, 1997).

Najpoznatiji prirodni proizvod koji deluje antiparazitno, a dobijen je iz biljnog izvora je kinin. Salicilna kiselina (izolovana 1876. godine) se danas koristi kao acetilsalicilna kiselina, poznatija kao aspirin, i najrasprostranjeniji je antiinflamatorni lek u svetu. Pored svog primarnog efekta aspirin je pokazao pozitivna dejstva na kardiovaskularni sistem, a pored njega i drugi lekovi koji su poreklom prirodni proizvodi kao što su kardiotionični glikozidi (digitoksin i digoksin) se korise u tretiranju kardiovaskularnih oboljenja. Opijum dobijen zasecanjem zelenih čaura maka (*Papaver somniferum*) i njegovi sastojci odavno su poznati kao dobri analgetici i neki od njih su i danas u upotrebi.

Najveći broj lekova koji se koriste u tretmanu astme svakako potiču od efedrina i njegovih derivata koji su izolovani iz biljaka. Poznate su i brojne prirodne supstance

koje se koriste u tretiranju različitih poremećaja gastrointestinalnog trakta i reproduktivnog sistema (Grossetti, 2017).

Antikancerski potencijal supstanci biljnog porekla zasniva se na mogućnosti redukcije slobodnih radikala, regulaciji enzima koji učestvuju u kancerogenezi, inhibicije inflamatornih citokina, regulacije faktora rasta i molekula signalnih puteva koji učestvuju u rastu, proliferaciji i apoptozi ćelije. Takođe, ovi prirodni proizvodi mogu uticati i na proces angiogeneze, invazije i metastaze malignih ćelija (Amin i sar., 2009; Mehta i sar., 2010; Neergheen i sar., 2010; Surh, 2003).

Prve pronađene prirodne supstance sa antikancerskim dejstvom bile su vinkristin i vinblastin, izolovani iz biljke *Vinca rosea*. Ekstrakcijom lišća ove biljke izolovano je čak trideset alkaloida, od kojih su dva navedena pokazala najbolji efekat (Johnson i sar., 1963). Danas se oba alkaloida primenjuju u lečenju širokog spektra različitih maligniteta, kao što su: Hočkinov i non-Hočkinov limfom, akutna leukemija, kancer dojke, kancer testisa itd. Vinkristin i vinblastin su poslužili i za sintezu polusintetskih vinka alkaloida vinorelbina i vinflunina, koji se koriste u tretiranju nesitnoćelijskog kancera pluća i metastatskog kancera dojke (Duflos i sar., 2002).

Sedamdesetih godina prošlog veka iz biljke *Taxus brevifolia*, u narodu poznatija kao tisa, izolovan je diterpenoid taksol, kasnije nazvan paklitaksel (Wani i sar., 1971). Da ne bi došlo do izumiranja ove biljke zbog izolovanja neophodnih količina taksola, devedesetih godina prošlog veka patentiran je proces njegove polusinteze, a licenca je pripala kompaniji Bristol Myers Squibb (Holton i sar., 1994; Holton i sar. 1994). Danas se taksol koristi u lečenju kancera dojke i jajnika, Karpošijevog sarkoma i nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Jedan od prvih sintetisanih polusintetskih taksana bio je docetaksel. Docetaksel se danas koristi u terapiji uznapredovalih kancera dojke, stomaka, pluća, prostate i skvamoznog ćelijskog karcinoma glave i vrata (Yared i sar., 2012). Druga generacija taksana sintetisana je sa ciljem da se poveća njihova efikasnost i selektivnost, a pre svega da im se smanji toksičnost. Najpoznatiji među njima su *Nab-paklitaksel* i *kabazitaksel* (Yared i sar., 2012).

Biljke *Podophyllum peltatum* i *Podophyllum emodi* hiljadama godina su se koristile u tradicionalnoj medicini različitih naroda. Iako je iz njih izolovani podofilotoksin pokazao dobar antitumorski efekat, klinička ispitivanja su pokazala njegovu izraziti toksičnost (Damayanthi i sar., 1998; Greenspan i sar., 1950; Imbert i sar., 1998; Leiter i

sar., 1950). Zato je podofilotoksin poslužio za sintezu drugih antitumorskih agenasa, kao što su etopozid i tenipozid (Hande, 1998). Danas se ova dva polusintetska derivata podofilotoksina koriste u lečenju karcinoma testisa, sitnoćelijskog i nesitnoćelijskog karcinoma pluća, limfoma, leukemija, karcinoma jajnika i neuroblastoma i malignih tumora centralnog nervnog sistema (Hande, 2008; Hartmann i sar., 2006).

Prirodni proizvod kamptotecin izolovan je iz kore drveta *Camptotheca acuminata*. Iako je pokazao dobra antitumorska svojstva, u prekliničkim i kliničkim ispitivanjima ispoljio je toksičnost, lošu rastvorljivost i hidrolizu u fiziološkim uslovima, što je onemogućilo njegovu dalju primenu u terapiji (Wall i sar., 1966). Ipak ovaj proizvod je, kao i podofilotoksin, poslužio za sintezu drugih polusintetskih kamptotecina, od kojih su najpoznatiji irinotekan i topotekan. Ovi kamptotecini se koriste u lečenju metastatskog kolorektalnog kancera, kao i kancera grlića materice, jajnika i pluća (Venditto i sar., 2010).

Biljke koje su se u tradicionalnoj medicini koristile za lečenje dijareje, infektivnih rana ili stanja izazvanih parazitima jasno je da poseduju antimikrobni potencijal. Postavlja se pitanje kako pretpostaviti da neka biljka ima antikancerski potencijal, odnosno kako se u tradicionalnoj medicini postavljala dijagnoza kancera (Taylor i sar., 2014). Znaci akutne inflamacije kao što su bol (lat. *dolor*), toplota (lat. *calor*), crvenilo (lat. *rubor*) i otok (lat. *tumor*) su u tradicionalnoj medicini tretirane antitumorskom terapijom, koja bi danas mogla da se nazove i antiinflamatorna terapija (Taylor i sar., 2014). Takođe uloga hronične inflamacije u kanceru je dobro poznata (Coussens i Werb, 2002; Mantovani i sar., 2008). Jedna od važnih veza između ova dva stanja je transkripcioni nuklearni faktor κ B (NF- κ B) (Li i sar., 2005), koji je predložen i kao potencijalna meta kako u lečenju kancera, tako i u lečenju ostalih dijagnoza u čijoj je osnovi inflamacija (Bremner i Heinrich, 2002). Od svih do sada ispitanih biljaka koje bi mogle svoju ulogu naći u terapiji kancera, skoro polovima njih (45%) ima i izraženi antiinflamatorni efekat. Zato se u gotovo svim novijim istraživanjama biljke koje su u tradicionalnoj medicine korišćene za tretiranje zapaljenskih procesa posmatraju kao potencijalni izvori novih antikancerskih agenasa (Heinrich i Bremner, 2005).

1.2. Rod *Mahonia*

1.2.1. Opis i rasprostranjenost vrsta roda *Mahonia*

Rod *Mahonia* je drugi po veličini rod familije *Berberidaceae*. Obuhvata oko 60 različitih vrsta, od kojih se više od polovine nalazi u južnoj i istočnoj Aziji, dok se ostale vrste nalaze u zapadnom delu Severne, Centralne i Južne Amerike. Najveći broj vrsta (35) pronađen je na teritoriji Kine. Predstavnici ovog roda su zimzeleno žbunje ili nisko drveće (do 3m), sa izrazito žutim cvetovima i plodovima u formi plavičastih ili crnih bobica sa 1-7 semena (He i Mu, 2015) (Slika 1).



Slika 1 Predstavnici roda *Mahonia*, vrste *Mahonia oiwakensis* i *Mahonia balei*.

[crugfarm.co.uk/Content/Plants/Mahonia\(Berberidaceae\).htm](http://crugfarm.co.uk/Content/Plants/Mahonia(Berberidaceae).htm); alabamaplants.com/Yellowalt/Mahonia_bealei_page.html

1.2.2. Hemijski sastav vrsta roda *Mahonia*

Glavna grupa sekundarnih metabolita vrsta koje pripadaju rodu *Mahonia* su alkaloidi. Pretpostavlja se da su upravo alkaloidi najodgovorniji za većinu efekata koje ispoljavaju ove biljke (He i Mu, 2015).

Protoberbeinski alkaloidi

Protoberberinski alkaloidi spadaju u derivate tirozina (Slika 2A). U biljkama se obično nalaze u formi protoberberinskih soli, dihidroprotoberberina, tetrahydroberberinskih ili oksoberberinskih derivata. Alkaloid berberin je najrasprostranjeniji alkaloid u vrstama roda *Mahonia*. Ostali češće zastupljeni alkaloidi su palmatin, jatrorizin, kolumbamin i koptizin (Gu i Jiang, 2005; Lv i sar., 1999).

Bisbenzilzohinolinski alkaloidi

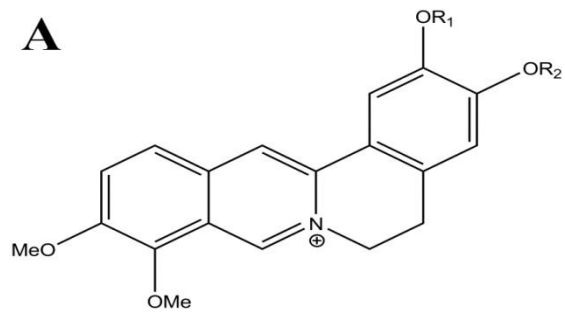
Ovi alkaloidi su sastavljeni od 2 benzilzohinolinske jedinice povezane difenil etarskom vezom (Slika 2B). Najpoznatiji izolovani alkaloidi ove grupe su: izotetrandrin, talrugozin, berbamin, oksikantin, homoarmolin i *O*-metilpunjabin (Mai i sar., 2009).

Aporfinski alkaloidi

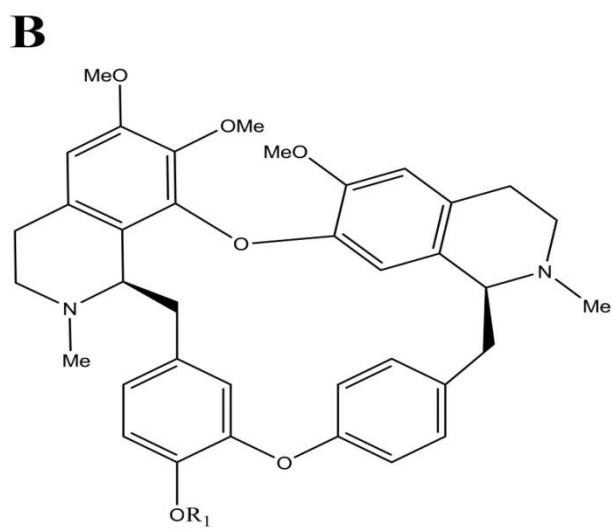
Hidroksi (-OH) i metoksi (-OCH₃) grupe su prisutne u ovim alkaloidima najčešće na položajima C-1, -2, -9, -10 i -11 (Slika 2C). Iz biljaka roda *Mahonia* izolovano je nekoliko aporfina: magnoflorin, izokoridin, koridin, izotebamin i taliporfin (Slavik i sar., 1985; Sotnikova i sar., 1997; Suess i Stermitz, 1981).

Etarska ulja izolovana su iz manje poznatih vrsta kao što su *M. duclouxiana* i *M. bodinieri*. Hemijskom analizom u uzorcima ulja detektovano je oko 50 različitih komponenata od čega je oko 40 njih identifikovano i među njima su dominantno bili zastupljeni 4-terpenol, alifatični ugljeni hidrati, estri i n-heksadekanska kiselina (Liu i sar., 2010; Lu i sar., 2009).

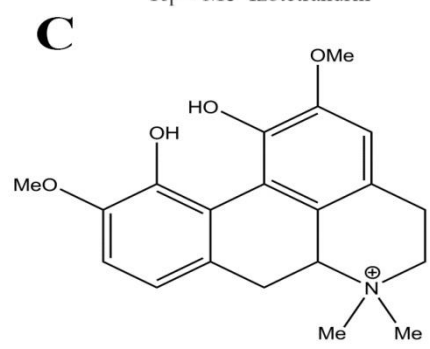
Jedinjenja kao što su steroli, benzohinoni i lignani su takođe komponente biljaka roda *Mahonia* i do sada su nađeni u vrstama *M. balei*, *M. eurybracteata*, *M. duclouxiana* itd.



$R_1 = \text{Me}$ $R_2 = \text{Me}$ Palmatin
 $R_1, R_2 = -\text{CH}_2-$ Berberin
 $R_1 = \text{Me}$ $R_2 = \text{H}$ Jatrorizin



$R_1 = \text{H}$ Berbamin
 $R_1 = \text{Me}$ Izotetrandrin



Magnoflorin

Slika 2 Alkaloidi, sekundarni metaboliti vrsta roda *Mahonia*. **A** Protoberberinski alkaloidi; **B** Bisbenzilzohinolinski alkaloidi; **C** Aporfinski alkaloidi

1.2.3. Pregled poznatih farmakoloških dejstava i aktivnosti vrsta roda *Mahonia* u tradicionalnoj medicini

Biljke roda *Mahonia* su i dalje izuzetno zastupljene u tradicionalnoj kineskoj medicini, a njihova lekovita svojstva i upotreba u lečenju opisani su i u kineskoj farmakopeji (*Chinese Pharmacopoeias*). Generalno, u tradicionalnoj kineskoj medicini efekti biljaka iz roda *Mahonia* opisani su kao: smanjenje unutrašnje toplote, eliminisanje vlažnosti, uklanjanje toksina, suzbijanje bola, pospešivanje cirkulacije, inhibiranje kašlja i ublažavanje upale (He i Mu, 2015). U američkoj narodnoj medicini vrste roda *Mahonia* uglavnom su koristili Navaho Indijanci kao emetike, preparate za lečenje dijareje ili protivotrove kod uboda škorpiona (Suess i Stermitz, 1981). Na osnovu tradicionalne upotrebe pre svega u Kini, u poslednjih deset godina raste broj fitohemijskih studija koje ispituju karakteristike različitih vrsta ovoga roda. Rezultati pokazuju da i pojedinačne supstance i ekstrakti pojedinih predstavnika roda imaju potencijala da nađu primenu u cilju poboljšanja i očuvanja zdravlja ljudi. Savremene studije kao glavne farmakološke karakteristike biljaka ovoga roda ističu: antimikrobne, antiinflamatorne, hepatoprotektivne, antitumorske, antioksidativne i analgetičke efekte.

Antimikrobni potencijal pripadnika ovog roda je odavno poznat, jer su se vrste *M. balei* i *M. fortunei* kao sastojci jednog preparata koristili za tretiranje bakterijskih infekcija u stanjima kao što su periodontitis, faringolaringitis, ekcem i rane. Studije su pokazale da ekstrakti obe biljke inhibiraju rast bakterija kao što su: *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*. Jači antimikrobni potencijal pokazali su ekstrakti pripremljeni od stabljika nego oni prepremljeni od listova biljaka (Li i sar., 2007). Ekstrakt korena vrste *M. balei* u eksperimentima sa embrionima inhibirao je proliferaciju influence virusa AI, bez neželjenih efekata na same embrione (Zeng i sar., 2003). U kliničkim studijama preparati vrste *M. balei* korišćeni su u lečenju 500 pacijenata sa dizenterijom, gde su pokazali da mogu dovesti do skraćenja procesa izlečenja (Zhao i sar., 1991). Takođe preparati ove biljke u kombinaciji sa azitromicinom poboljšali su procenat izlečenja (91.4%) pneumonie kod dece izazvane mikoplazmom, u odnosu na procenat izlečenja terapijom koja uključuje samo azitromicin (62.2%) (Yao i sar., 2010). Bitno je naglasiti da u dosadašnjim studijama o vrsti *M. balei* i drugim preparatima kineske tradicionalne medicine u čiji sastav ulaze

vrste roda *Mahonia* nisu registrovane bilo kakve patološke promene povezane sa preparatima nakon njihove aplikacije (Guan, 2013; Zhang, 1998).

U poslednjih nekoliko decenija savremena istraživanja biljaka roda *Mahonia* usmerena su u pravcu ispitivanja njihovog citotoksičnog, antiproliferativnog i proapoptotskog dejstva, odnosno njihovih antikancerskih svojstava. Vodeni ekstrakt listova vrste *M. balei* značajno dozno zavisno inhibira rast ćelija humanog kancera kolona (HT-29), povećava procenat ćelija koje su u apoptozi i smanjuje ekspresiju gena odgovornih za preživljavanje (Hu i sar., 2011). Etanolni ekstrakt vrste *M. oiwakensis* inhibira rast ćelija humanog kancera pluća (A549) *in vitro* i *in vivo* kod miševa, indukujući u oba slučaja proces apoptoze (Wong i sar., 2009). Pored direktnog uticaja na preživljavanje ćelija kancera biljke roda *Mahonia* pokazale su i protektivnu ulogu u procesu nastajanja ili daljeg razvoja ove bolesti. Tako su studije polazale da u *in vitro* uslovima vodeni i etanolni ekstrakti vrste *M. balei*, kao i ekstrakti vrste *M. fortunei* neutrališu slobodne radikale i štite proteine od oštećenja izazvanih oksidacijom (Hu i sar., 2011; Yu i Xiong, 2007; Zhang i sar., 2011). U *in vivo* studijama njihov antioksidativni efekat je takođe potvrđen, biljke su povećavale sadržaj superoksid dismutaze (SOD) i smanjivale produkte lipidne peroksidaze u mišijem serumu (Yu i sar., 2008). Etanolni ekstrakt vrste *M. oiwakensis* pokazao je i sposobnost da kontroliše aktivnost oksidativnih enzima jetre, i posledično smanjuje sadržaj malondialdehida (MDA) i azot monooksida (NO). Na taj način pokazano je da ekstrakt ove biljke može delovati i hepatoprotektivno (Chao i sar., 2013).

Iako se u poslednjih nekoliko godina povećao broj farmakoloških studija koje ispituju vrste roda *Mahonia* i njihove metabolite, većina njih je još uvek fokusirana na mali broj biljaka ovog roda, dok o ostalima nemamo dovoljno podataka i one još uvek čekaju da budu istražene. Ovo je posebno značajno u oblasti onkologije, gde se većina bolesti ne može trajno izlečiti sadašnjom terapijom i otkrivanje novih agenasa predstavlja glavni cilj većine istraživanja.

1.3. Mahonia aquifolium

1.3.1. Opis i rasprostranjenost vrste *M. aquifolium*

M. aquifolium je jedna od najrasprostranjenijih vrsta roda *Mahonia*. Spada u zimzeleno, ukrasno žbunje visine do 1 m i širine do 1,5 m, sa nazubljenim, sjajnozelenim listovima do 25 cm i cvetovima grupisanim u guste klastere, žute boje, koji cvetaju u rano proleće, a nakon toga se pojavljuju tamno plave do crne bobice (Slika 3).



Slika 3 Biljna vrsta *Mahonia aquifolium*. portlandnursery.com

M. aquifolium potiče iz zapadnog dela Severne Amerike, međutim danas je zbog svog zanimljivog izgleda, dobrog podnošenja letnjih suša i lošeg zemljišta široko rasprostranjena, pre svega kao ukrasna biljka (He i Mu, 2015).

1.3.2. Pregled poznatih farmakoloških dejstava i aktivnosti vrste *M. aquifolium* u tradicionalnoj medicini

U narodnoj medicini indijanskih plemena ova biljka se koristila u lečenju groznice, dijareje, dispepsije, gihta, reumatskih oboljenja, bolesti bubrega i žuči i hroničnih, relapsirajućih dermatoza (Gieler i sar., 1995). U Nemačkoj gotovo sve studije koje su se

bavile ispitivanjem ovog roda fokusirale su se pre svega na ispitivanje vrste *M. aquifolium*. Neke od prvih sprovedenih studija pokazale su da ova biljka može dati dobre rezultate u tretiranju psorijaze (Gieler, 1993; Wiesenauer, 1992). Kasnije studije su uglavnom dolazile do sličnog zaključka, u kome se potvrđuje da ova vrsta može dati pozitivne rezultate kod pacijenata sa slabijom ili srednjom formom psorijaze (Gieler i sar., 1995; Gulliver i Donsky, 2005; Mueller i Ziereis, 1994; Wiesenauer i Ludtke, 1996). Smatra se da ovaj efekat biljka ostvaruje inhibicijom hiperproliferacije keratinocita i uticajem na faktore zapaljenja (Augustin i sar., 1999; Galle i sar., 1994; Mueller i sar., 1995). *M. aquifolium* je svoju upotrebu našla i u homeopatskim preparatima za tretiranje psorijaze (engl. *German Homoeopathic Pharmacopeia*; Gieler i sar., 1995).

Imajući u vidu da se u narodnoj medicini vrsta *M. aquifolium* pre svega koristila u stanjima koja su izazvana infekcijama ili praćena zapaljenjima, sve studije su do sada ispitivale efekte ekstrakata ove biljke i njihove pojedinačne aktivne principe na produkciju i sintezu faktora zapaljenja, na aktivnost komponenata imunog sistema i na preživljavanje određenih mikroorganizama.

U jednoj od prvih studija koja je ispitivala efekte ekstrakta *M. aquifolium* došlo se do zaključka da alkoholni ekstrakt *in vitro* inhibira dva ključna enzima u sintezi arahidonske kiseline, ciklooksigenazu (CO) i lipooksigenazu-5 (5-LO), i da deluje imunostimulišuće na fagocite (Galle i sar., 1994). Nakon toga istraživanja su pokazala da ekstrakt vrste *M. aquifolium* i njegovi pojedinačni alkaloidi inhibiraju proliferaciju brzodelećih humanih keratinocita (HaCaT) (Muller i sar., 1994).

Alkaloidi izolovani iz vrste *M. aquifolium* berbamin, oksikantin, korituberin, kolumbamin i akvafolin pokazali su se kao dobri inhibitori lipooksigenaze koja je bitna u procesu razvoja psorijaze, dok je efekat berberina i magnoflorina bio nešto slabiji (Bezakova i sar., 1996, Misik i sar., 1995, Rackova i sar., 2007).

Takođe, ispitivan je uticaj ekstrakta kore vrste *M. aquifolium* na produkciju interleukina-8 (IL-8) od strane humanih monocita (THP-1) i utvrđeno je da ekstrakt ihibira produkciju ovog faktora inflamacije. Poznato je da povećana koncentracija (IL-8) u koži može dovesti do hiperproliferacije u epidermu i infiltracije i akumulacije neutrofila, što dovodi do stvaranja mikroabscesa, koji između ostalog imaju značaj i u patogenezi psorijaze (Košťalova i sar., 2001).

Kliničke studije koje su ispitivale uticaj topikalno primenjenih preparata vrste *M. aquifolium* na molekulske markere koji su bitni u imunskom odgovoru i proliferaciji keratinocita kod pacijenata sa psorijazom, došli su do zaključka da ovi preparati smanjuju ekspresiju adhezivnog molekula ICAM-1 kod keratinocita, CD3 molekula i T limfocita, HLA-DR molekula u dermalnim infiltratima, i molekula keratinocit 6 i 16 čime indirektno suprimira proliferaciju keratinocita (Augustin i sar., 1999).

Istraživanje koje se bavilo ispitivanjem alkaloida izolovanih iz vrste *M. aquifolium* (berberin, jatrorizin i magnoflorin) pokazalo je da svi imaju antioksidativnu aktivnost i sposobnost da neutrališu slobodne radikale (Rackova i sar., 2004). U neutralisanju slobodnih radikala najbolju aktivnost je pokazao magnoflorin, dok je berberin pokazao samo neznatnu aktivnost. Sličan rezultat dobijen je i pri ispitivanju antioksidativnih karakteristika. Dobri rezultati magnoflorina i jatrorizina se pripisuju njihovim molekulskim strukturama, odnosno prisustvu slobodnih fenolnih grupa na molekulskom skeletu (Rackova i sar., 2004). Pored ovih alkaloida i berbamin i oksikantin izolovani iz vrste *M. aquifolium* imaju sposobnost da neutrališu slobodne radikale (Muller i Zierys 1994).

Takođe istraživanja na izolovanim alkaloidima etanolnog ekstrakta kore *M. aquifolium* protoberberina, berberina i jatrorizina pokazala su da sva tri alkaloida imaju antimutagenu aktivnost koja je najizraženija kod berberina (Cernakova i sar., 2002). Alkaloidi su pokazali sposobnost da inhibiraju proces mutageneze indukovanoj oranzom u hloroplastima eukariotskog modela *Euglena gracilis*, a ovaj podatak sugerise potencijalnu hemopreventivnu ulogu alkaloida na efekte različitih hemijskih kancerogena.

Ispitivanja su pokazala da alkoholni ekstrakt vrste *M. aquifolium*, kao i pojedinačne komponente ekstrakta berberin, palmatin i jatrorizin mogu da inhibiraju rast i dermatofita i kvasnica. Berberin i jatrorizin deluju na *Candida tropicalis* koja pokazuje rezistenciju na lekove (Slobodnikova i sar., 2004), kao i na sojeve *Malassezia spp.* nađene kod pacijenata sa pitirijazom i seboroičnim dermatitisom (Vollekova i sar., 2001). Jatrorizin je efekat pokazao i na sojevima *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.* i *Epidermophyton floccosum* (Vollekova i sar., 2004) .

Takođe, berberin i jatrorizin izolovani iz vrste *M. aquifolium* pokazali su dobru antimikrobu aktivnost na 20 kliničkih izolata *Propionibacterium acnes* iz uzoraka kože

pacijenata sa aknama i na 9 različitih sojeva bakterija koje nastanjuju oralnu duplju (Rohrer i sar., 2007; Slobodnikova i sar., 2004).

Berbamin i oksikantin izolovani iz vrste *M. aquifolium* imaju i sposobnost da sprečavaju kontrakcije krvnih sudova izazvane noradrenalinom, fenilefrinom i serotoninom i ovaj efekat alkaloidi najverovatnije ostvaruju preko Ca^{2+} kanala, a moguće je delom i preko adrenergičkih receptora (Sotnikova i sar., 1994).

Većina dosadašnjih studija su istraživale i potvrdile da vrsta *M. aquifolium* ima antiinflamatorne i imunomodulatorne efekte. Manji broj studija bavio se ispitivanjem antimikrobnih efekata ove biljke. Ono što je interesantno je da bez obzira na potvrđeni antiinflamatorni potencijal vrste *M. aquifolium* nije bilo istraživanja koja su se bavila ispitivanjem njenog antikancerskog potencijala i moguće uloge u terapiji onkoloških oboljenja.

1.4. Alkaloidi izolovani iz vrsta roda *Mahonia* i njihovi farmakološki efekti

Alkaloidi (berberin, palmatin, berbamin) su najčešće izolovani i najviše istraživani sekundarni metaboliti vrsta roda *Mahonia*.

Osim iz vrsta *M. aquifolium*, ovi alkaloidi izolovani su i iz drugih biljaka roda *Mahonia* i srodnih vrsta drugih rodova sličnog hemijskog sastava. Kada je reč o alkaloidima izolovanim iz vrsta roda *Mahonia*, pokazan je širok spektar različitih aktivnosti.

Berberin je pored antimikotičnog delovanja na gljivicu *C. tropicalis* pokazao aktivnost i na *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guiliermondii*, dok je palmatin dobar antimikotički efekat pokazao na *C. parapsilosis* (Park i sar., 1999). U kliničkim studijama berberin u kombinaciji sa ofloksacinom doveo je do značajnog povećanja procenta izlečenja u kraćem vremenskom periodu kod dece obolele od bacilarne dizenterije. Neke od prednosti berberina u ovom slučaju su njegova laka dostupnost i niska cena (Cheng i sar., 2004). Interesantno je da su berberin i palmatin pokazali i antivirotički potencijal. Oba alkaloida su dovela do inhibicije aktivnosti enzima reverzne transkriptaze kod virusa avian mijeloblastoze (AMV), murin leukemije (MuLV) i simian sarkoma virusa (SSV) (Sethi, 1983). A bitan je i podatak da i berberin

i palmatin mogu da inhibiraju i HIV-1 reverznu transkriptazu (Gudima i sar., 1994). Podaci o antimikrobnom potencijalu analiziranih alkaloida su u saglasnosti sa tradicionalnom upotrebom biljaka koje su njihovi izvori, pre svega u tretiranju infekcija digestivnog trakta i kože.

Berberin i palmatin su pokazali i antikancerski efekat i ovi rezultati potvrđuju podatke dobijene o protoberberinskim alkaloidima izolovanim iz predstavnika drugih rodova (Lin 1996; Sanders i sar., 1998). Mnogobrojne studije o berberinu sugerišu da ovaj alkaloid može naći svoje mesto u savremenoj terapiji kancera, jer ne samo da utiče na proliferaciju malignih ćelija, nego i smanjuje njihov metastatski potencijal i u kombinaciji sa lekovima ili radijacijom daje mnogo bolje rezultate nego kada se terapija primenjuje samostalno (Tillhon i sar., 2012). Treba napomenuti da je berberin pokazao i organoprotektivni efekat u toku primene sa doksorubicinom čime je smanjio toksičnost i neželjene efekte samog leka (Zhao i sar., 2011).

Berberin i palmatin imaju sposobnost i da se vežu za serotoninske i adrenergičke receptore i da inhibiraju enzime koji su uključeni u sintezu acetilholina. S obzirom da je utvrđeno da berberin svoje efekte u ćeliji ostvaruje interkalacijom sa DNK molekulom, usled čega dolazi do inhibicije reverzne transkriptaze, sinteze DNK i proteina, jedno od mogućih objašnjenja za toksičnost berberina bi uz ove efekte moglo biti i vezivanje za receptore u nervnom sistemu (Schmeller i sar., 1997).

Što se tiče alkaloida koji su u manjim količinama zastupljeni u biljkama roda *Mahonia* i oni su pokazali različite farmakološke efekte i dobar potencijal da se razviju u nove terapijske agense. Berbamin inhibira produkciju interleukina-1 (IL-1) i faktora nekroze tumora α (TNF- α) za koju su zaduženi monociti i makrofage, a takođe utiče i na produkciju faktora nekroze tumora β (TNF- β) od strane limfocita (Seow i sar., 1992). Takođe, istraživanja su pokazala da bi berbamin i drugi bis-benzilizohinolini svoju ulogu mogli naći i u terapiji multiple skleroze (Wong i sar., 1992).

Siringarezinol deluje antiinflamatorno tako što inhibira efekte COX i 5-LO. Siringin je pokazao imunomodulatorni i antialergijski efekat inhibicijom produkcije TNF- α , proliferacije CD8⁺ T limfocita i smanjenjem edema izazvanog kod miševa (Cho i sar., 2001).

Hormoarmolin, izotetrandin i alkaloidi izolovani iz vrste *M. balei* mogu da modifikuju rad enzima ATP-aza, što bi moglo naći svoju primenu u tretiranju gastričnih ulceracija (Nakamura i sar., 1992, Satoh i sar., 2003, Zhang i sar., 2014).

Svi do sada potvrđeni efekti alkaloida izolovanih iz vrsta roda *Mahonia* predstavljeni su u Tabeli 1.

Tabela 1. Biološke aktivnosti alkaloida izolovanih iz predstavnika roda *Mahonia*

JEDINJENJE	BIOLOŠKA AKTIVNOST
Berberin	Antimikrobna Antivirusna Antitumorska Antiproliferativna Antimutagena Antioksidativna
Palmatin	Antimikrobna Antivirusna Antitumorska
Jatrorizin	Antimikrobna Antitumorska Antimutagena Antiinflamatorna, imunomodulatorna Antioksidativna
Kolumbamin	Antioksidativna
Oksiberberin	Antioksidativna
Izotetrandin	Efekat na Na ⁺ , K ⁺ -ATP-aze
Berbamin	Antiproliferativna Antiinflamatorna, imunomodulatorna Antioksidativna
Homoaromolin	Efekat na Na ⁺ , K ⁺ -ATP-aze Inhibira oslobađanje histamine
Oksikantin	Antimikrobna Antiproliferativna Antioksidativna
Magnoflorin	Antioksidativna
(±)-Siringarezinol	Antiinflamatorna, imunomodulatorna
Siringin	Antiinflamatorna, imunomodulatorna
Epi-Siringarezinol	Antitumorska

1.5. Antitumorski potencijal biljne vrste *M. aquifolium*

Kancer je genetičko oboljenje somatske ćelije u kojoj usled nagomilavanja mutacija dolazi do genomske nestabilnosti, a sama ćelija postaje proliferativno nadmoćna u odnosu na ostale normalne, somatske ćelije. Rast malignog tumora i njegovu metastatičku diseminaciju obezbeđuju: održavanje proliferativne signalizacije, smanjena osetljivost na supresore rasta, izbegavanje ćelijske smrti, replikativna imortalizacija, stimulacija angiogeneze, stimulacija invazivnosti i metastaziranja (Hanahan i sar., 2000; Hanahan i sar., 2011; Weinberg, 2007).

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazala su da predstavnici roda *Mahonia* ispoljavaju antikancerski efekat koji zahteva dalja ispitivanja (Hu i sar., 2011; Wong i sar., 2009). Glavni aktivni sastojci alkaloidi u velikom broju studija nedvosmisleno su pokazali antiproliferativne, antitumorske i proapoptotske efekte (Lin 1996; Sanders i sar., 1998). Takodje, biljka *M. aquifolium* koja se koristi u tretiranju različitih zapaljenskih procesa ima potvrđen i antiinflamatorni efekat (Augustin i sar., 1999; Galle i sar., 1994; Mueller i sar., 1995). Iako dosadašnja istraživanja nisu razmatrala antikancerski potencijal *M. aquifolium*, literaturni podaci o antiinflamatornom efektu sugerišu da i antikancerski efekat može biti prisutan.

Pre svega trebalo je ispitati uticaj ekstrakata *M. aquifolium* na preživljavanje maligno transformisanih ćelija, utvrditi tip ćelijske smrti i razjasniti mehanizme kojima se indukuje ćelijska smrt. S obzorim da je angiogeneza proces od posebnog značaja za razvoj malignog tumora, kojim se obezbeđuju sve neophodne hranljive materije i kiseonik (Hanahan i sar., 2011), bitno je bilo ispitati uticaj ekstrakata i na ovaj proces. Da bi ispitivanje antikancerskog potencijala biljne vrste *M. aquifolium* bilo kompletno planirani eksperimenti uključili su i analizu uticaja ekstrakata na proces migracije i formiranje međućelijskih veza, čime se direktno utiče na migraciju i invazivnost tumora (Albring i sar., 2013; Nishida i sar., 2006; Park i sar., 2012).

Danas se intenzivno istražuju brojni prirodni agensi koji bi mogli u znatnoj meri odgovoriti na najveće probleme u savremenoj onkologiji kao sto su toksičnost i rezistentnost na postojeću hemioterapiju. Vrsta *M. aquifolium* zbog svojih bioloških i farmakoloških aktivnosti potencijalno je dobar kandidat za ispitivanja u kombinaciji sa kliničkim lekovima.

1.5.1. Kombinovani tretman ekstrakata vrste *M. aquifolium* i doksorubicina

Doksorubicin je lek izbora u lečenju mnogih maligniteta, kao što su kanceri dojke, pluća, jajnika i tiroidne žlezde, zatim limfomi, mijelomi, sarkomi i neke forme pedijatrijskih maligniteta. Doksorubicin intereaguje sa DNK molekulom i inhibira sintezu molekula bitnih za biosintetske procese u ćeliji. Zaustavlja progresiju topoizomeraze II, enzima koji učestvuje u održavanju procesa replikacije i transkripcije (Fornari i sar., 1994; Pommier i sar., 2010; Tacar i sar., 2013). Takođe, doksorubicin može dovesti do povećanja produkcije slobodnih radikala u ćeliji, što doprinosi samoj citotoksičnosti leka (Rossi, 2013). Svoj efekat ostvaruje i remodelovanjem hromatina, čime utiče na gensku ekspresiju. Ovim različitim mehanizmima doksorubicin prouzrokuje oštećenja na nivou genetskog materijala i same ćelije, što rezultuje ćelijskom smrću (Pang i sar., 2013; Pang i sar., 2015).

Iako pokazuje dobre rezultate, doksorubicin indukuje kumulativnu, dozno-zavisnu toksičnost. Od neželjenih efekata najčešća je kardiomiopatija, ali se toksičnost može ispoljiti i na mozgu, bubrezima ili jetri (Carvalho i sar., 2009). Savremena terapija za tretiranje malignih bolesti često obuhvata upotrebu više različitih lekova, što može uticati na povećano ispoljavanje toksičnosti i neželjenih efekata (Thorn i sar., 2011). U savremenim istraživanjima, da bi se smanjila toksičnost doksorubicina, lek se kombinuje sa drugim agensima koji imaju antioksidativna ili proapoptotska svojstva, poboljšavaju distribuciju samog leka u organizmu ili deluju organ-protektivno (Bamodu i sar., 2015; Carvalho i sar., 2009.). Dobri rezultati dobijeni su u studijama gde je doksorubicin kombinovan sa supstancama biljnog porekla, među kojima je bio i berberin (Osman i sar., 2012; Zhao i sar., 2011).

Za naše istraživanje od značaja je bilo ispitati efekat kombinovanog tretmana doksorubicin/ekstrakt *M. aquifolium* na proliferaciju, migratorni potencijal, invazivnost humanih, malignotransformisanih ćelija i procese preuzimanja i zadržavanja doksorubicina u ciljnoj ćeliji. U cilju razjašnjenja mehanizama usled kojih kombinovani tretman utiče na invazivnost maligno transformisanih ćelija, ispitane su promene u ekspresiji gena od značaja za migraciju, angiogenezu, formiranje međućelijskih veza i reparaciju, kao što su: matriksne metaloproteinaze 2 i 9 (*MMP2* i *MMP9*), okcludin (*OCLN*), katenin beta-1 (*CTNNB1*) i kros-komplementarna grupa 1 za ekscizionu reparaciju (*ERCCI*).

Dobijeni rezultati zajedno sa detaljnom hemijskom analizom sastava ekstrakata vrste *M. aquifolium* i karakterizacijom aktivnih principa omogućiće da se definiše antitumorski potencijal biljke, i bolje razumeju mehanizmi delovanja kako bi se odredio dalji pravac u ispitivanju ove biljne vrste.

1.6. Antimikrobna aktivnost biljne vrste *M. aquifolium*

Mikroorganizmi su jednoćelijski organizmi, koje odlikuje velika raznolikost, dobra sposobnost adaptacije i široka rasprostranjenost. Od izuzetnog su značaja za čoveka i njegovo okruženje, dok se u medicini posebna pažnja pridaje mikroorganizmima koji sačinjavaju normalnu floru ljudskog organizma i patogenima izazivačima različitih bolesti (Schulz i Jorgensen, 2001). Bakterije su prokariotski, jednoćelijski organizmi, koji ne poseduju ćelijske organele i jedro. Sposobne su da funkcionišu i da se dele kao pojedinačne ćelije, ali se češće udružuju u kolonije (Shapiro, 1998). Bakterijski genom je uglavnom u formi cirkularnog hromozoma, jednostruke petlje DNK molekula, mada su često prisutni i pojedinačni delovi DNK materijala koji se nazivaju plazmidi (Johnsborg i sar., 2007). Zaštitu i čvrstinu bakterijskoj ćeliji obezbeđuje ćelijski zid, na osnovu čije strukture se i zasniva osnovna podela na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (bojenje po Gramu). Bakterije se razmnožavaju binarnom fizijom ili pupljenjem, ali imaju i sposobnost razmene genetskog materijala procesima transformacije i konjugacije (Johnsborg i sar., 2007). Pri nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine bakterije mogu da prežive u formi spore. Kada se nalazi u optimalnim uslovima bakterija može da raste izuzetno brzo i da se deli na svakih 20 minuta (Dyall i sar., 2004). Ukoliko se na domaćinu nalazi kao parazitski organizam, smatra se patogenom, i takve bakterije su izazivači različitih infekcija. Svaka bakterijska vrsta ima svoj karakterističan spektar interakcije sa domaćinom, koji je definisan mestom nastanka i širenja infekcije, kao i tipom imunog odgovora koji se razvija (Fish, 2002). Terapija koja se koristi u procesu lečenja onkoloških bolesti intenzivno utiče na humoralni i celularni imuni sistem. Na taj način slabi odbrambeni sistem pacijenta, koji je često već oštećen zbog prirode same bolesti. Savremena hemioterapija utiče na gotovo sve komponente imunog sistema usled čega se menja produkcija imunoglobulina, T limfocita, monocita, makrofaga, neutrofila, i zaštitna barijera na koži

i sluzokoži. Zato su pacijenti sa rakom posebno podložni skoro svim tipovima infekcija, pre svega bakterijskim i gljivičnim. Ove infekcije utiču na sam proces i ishod lečenja malignih bolesti (Anaissie i sar., 1998; Bochud i sar., 1994; Bodey i sar., 1966; Vento i Cainelli, 2003).

Savremena hemioterapija se u većini onkoloških oboljenja primenjuje u ciklusima nedeljama ili mesecima. Povećana temperatura sa neutropenijom je jedan od prvih znakova da je pacijentu život ugrožen, nakon čega se on smešta u bolnicu i daju mu se antibiotici. U više od 50% pacijenata ne može se naći izvor same infekcije (Pizzo, 1993).

Što se tiče bakterijskih infekcija kod onkoloških pacijenata sa neutropenijom, od 60-ih do 80-ih godina prošlog veka to su uglavnom bile aerobne Gram negativne bakterija (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*). Široka upotreba antibiotika dovela je do promena, tako da su 80-ih godina uzročnici 60-70% svih infekcija kod onkoloških pacijenata bile Gram pozitivne bakterije, pre svega koagulaza negativne stafilokoke, viridans streptokoke i *Staphylococcus aureus*. Osim samih antibiotika na povećan broj infekcija izazvanih Gram pozitivnim bakterijama uticalo je još nekoliko faktora, kao što su mukozitisi izazvani agresivnijom terapijom, produžena neutropenija, upotreba nekih vrsta katetera, upotreba H₂-agonista i profilaktično davanje fluorohinolona protiv Gram negativnih bakterija (Smiley i sar., 2005; Vento i Cainelli, 2003). U poslednjih nekoliko godina zabeležen je porast infekcija Gram negativnim bakterijama kod pacijenata na terapiji (Ariffin, 2002), dok su danas od Gram pozitivnih najzastupljenije *Staphylococcus aureus*, koagulaza negativne stafilokoke, *Enterococcus spp.* i viridans streptokoke (Vento i Cainelli, 2003). Viridans streptokoke su deo normalne mikroflore najčešće usne duplje, ali se mogu naći i u gornjim delovima respiratornog trakta, u genitalnom, gastrointestinalnom traktu i na koži. Da bi viridans streptokoke izazvale ozbiljnije infekcije mukoza i njena odbrambena barijera moraju da budu oštećene, što se često dešava kao posledica hemioterapije. Oko 10% onkoloških pacijenata usled infekcije ovim bakterijama razvije simptome toksičnog šoka sa groznicom, hipotenzijom, osipom i akutnim distres sindromom, i kod 30% pacijenata ovakve infekcije završavaju se smrtnim ishodom (Vento i Cainelli, 2003).

Kod onkoloških pacijenata na terapiji u poslednjih 30 godina raste i broj infekcija izazvanih gljivicama. Ovakve infekcije posebno su ozbiljne kod pacijenata sa

hematološkim malignitetima. Najčešći uzročnik sistemskih gljivičnih infekcija je *Candida albicans*, mada su i drugi tipovi kandidate takođe izolovani (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*). Faktori koji pogoduju razvoju gljivičnih infekcija su već postojeća bakterijska ili virusna infekcija, oštećenje sluznica i upotreba antibiotika. Za razliku od kandidate koja potiče sa mukoze, gljivične infekcije koje izaziva *Aspergillus spp.* ulaze kroz disajne puteve i potiču iz spoljašnje sredine (Bodey i sar., 1992).

Infekcije kod onkoloških pacijenata izazvane kandidom tretiraju se fukonazolom ili u slučaju rezistencije na ovaj lek amfotericinom.

Postoji nekoliko kombinacija antibiotika koje se daju kod onkoloških pacijenata u febrilnom stanju sa neutropenijom i svi su uglavnom podjednako efikasni. Neke od tih kombinacija su aminoglikozidi (gentamicin, amikacin, tobramicin, netilmicin) sa antipseudomonas penicilinima (piperacilin, mezlocilin) ili kombinacija β -laktamskih antibiotika i inhibitora β -laktamaze (tikarcilin i klavulanska kiselina ili piperacilin i tazobaktam). Takođe monoterapija sa cefalosporinima novije generacije (ceftazidin, ceftriakson, cefepim) ili karbapenemima (imipenem i meropenem) se pokazala kao dovoljno odgovarajuća (Hughes i sar., 2002). U poslednje vreme se sve češće dovodi u pitanje davanje antibiotika u profilaktičke svrhe. Ovakvo davanje fluorohinolona jeste smanjilo incidencu infekcija izazvanih Gram negativnim bakterijama, ali nije smanjilo incidencu febrilnih stanja sa neutropenijom, kao ni morbiditet i mortalitet (Engels i sar., 1998). Međutim usled profilaktičke primene fluorohinolona došlo je do porasta rezistencije Gram negativnih bakterija, naročito kod *Escherichia coli* (Cometta i sar., 1994).

Može se zaključiti da onkološki pacijenti usled prisutne imunodeficijencije zahtevaju posebnu pažnju u procesu profilakse i terapije prisutnih bakterijskih ili gljivičnih infekcija, koje mogu bitno uticati na ishod lečenja samog onkološkog oboljenja.

Kao što je već rečeno do sada objavljena istraživanja su pokazala da ekstrakti biljke *M. aquifolium* i izolovani alkaloidi berberin, palmatin i jatrorizin poseduju antimikotičku aktivnost (Slobodnikova i sar., 2004). Berberin i jatrorizin iz ove biljke inhibirali su rast uzročnika akni i bakterija prirodnih stanovnika usne duplje. Takođe istraživanja drugih predstavnika roda *Mahonia* i pojedinačnih alkaloida kao glavnih nosilaca aktivnosti potvrdila su njihov dobar antimikrobni potencijal (Rohrer i sar., 2007; Slobodnikova i

sar., 2004). Cilj našeg istraživanja je bio da ispitamo efekat ekstrakata biljke *M. aquifolium* na bakterijskim sojevima koji se često javljaju kao izazivači infekcija kod onkoloških pacijenata, sa posebnim osvrtom na faktore virulencije i kombinovanu upotrebu sa najčešće primenjivanim antibioticima.

Za ispitivanje uticaja na produkciju faktora virulencije odabran je soj *S. aureus*. Ova Gram pozitivna bakterija može biti prirodno prisutna kod 30% populacije i najčešće izaziva blage ili umereno teške infekcije kože i mekih tkiva. Ozbiljnije infekcije može izazvati kod imunokompromitovanih pacijenata u koje spadaju i pacijenti sa malignim bolestima, kao i kod pacijenata sa postoperativnim ranama, intravenskim kateterima ili medicinskim implantima, što su takođe bitne kategorije u onkologiji (Gotz, 2004). Jedan od najbitnijih faktora virulencije stafilokoka je sposobnost formiranja biofilma. Biofilm je kompleksna višćelijska struktura u kojoj prisutne bakterije ispoljavaju različite fenotipske karakteristike (Periasamy i sar. 2011; Donlan i Costerton, 2002). Prilikom formiranja biofilma bakterije mogu adherirati za površinu živih ćelija ili za plastične površine medicinskih uređaja i implantata (Periasamy i sar., 2011). U biofilmu formiraju se kanalići kroz koje se sve bakterije snabdevaju vodom i hranljivim nutrijentima (Watnic i Colter, 2000). Bakterije mogu biti u različitim metaboličkim stanjima, što i određuje njihov položaj u biofilmu. One bakterije koje su više metabolički aktivne, rastu ili obezbeđuju energiju procesima fermentacije, nalaze se u višim slojevima bogatim kiseonikom ili u slojevima koji su bogati nutrijentima. Metabolički neaktivne ćelije i mrtve ćelije nalaze se uglavnom u anoksičnim delovima biofilma (Brady i sar., 2007; Rani i sar., 2007). Biofilm obezbeđuje bakterijama otpornost na antibiotike, dovodi do razvoja rekurentnih infekcija, a njegovom diseminacijom žarišta infekcija se prenose na udaljena mesta. Zbog svog afiniteta da se formira na plastičnim površinama implantiranih medicinskih uređaja i pomagala kao što su intravenski i urinarni kateteri i kozmetički implantati, onkološki pacijenti na bolničkom lečenju su posebno izloženi riziku za razvoj rezistentnih stafilokoknih infekcija. Zato je bilo od značaja ispitati uticaj ekstrakata vrste *M. aquifolium* na sposobnost *S. aureus* da formira biofilm.

Glikokaliks je zaštitni omotač bakterijske ćelije i takođe predstavlja bitan faktor virulencije. Sastoji se od polisaharida vezanih za proteine ćelijske membrane pri čemu se formiraju glikoproteini i glikolipidi. Glavna uloga glikokaliksa je da štiti membranu

od oštećenja, prima signale iz okolne sredine i obezbeđuje međucelijsku komunikaciju. Jedan od ciljeva našeg istraživanja je bio i da ispitamo uticaj ekstrakata vrste *M. aquifolium* na produkciju glikokaliksa *S. aureusa*, kao bitnog zaštitnog faktora bakterijske ćelije.

1.6.1. Antibiotici i interakcija sa ekstraktima biljne vrste *M. aquifolium*

Antibiotici čiju interakciju sa ekstraktima vrste *M. aquifolium* smo ispitivali su najčešće primenjivani za tretiranje širokog spektra infekcija. Prilikom odabira antibiotika od posebnog značaja je bio njihov mehanizam delovanja. Antibiotici korišćeni u našem istraživanju pripadaju različitim grupama, koji svoj antimikrobni efekat ostvaruju na različite načine.

Dobijeni podaci o uticaju ekstrakata na odabrane sojeve mikroorganizama, faktore virulencije i efekte antibiotika koji su u širokoj upotrebi, omogućiće utvrđivanje antimikrobnog potencijala biljke *M. aquifolium* koji može biti od posebnog značaja kod imunokompromitovanih pacijenata, kao što su pacijenti na antikancerskoj terapiji.

2. Ciljevi istraživanja

Na osnovu literaturnih podataka postavljena je hipoteza istraživanja, da ekstrakt kore vrste *M. aquifolium* pokazuje antiproliferativni i/ili antimikrobni efekat.

Da bismo proverili hipotezu postavili smo sledeće specifične ciljeve istraživanja:

- Odabir biljnog materijala i određivanje uslova ekstrakcije za pripremu ekstrakata vrste *M. aquifolium*.
- Kvalitativna i kvantitativna hemijska analiza sekundarnih metabolita prisutnih u ispitivanim ekstraktima vrste *M. aquifolium* metodom tečne hromatografije-masene spektrometrije (HPLC-MS).
- Primena jednodimenzionalne (1D) i dvodimenzionalne (2D) NMR spektroskopije i multivarijantne analize spektroskopskih podataka u cilju utvrđivanja aktivnih metabolita ispitivanih ekstrakata biljke *M. aquifolium*.
- Ispitivanje *in vitro* citotoksične aktivnosti vodenog i etanolnog ekstrakta biljne vrste *M. aquifolium*, prema pet malignih ćelijskih linija poreklom iz različitih tipova kancera, kao i određivanje selektivnosti citotoksičnog dejstva na uspostavljenoj liniji normalnih humanih ćelija.
- Ispitivanje mehanizama dejstva ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium*. Analiza efekta ekstrakata na distribuciju ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa, kao i određivanje tipa ćelijske smrti. Određivanje ciljnih kaspaza, da bi se utvrdilo preko kog signalnog puta se indukuje apoptoza u ciljnim ćelijama.
- Ispitivanje efekta ekstrakata na invazivnost humanih metastatskih malignih ćelija i na angiogenezu endotelijalnih ćelija čime bi se upotpunila procena antitumorskog potencijala ekstrakata.
- Ispitivanje antitumorskog potencijala, tipa interakcije kao i karakterizacija mehanizama dejstva ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium*, u prisustvu/odsustvu doksorubicina *in vitro*.
- Ispitivanje genske ekspresije gena bitnih u procesu adherence ćelija i formiranja čvrstih veza nakon dejstva ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium*, u prisustvu/odsustvu doksorubicina *in vitro*.

- Ispitivanje antimikrobnog potencijala ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium* određivanjem preživljavanja odabranih mikroorganizama i ispitivanje uticaja ekstrakata na ekspresiju faktora virulencije mikroorganizama, sintezu glikokaliksa i produkciju biofilma.
- Ispitivanje uticaja ekstrakata na antimikrobni potencijal odabranih antibiotika i tip interakcije antibiotik/ekstrakt.

3. Materijal i metode

3.1. Ekstrakti biljne vrste *M. aquifolium*

Biljni materijal koji je korišćen za ekstrakciju je osušena kora skinuta sa grana *M. aquifolium* nakon orezivanja biljaka, sakupljena u oktobru 2014. godine u parku Narodna Bašta u Pančevu, Srbija. Uzorkovani materijal se nalazi u Herbarijumu Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ (u kolekciji Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Pančevu) pod rednim brojem 064/14. Sušenje biljnog materijala se obavljalo na sobnoj temperaturi u tankom sloju na suvom i promajnom mestu.

Neposredno pre ekstrakcije biljni materijal je samleven na laboratorijskom mlinu i korišćen za izradu dva tipa ekstrakta, vodeni i etanolni. Vodeni ekstrakt pripremljen je ekstrakcijom droge na ultrazvučnom kupatilu (1:10, w/v) u trajanju od 30 minuta. Etanolni ekstrakt je dobijen maceracijom droge sa 70% etanolom na sobnoj temperaturi tokom 24 h (1:5, w/v). Oba ekstrakta su filtrirana kroz filter papir i koncentrovana pod vakuumom na 40°C na rotacionom evaporatoru. Suvi ekstrakti čuvani su u frižideru.

U cilju utvrđivanja korelacije hemijskog sastava ekstrakata sa njihovom citotoksičnom aktivnošću primenom jednodimenzionalne (1D) i dvodimenzionalne (2D) NMR spektroskopije i multivarijantne analize pripremljena su tri tipa ekstrakata. 2g sprasenog biljnog materijala ekstrahovano je sa 20 ml hloroforma, dok je 3g materijala ekstrahovano sa 30 ml 62% etanola. Smeše su sonifikovane u ultrazvučnom kupatilu tokom 15 min i zatim filtrirane kroz filter papir (engl. *Whatman* 4, 20-25 µm). Filtrati su upareni do suva pri redukovanom pritisku na 40°C. Na ovaj način dobijeno je 20 mg hloroformskog ekstrakta i 260 mg etanolnog ekstrakta. 200 mg od etanolnog ekstrakta dobijenog ekstrakcijom sa 62% etanolom rastvoreno je u 4 ml 10% trifluorosirćetne kiseline i centrifugirano (13400 rpm/5 min). Rastvor je zatim neutralizovan do pH = 8 dodavanjem 25% vodenog rastvora amonijaka i nakon toga ekstrahovan sa 8 ml hloroforma. Organski sloj je osušen pomoću anhidrovanog MgSO₄ i uparen do suva pod redukovanim pritiskom na 40°C. Na ovaj način dobijeno je 15 mg frakcionisanog ekstrakta. Cela procedura ponovljena je pet puta. Svi uzorci rastvoreni su u dimetil

sulfoksidu (DMSO) do koncentracije od 30 mg/ml, pomoću ultrazvučnog kupatila, nakon čega su centrifugirani (13400 rpm/5 min).

Etanol i hloroform proizvodi su kompanije Merck (Darmštat, Nemačka). Ultra čista voda dobijena je pomoću Milli-Q Water sistema, korporacija Millipore Corp. (Billerica, MA, Sjedinjene Američke Države). DMSO je proizvod kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države).

3.2. Hemijska karakterizacija biljnih ekstrakata

3.2.1. HPLC-MS analiza

Pre HPLC-MS (engl. high performance liquid chromatography-mass spectrometry) analize, ispitivani ekstrakti su rastvoreni u metanolu (C(etanolnog ekstrakta) = 13,644 mg/ml; C(vodenog ekstrakta) = 11,770 mg/ml) i proceđeni kroz filter (0,45 µm).

U ispitivanim ekstraktima sadržaj berberina je određen pomoću HPLC uređaja (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)) sa degaserom, autosamplerom, kolonom Zorbax Eclipse XDB-C18 (RRHT, 50 × 4,6 mm i. d.; 1,8 µm) i DAD detektorom u kombinaciji sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies). Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvarača A (0,2% rastvor mravlje kiseline u vodi) i B (acetonitril) sa programiranim izokratnim i gradijentnim eluiranjem: 0-0,5 min 5% B, 0,5-10 min 5-95% B, 10-15 min 95% B, 15-15,5 min 95-5 % B, 15,5-18,5 min 5 % B, pri protoku od 0,50 ml/min. Za detekciju signala u opsegu talasnih dužina 190-450 nm korišćen je DAD detektor. Injekciona zapremina bila je 0,1 µl, a temperatura kolone 40°C. Za dobijanje i obradu podataka korišćen je softver MassHunter Workstation. Pozitivno naelektrisani molekularni joni dobijeni su elektrosprej jonizacijom (ESI) na atmosferskom pritisku: eluirana jedinjenja su mešana sa azotom u zagrejanom interfejsu, a polarnost je podešena na pozitivnu, sa sledećim vrednostima ES parametara: potencijal kapilare, 4000 V; temperatura gasa, 350°C; protok gasa za sušenje, 12 l/min; pritisak nebulajzera, 45 psig (310,26 Pa); napon fragmentora, 70 V, a mase su merene u opsegu 100-1500 m/z.

Za konstruisanje kalibracione prave (zavisnost intenziteta jona $[M+H]^+$ m/z 336,12 od koncentracije berberina u rastvoru), pod istim uslovima snimljeni su i rastvori berberina koncentracije: 0,04 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml i 0,4 mg/ml. Na osnovu dobijene jednačine prave izračunata je koncentracija berberina u ispitivanim ekstraktima.

3.2.2. NMR spektroskopija

Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) je korišćena za određivanje strukture komponenti ekstrakata. Ekstrakti dobijeni rastvaračima različite polarnosti analizirani su tehnikama jednodimenzionalne i dvodimenzionalne (1D i 2D) spektroskopije.

NMR spektri su snimani na aparatu Bruker Avance III na 500 MHz na temperaturi od 298 K.

Na osnovu primene metoda multivarijantne analize spektralnih podataka (ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata - OPLS) utvrđena je korelacija sadržaja pojedinih supstanci sa intenzitetom citotoksičnosti ekstrakata, uz pomoć softvera TopSpin (verzija 3.2, Bruker Biospin, Germany) i SIMCA (verzija 14, Umetrics, Umeå, Sweden). Na taj način su identifikovane supstance prisutne u ekstraktima koje bi mogle biti odgovorne za citotoksičnu aktivnost.

3.3. Čelijske linije

Citotoksični efekat ekstrakata biljne vrste *M. aquifolium* ispitan je na pet humanih malignih čelijskih linija: HeLa (adenokarcinom cerviksa), LS 174T (adenokarcinom kolona), A549 (adenokarcinom pluća), MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke), K562 (mijeloidna leukemija), kao i na normalnim fibroblastima pluća MRC-5 i na humanim transformisanim endotelijalnim ćelijama umbilikalne vene EA.hy926.

K562 kao jedina ne adherentna čelijska linija održavana je u kulturi u suspenziji, dok su sve ostale čelijske linije održavane u kulturi u hranljivom medijumu u vidu monosloja. U kompletni hranljivi medijum (RPMI 1640, pH 7.2) dodati su: 10% serum fetalnog govečeta (FBS, engl. *fetal bovine serum*) termički inaktivisan (30 minuta, 56°C), L-

glutamin (3mM), streptomycin (100 µg/ml), penicilin (100 IU/ml) i HEPES (25 mM). EA.hy926 je jedina ćelijska linija koja je gajena u hranljivom medijumu (DMEM) sa visokim sadržajem glukoze (4.5 g/l) i natrijum piruvatom. Sve ćelijske linije su gajene u inkubatoru na 37°C, u atmosferi vazduha koji je obogaćen sa 5% CO₂ i zasićen vodenom parom.

Sve korišćene ćelijske linije su nabavljene od kompanije American Type Culture Collection (ATCC) (Manasas, VA, Sjedinjene Američke Države). Reagensi upotrebljeni za gajenje ćelijskih kultura su proizvodi kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države), dok su antibiotici dodati u medijum nabavljeni od proizvođača Galenika A.D. (Beograd, Srbija) i Hemofarm A.D. (Vršac, Srbija).

3.4. Ispitivanje citotoksične aktivnosti *in vitro*

3.4.1. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata *M. aquifolium* na odabranim ćelijskim linijama

Ćelijske suspenzije prepremane su u potpunom hranljivom medijumu sa 10% FBS-om. Sve ćelije su zasejavane u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara. HeLa (2000 ćelija/100 µl po bunaru), LS-174T (7000 ćelija/100 µl po bunaru), A549 (5000 ćelija/100 µl po bunaru), MDA-MB-231 (5000 ćelija/100 µl po bunaru), EA.hy926 (5000 ćelija/100 µl po bunaru) i MRC-5 (5000 ćelija/100 µl po bunaru) nakon inkubacije od 24 h, tokom koje dolazi do adhezije ćelija, ćelije su tretirane sa po 50 µl rastvora ispitivanih ekstrakata (vodenog i etanolnog) u pet različitih koncentracija. K562 (5000 ćelija/100 µl po bunaru) tretirane su rastvorima ispitivanih ekstrakata 2 h nakon zasejavanja. U kontroli, ćelije su rasle samo uz dodavanje hranljivog medijuma u zapremini od 50 µl.

Pet različitih koncentracija vodenog i etanolnog ekstrakta (12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml i 200 µg/ml) pripremane su u hranljivom medijumu sa 10% FBS-om iz štokova rastvora koncentracije 50 mg/ml u dimetil sulfoksidu (DMSO).

Inkubacija HeLa, LS-174T, A549, MDA-MB-231, K562 i MRC-5 ćelija trajala je 72 h, dok su EA.hy926 ćelije inkubirane 24 h i 48 h.

3.4.2. Ispitivanje citotoksične aktivnosti doksorubicina i ekstrakata *M. aquifolium* na A549 ćelijskoj liniji

Ćelijska suspenzija A549, u medijumu sa 10% FBS-om zasejana je u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara (5000 ćelija/100 µl po bunaru). Nakon adhezije ćelija u toku 24 h dodato je pet različitih koncentracija rastvora doksorubicina sa ili bez rastvora vodenog ili etanolnog ekstrakta u subtoksičnim koncentracijama.

Rastvori doksorubicina pripremani su u medijumu sa 10% FBS-om iz štoka u DMSO-u koncentracijae 2.5 mg/ml. Rastvori subtoksičnih koncentracija vodenog i etanolnog ekstrakta (5, 10 i 20 µg/ml) takođe su pripremani u medijumu sa FBS-om.

Ispitivane A549 ćelije su inkubirane 72 h.

Doksorubicin je proizvod kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države).

3.4.3. Određivanje preživljavanja ćelija

Preživljavanje ćelija procenjivano je pomoću MTT kolorimetrijskog testa, na osnovu količine redukovanog kolorimetrijskog reagensa u ćelijama koje su metabolički aktivne. MTT kolorimetrijski test razvio je Mosmann (Mosmann, 1983), a metodu su modifikovali Ohno i Abe (Ohno i Abe, 1991). Tetrazolijumska so, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT) je žute boje i u živim, metabolički aktivnim ćelijama se redukuje do nerastvornog kristala formazana, koji je ljubičaste boje. Rastvor MTT reagensa je napravljen u PBS-u (engl. *phosphate buffered saline*) u koncentraciji od 5 mg/ml. Dodavanjem deterdženta SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulphate*) rastvara se formazan i dobija ljubičasto obojeni rastvor koji ima maksimum apsorpcije na 570 nm. Količina rastvorenog formazana smatra se da je direktno proporcionalna broju metabolički aktivnih ćelija.

Nakon inkubacije tretiranih ćelija u sve bunare mikrotitar ploča dodato je po 10 µl MTT reagensa. Nakon 4 h na 37°C u bunare je dodato po 100 µl 10% natrijum dodecil sulfata SDS-a. Ploče su inkubirane tokom noći, a zatim je očitana apsorbanca na talasnoj dužini od 570 nm na čitaču Multiskan EX Thermo LabSystems (Waltham, MA, Sjedinjene Američke Države).

Od očitanih apsorbanci odgovarajućih ćelijskih uzoraka oduzete su očitane vrednosti apsorbance blankova

Ćelijsko preživljavanje određeno je na osnovu formule:

$$S[\%] = (A_u/A_k) \times 100$$

S[%]- % preživljavanja ćelija u kulturi

A_u-apsorbanca uzorka ćelija u prisustvu tretmana

A_k-apsorbanca kontrolnog uzorka ćelija

IC₅₀ vrednost je mera citotoksične aktivnosti agensa, i definiše se kao koncentracija agensa koja inhibira preživljavanje ciljnih ćelija za 50%.

Urađena su 3 nezavisna eksperimenta, pri čemu je svaki eksperiment rađen u triplikatu.

MTT i SDS su nabavljeni od kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države).

3.4.4. Evaluiranje interakcije izoblografičkom analizom

Izoblografička analiza korišćena je da bi se evaluirala interakcija između doksorubicina i ispitivanih ekstrakata.

Kombinatorni indeks (*combination index* CI) izračunat je prema formuli (Former i sar., 2012; Khan i sar., 2014):

$$CI = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2} + \alpha \{D_1 * D_2 / D_{x1} * D_{x2}\},$$

D_{x1} - koncentracija agensa 1, koja inhibira ćelijsku proliferaciju za 50% kada se agens aplikuje sam

D₁ - koncentracija agensa 1, koja inhibira proliferaciju ćelija za 50% u kombinaciji sa

D₂ D_{x1} - koncentracija agensa 2, koja inhibira proliferaciju ćelija za 50% kada se agens aplikuje sam

D₂ - koncentracija agensa 2, koja inhibira proliferaciju ćelija za 50% u kombinaciji sa D₁

$\alpha=1$.

CI vrednost predstavlja srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. CI 1.3: antagonizam; CI 1.1–1.3: umereni antagonizam; CI 0.9–1.1: aditivni efekat; CI 0.8–0.9: blag sinergizam; CI 0.6–0.8: umereni sinergizam; CI 0.4–0.6: sinergizam; and CI 0.2–0.4: izražen sinergizam.

3.5. Određivanje tipa ćelijske smrti

Tip ćelijske smrti (apoptoza ili nekroza) koji indukuju ispitivani vodeni i etanolni ekstrakt biljne vrste *M. aquifolium* određen je na osnovu analize morfoloških promena na HeLa ćelijama primenom fluorescentnog mikroskopa Carl Zeiss PALM MicroBeam sa Axio Observer.Z1 uz AxioCam MRm (filteri Alexa 488 i Alexa 568) (Oberkochen, Nemačka).

HeLa ćelije (100 000 ćelija/2 ml po bunaru) zasejane su na pokrovnim mikroskopskim staklicima u pločama sa 6 bunara. Ćelijska suspenzija pripremljena je u hranljivom medijumu (RPMI 1640) sa 10% FBS-om. Posle 24 h uklonjen je medijum i ćelije su tretirane sa rastvorima vodenog i etanolnog ekstrakta koncentracije $2IC_{50}$, dok je u kontrolni uzorak dodat samo hranljivi medijum. Kao pozitivna kontrola korišćen je rastvor citostatika cisplatine u koncentraciji $2IC_{50}$ (4.96 $\mu\text{g/ml}$, vrednost dobijena MTT kolorimetrijskim testom na HeLa ćelijskoj liniji). Nakon inkubacije od 24 h na 37°C ćelije su obojene smešom boja akridin oranž/etidijum bromid gde su finalne koncentracije u PBS-u akridin oranž i etidijum bromida bile 3 $\mu\text{g/ml}$ odnosno 10 $\mu\text{g/ml}$. Morfološke karakteristike tretiranih ćelija analizirane su fluorescentnim mikroskopom, nakon čega su reprezentativne promene na ćelijama fotografisane.

3.6. Analiza ćelijskog ciklusa

3.6.1. Uticaj ekstrakata *M. aquifolium* na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

HeLa ćelije (200 000 ćelija/2 ml pobunaru) zasejane su u hranljivom medijumu (RPMI 1640) sa 10% FBS-om u pločama sa 6 bunara. Nakon 24 h medijum je uklonjen i ćelije su tretirane rastvorima vodenog i etanolnog ekstrakta u koncentracijama IC₅₀ i 2IC₅₀. U kontrolni uzorak dodat je samo medijum. Nakon inkubacije od 24 i 48 h kontrolni i tretirani uzorci HeLa ćelija su sakupljeni nakon tripsinizacije (Trypsin 0.25%), isprani PBS-om i prebačeni u epruvete za citometar. Zatim je u epruvete dodato po 200 µl hladnog PBS-a na ledu i u sporom i tankom mlazu po 2 ml hladnog 70% etanola uz vorteksovanje, čime su uzorci fiksirani. Ćelije su čuvane na -20°C minimum 7 dana. Nakon toga uzorci su isprani PBS-om i inkubirani 30 min na 37°C sa 500 µl rastvora PBS-a koji sadrži ribonukleazu A (koncentracija 200 µg/ml). Kao boja korišćen je propidijum jodid koncentracije 20 µg/ml. Uzorci su analizirani na FACSCalibur protočnom citometru (BD Biosciences, Sjedinjene Američke Države). Detektovano je po 10 000 događaja u svakom uzorku. Propidijum jodidi je ekscitovan na 488 nm argon-jonskim laserom i detektovan na FL2 kanalu. Na osnovu dobijenih DNK histograma (broj događaja u odnosu na FL2-A (engl. FL2-*area*)) određivan je procenat ciljnih HeLa ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Podaci su analizirani uz pomoć CELLQuest softvera (BD Biosciences, San Hose, CA, Sjedinjene Američke Države).

Uradjena su tri nezavisna eksperimenta.

Ribonukleaza A i propidijum jodid su nabavljeni od kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države).

3.6.2. Uticaj doksorubicina i kombinovanog doksorubicin/ekstarkt tretmana na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

A549 ćelije (200 000 ćelija/2 ml po bunaru) zasejane su u hranljivom medijumu (RPMI 1640) sa 10% FBS-om u pločama sa 6 bunara. Nakon 24 h, medijum je uklonjen i ćelije su tretirane samo sa doksorubicinom u koncentraciji IC₂₀ i IC₅₀ ili sa doksorubicinom i rastvorom vodenog ili etanolnog ekstrakta u subtoksičnoj koncentraciji (20 µg/ml). U

kontrolni uzorak dodat je samo medijum. Nakon inkubacije od 24 h ćelije su sakupljene nakon tripsinizacije sa 0.25% rastvorom tripsina, isprane PBS-om i prebačene u epruvete za citometar. Dalji postupak je identičan kao što je opisano u odeljku 3.5.1.. Urađena su tri nezavisna eksperimenta.

3.7. Određivanje ciljnih kaspaza

HeLa ćelije (200 000 ćelija/2 ml po bunaru) su zasejane u hranljivom medijumu (RPMI 1640) sa 10% FBS-om u pločama sa 6 bunara. Nakon 24 h. ćelijama je uklonjen medijum. U kontrolni uzorak dodato je 2 ml hranljivog medijuma. U referentne uzorke za vodeni i etanolni ekstrakt dodato je po 1.5 ml hranljivog medijuma. U preostala 3 uzorka za svaki ekstrakt dodato je po 1.5 ml rastvora odgovarajućeg inhibitora kaspaze. Nakon 2 h inkubacije na 37°C u referentne uzorke, kao i u uzorke sa kaspazama dodato je po 0.5 ml rastvora odgovarajućeg ekstrakta, tako da je finalna koncentracija ekstrakata u bunaru bila 2IC₅₀. Finalna koncentracija inhibitora kaspaza iznosila je 40 µM. Inkubacija je trajala 24 h na 37°C nakon čega su ćelije skupljene tripsinizacijom, isprane PBS-om i prebačene u posebne epruvete za citometar. Zatim su ćelije fiksirane hladnim 70% etanolom na ledu. Narednih 7 dana ćelije su čuvane na -20°C. Uzorci ćelija su isprani PBS-om i inkubirani sa rastvorom ribonukleaze A u PBS-u (200 µg/ml) 30 min na 37°C. Kao boja korišćen je propidijum jodid u koncentraciji 20 µg/ml. Na protočnom citometru određivan je procenat HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa u svim uzorcima.

U eksperimentu su korišćena 3 inhibitora kaspaza:

- inhibitor kaspaze-3 (Z-DEVD-FMK (Z-D(OMe)-E(OMe)-V-D(OMe)-FMK))
- inhibitor kaspaze-8 (Z-IETD-FMK (Z-I-E(OMe)-T-D(OMe)-FMK))

Neposredno pred analizu pripremljeni su štokovi inhibitora u DMSO-u koncentracije 10 mM i čuvani su na -20°C.

Specifični inhibitori kaspaza nabavljeni su od kompanije R&D Systems (Mineapolis, MN, Sjedinjene Američke Države).

3.8. Analiza uticaja ekstrakata na sposobnost malignih ćelija za preuzimanje i zadržavanje doksorubicina, *in vitro*

A549 ćelije zasejane su u pločama sa 6 bunara u kompletnom hranljivom medijumu (RPMI) sa 10% FBS-om (200 000 ćelija/0.6 ml po bunaru) i inkubirane u toku 24 h. Ćelije su tretirane sa rastvorom doksorubicina koncentracije IC₅₀ ili sa kombinovanim tretmanom doksorubicin u koncentraciji IC₅₀ i vodeni ili etanolni ekstrakt u koncentraciji 40 µg/ml. Nakon 24 h inkubacije ćelije su isprane i analizirana je količina doksorubicina koja je ušla u ćelije. U sledećem eksperimentu ćelije su tretirane sa rastvorom doksorubicina IC₅₀ 24 h, nakon čega su uzorci isprani i inkubirani još 24 h sa vodenim ili etanolnim ekstraktom (40 µg/ml) ili samo sa hranljivim medijumom. Zatim su ćelije isprane i analizirana je količina doksorubicina koje se zadržala u ćelijama. Sve analize obavljene su na FACSCalibur protočnom citometru. Intenzitet fluorescence (GeoMean) u ćelijama tretiranim samo sa doksorubicinom smatran je 100%. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti tri nezavisna eksperimenta ± SD.

3.9. Analiza migracije ćelija – *in vitro* "scratch"esej

3.9.1. Uticaj ekstrakata *M. aquifolium* na migraciju EA.hy926 ćelija

EA.hy926 ćelije (70 000 ćelija/0.6 ml po bunaru) zasejane su u hranljivom medijumu (RPMI 1640) sa 10% FBS-om u pločama sa 24 bunara. Tokom naredna 24 h ćelije su formirale konfluentni monosloj. Nakon uklanjanja podloge sterilnim, žutim nastavkom za pipetu (p200) formirana je centralna linija u svakom uzorku, jednake širine celom dužinom. Uzorci su zatim blago isprani medijumom, čime su otklonjene odlepljene ćelije.

U kontrolne uzorke dodat je samo hranljivi medijum (0,6 ml po bunaru). U EA.hy926 ciljne ćelije dodata su razblaženja ispitivanih ekstrakata u medijumu, vodenog i etanolnog, u subtoksičnoj koncentraciji 80 µg/ml (IC₂₀).

Fotografisane su reprezentativne tačke u gornjem, srednjem i donjem delu odgovarajuće ciljne centralne linije, izmerena su rastojanja i određena srednja vrednost. Srednje

rastojanje neposredno po formiranju (0 h) smatrano je kontrolnim (100%), a ostala srednja rastojanja, nakon 24 h i 48 h inkubacije, preračunata su (%) u odnosu na kontrolno rastojanje. Eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.9.2. Uticaj doksorubicina i kombinovanog doksorubicin/ekstrakt tretmana na migraciju A549 ćelija, in vitro

A549 ćelije (70 000 ćelija/0.6 ml po bunaru) zasejane su u hranljivom medijumu sa 10% FBS-om u pločama sa 24 bunara i sledećeg dana, nakon formiranja monosloja, ćelije su tretirane sa rastvorom doksorubicina IC₂₀, sa ispitivanim ekstraktima, vodenim i etanolnim (20 µg/ml) ili sa kombinovanim tretmanom doksorubicin/ekstrakt. Postupak izrade eksperimenta isti je kao što je opisano u odeljku 3.8.1.

Urađena su tri nezavisna eksperimenta.

3.10. Određivanje uticaja ekstrakata na proces angiogeneze in vitro: "endothelial cell tube formation" esej

U eksperimentu je korišćen matriksni matrigel ("BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix" (BD 356234)), koji predstavlja preparat solubilizovane bazalne membrane izolovan iz EHS (engl. *Engelbreth-Holm-Swarm*) mišijeg sarkoma. Matriksni matrigel se čuvao na -20°C i otapao na +4°C na ledu tokom noći. Na istu temperaturu su ohlađeni ploča sa 24 bunara i nastavci za pipete. Ploča je stajala na ledu, dok je u bunare dodato po 200 µl matrigela. Nakon toga, ploča je 2 h bila u inkubatoru, a zatim je u bunare dodata suspenzija EA.hy926 ćelija u hranljivom medijumu (DMEM) sa 10% FBS-om (40 000 ćelija/0.4 ml po bunaru). U kontrole je dodato 200 µl kompletnog hranljivog medijuma, dok je u ostale uzorke dodato po 200 µl rastvora vodenog ili etanolnog ekstrakta u subtoksičnim koncentracijama 80 µg/ml (IC₂₀).

Uzorci su inkubirani 24 h i nakon toga ciljne ćelije su fotografisane.

3.11. Određivanje uticaja ekstrakata vrste *M. aquifolium*, doksorubicina i kombinovanog doksorubicin/ekstrakt tretmana na sposobnost ćelija da formiraju kolonije *in vitro*: “colony formation assay”

Suspenzija A549 ćelija u hranljivom medijumu (RPMI) sa 10% FBS-om zasejana je u ploče sa 6 bunara (50 000 ćelija/0.6 ml po bunaru) i inkubirana 24 h. Nakon toga ćelije su tretirane sa rastvorom doksorubicina IC₂₀ (0.11 µg/ml), sa subtoksičnim koncentracijama vodenog ili etanolnog ekstrakta (20 µg/ml), ili sa kombinacijom doksorubicin/ekstrakt. Posle 24 h medijum je uklonjen, ćelije su pokupljene nakon tripsinizacije i presejane u nove ploče u drugoj gustini. Nakon nedelju dana kolonije su obojene bojom engl. *Coomassie Brilliant Blue* i brojanjem je utvrđen njihov broj po svakom bunaru. Broj kolonija u svakom eksperimentu podeljen je sa ćelijskom gustinom i izračunata je srednja vrednost. Svaki eksperiment je rađen u triplikatu i ponavljen tri puta.

3.12. Analiza ekspresije seta gena u A549 ćelijama tretiranim ekstraktima, doksorubicinom i kombinovanim tretmanom

A549 ćelije u medijumu (RPMI) sa 10% FBS-om zasejane su u bočicama za gajenje ćelijskih kultura zapremine 75-cm² u gustini 3 000 000 ćelija/bočici. Nakon 24 h ćelije su tretirane rastvorom doksorubicina subtoksične koncentracije IC₂₀, vodenim ili etanolnim ekstraktom subtoksične koncentracije (20 µg/ml) ili kombinovanim tretmanom doksorubicin/ekstrakt u subtoksičnim koncentracijama. U kontrolnom uzorku ćelije su rasle samo u hranljivom medijumu. Nakon 24 h ćelije su sakupljene nakon tripsinizacije, isprane PBS-om i čuvane na -80°C za dalje eksperimente.

Ukupna ćelijska ribonukleinska kiselina (RNK) ekstrahovana je pomoću kita engl. “*TRI Reagent BD kit*”, prema preporuci proizvođača. Kvalitet RNK utvrđen je vizualizacijom i arhiviran pomoću sistema za snimanje gelova GS8000 (engl. *gel Documentation System*, UVP inc, Upland SAD). Količina RNK određena je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na BioSpec Nano aparatu (Shimadzu, Kyoto, Japan). Primarna

komplementarna DNK (cDNK) pripremana je pomoću kvantitativne PCR metode u realnom vremenu (RT-PCR), upotrebom random prajmera, dok je 2 µg totalne RNK korišćeno kao templejt za kit engl. “*MultiScribe Reverse Transcriptase in a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit*”, prema preporukama.

Svi ciljani transkripti detektovani su pomoću kvantitativne PCR metode u realnom vremenu i Takman eseja (engl. *TaqMan Gene Expression Assays* (OCLN: Hs00170162_m1, *CTNNB1*: Hs00355049_m1, *MMP2*: Hs01548727_m1, *MMP9*: Hs00234579_m1 i *ERCC1*: Hs01012158_m1)). Esej sadrži 20× miks od neobebeženih prajmera, kao i probu koja je na 5' kraju obeležena FAM bojom (engl. *FAM dye-labeled*) sa nefluorescentnim quencher-om konjugovanim sa minor groove-binder-om (MGB) (engl. *TaqMan MGB probes*). Nivoi gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) dobijeni su pomoću kontrolnog reagensa (Hs02758991_g1) i korišćeni su kao endogena kontrola. PCR reakcija izvedena je pomoću detekcionog sistema engl. “*ABI Prism 7500 Sequence Detection System*” (Applied Biosystems) (Zec i sar., 2014).

3.13. Ispitivanje antimikrobnog efekta ekstrakata, *in vitro*

Osetljivost odabranih sojeva mikroorganizama na vodeni i etanolni ekstrakt *M. aquifolium* određena je bujon-mikrodilucionim testom. Oba ekstrakta rastvorena su u DMSO-u (50 mg/ml). Radna razblaženja pravljena su u odgovarajućem medijumu. *Mueller-Hinton* bujon (MHB) korišćen je za ispitivanje osetljivosti bakterija, a *Sabouraud* bujon (SB) za ispitivanje osetljivosti gljivica. U mikrotitracione ploče sa 96 bunara dodato je po 100 µl svakog od razblaženja u duplikatu. Suspenzija mikroorganizama pravljena je dodavanjem pojedinačne kolonije u 10 ml odgovarajuće podloge, što odgovara gustini 0.5 po McFarland standardu. U suspenziju je dodat 2,3,5 trifenil tetrazolijum hlorid-TTC (100 µl za ispitivanje osetljivosti bakterija i 200 µl za ispitivanje osetljivosti gljivica), redoks indikator za detekciju ćelijske respiracije i diferenciranje metabolički aktivnih od metabolički neaktivnih ćelija. Pod uticajem dehidrogenaza TTC se redukuje do crvene boje. Po 100 µl suspenzije mikroorganizama dodato je u svaki bunarić sa razblaženjima ekstrakata, dok su u kontrolnim uzorcima bakterije dodate u 100 µl čiste podloge. Nakon 24 h inkubacije na 35°C u aerobnim

uslovima, određena je minimalna inhibitorna koncentracija za oba ekstrakta, kao najmanja koncentracija u kojoj je boja medijuma ostala nepromenjena.

Standardni sojevi mikroorganizama nabavljeni od kompanije American Type Culture Collection (ATCC) (Manasas, VA, Sjedinjene Američke Države) su: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10259). Od kompanije National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB) (Aberdeen, Škotska, Velika Britanija) nabavljen je soj *Klebsiella pneumoniae* (NCIMB 9111), dok je soj *Streptococcus mutans* klinički izolat. Oba bujona produkti su Instituta za virusologiju, vaccine i serume, Torlak (Beograd, Srbija). TTC je nabavljen od kompanije Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države).

3.14. Ispitivanje uticaja ekstrakata na produkciju glikokaliksa

Za ispitivanje produkcije glikokaliksa korišćene su dve metode Kongo-crveno agar metoda (engl. *Congo red agar method*; CRA) (Freeman i sar., 1989) i Christensenova metoda (Christensen i sar., 1982).

Uticaj ekstrakata na produkciju glikokaliksa ispitivan je na bakterijskom soju *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Za radne koncentracije odabrane su subinhibitorne koncentracije oba ekstrakta (0.5 x MIK) i sva razblaženja su pravljena u tripton soja bujonu (TSB). Bakterijski inokulum gustine 0.5 po McFarland standardu inkubiran je sa razblaženjima ekstrakata ili samo sa podlogom, u plastičnim mikrotubama na 37°C u aerobnim uslovima 24 h. Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu.

3.14.1. Kongo-crveno agar metoda

Nakon inkubacije bakterije su presejane na agar ploče sa moždano-srčanim agarom (engl. *Brain heart agar*, BH) kome je dodatno 5% saharoze i 0.08% Kongo crvene boje. Ploče su inkubirane 24 h na 37°C u aerobnim uslovima, a zatim su očitani rezultati (Freeman i sar., 1989; Cree i sar., 1995).

Prisustvo suvih, crnih, kristalnih kolonija predstavlja pozitivan rezultat, odnosno zadržana je sposobnost bakterija da produkuju glikokaliks. Prisustvo vlažnih ružičastih kolonija predstavlja negativan rezultat. Prisustvo tamnijih manje suvih i nekristalnih kolonija predstavlja nedefinisan rezultat.

3.14.2. Christensenov metod

Nakon 24 h inkubacije iz plastičnih mikrotuba odliven je sadržaj i na talog je dodan 1 ml 0.4% vodenog rastvora tripan plavog. Da bi se glikokaliks ujednačeno obojio, tube su pažljivo rotirane. Zatim je višak boje odliven, tube su sušene na vazduhu i očitani su rezultati. Obojeni talog u donjoj trećini tube smatrano je pozitivnim rezultatom i sačuvanom sposobnošću soja da produkuje glikokaliks. Odsustvo taloga smatrano je negativnim rezultatom (Christensen et al., 1982; Freeman et al., 1989).

Tripan plavo je proizvod kompanije BDH Chemicals Ltd. (London, Velika Britanija).

3.15. Ispitivanje uticaja ekstrakata na produkciju biofilma

Efekat ekstrakata *M. aquifolium* na sposobnost produkcije biofilma ispitan je na soju *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) prema protokolu Stepanovića i sar. (2007). Bakterije su resuspendovane u fiziološkom rastvoru preko noći (gustina 0.5 po McFarland standard). Serijska razblaženja ekstrakata napremljena su u TSB bujonu sa dodatkom 1% glukoze. U mikrotitracionu ploču sa 96 bunara dodato je po 180 µl svakog razblaženja u triplikatu i po 20 µl prethodno pripremljene bakterijske suspenzije. Pozitivna kontrola su bile samo bakterije u medijumu, a negativna kontrola samo medijum. Nakon 24 h inkubacije na 35°C u aerobnim uslovima, sadržaj iz bunara je izvađen multikanalnom pipetom, ploča je isprana tri puta sa po 300 µl temperiranog fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS; pH 7.2) i osušena na vazduhu. Ploče su tokom 20 minuta fiksirane sa 150 µl metanola, osušene i obojene sa 150 µl rastvora 2% kristal violeta tokom 15 minuta. Višak boje ispran je tekućom vodom. Vezana boja je oslobođena sa 150 µl 96% etanola tokom 20 minuta. Optička gustina je pročitana na 570 nm (Aparat). Izračunate su srednje vrednosti triplikata. Za

mikrotitracionu ploču određena je “cut off” vrednost (OD_c) kao srednja vrednost apsorbance negativnih kontrola uvećana za vrednost 3 standardne devijacije (srednja vrednost OD negativne kontrole + 3SD). Na osnovu vrednosti OD_c preračunati su ostali rezultati (Stepanović i sar., 2000):

$OD \leq OD_c$ - nema produkcije biofilma (kategorija 0)

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ – slaba produkcija biofilma (kategorija 1 ili +)

$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ – umerena produkcija biofilma (kategorija 2 ili ++)

$4 \times OD_c < OD$ – izražena produkcija biofilma (kategorija 3 ili +++).

Kristal violet je proizvod kompanije Himedia (Mumbai, India)

3.16. Ispitivanje efekata kombinovane primene ekstrakata i antibiotika/antimikotika sa različitim mehanizmom delovanja

Efekat kombinovane terapije ekstrakt/lek ispitan je engl. *checkerboard* metodom, koju su opisali White i sar. (1996) na *Staphylococcus aureus* i na *Candida albicans*. U eksperimentu su korišćeni antibiotici: amoksicilin, cefaleksin, ceftriakson, tetraciklin, hloramfenikol, eritromicin, gentamicin, bacitracin, nistatin i vorikonazol. Ispitivanje je obavljeno u mikrotitracionim pločama sa 96 bunara. Bakterijska suspenzija i razblaženja ekstrakata i leka pripremani su u MHB, dok je za kandidu korišćen SB. Interakcija ekstrakta i leka je određena nakon izračunavanja frakcione inhibitorne koncentracije (engl. *fractional inhibitory concentration*; FIC) i indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (eng. *fractional inhibitory concentration index*; FICI). FIC za svaku supstancu je računat deljenje MIK supstance u kombinaciji ekstrakt i lek sa MIK same supstance (npr. $FIC_{ekstrakta} = \frac{MIK_{kombinacije\ ekstrakt-lek}}{MIK_{ekstrakta}}$). FICI vrednosti su izračunate kao suma $FIC_{ekstrakta}$ i FIC_{leka} i tumačene prema sledećem kriterijumu (Hu i sar., 2002; Orhan i sar., 2005): $FICI \leq 0.5$ sinergizam; $0.5 < FICI \leq 1$ aditivnost; $1 < FICI \leq 2$ indiferentan efekat i $FICI \geq 2$ antagonizam.

4. Rezultati

4.1. Hemijska karakterizacija ekstrakata vrste *M. aquifolium*

HPLC-MS metodom analizirani su vodeni i etanolni ekstrakt vrste *M. aquifolium*. Poređenjem retencionog vremena i masenog spektra dobijenog za standardno jedinjenje sa podacima dobijenim za ispitivane ekstrakte utvrđeno je prisustvo berberina. U etanolnom ekstraktu zabeležen je veći procenat berberina (2,4%), nego u vodenom ekstraktu (1,3%). Takođe ovom metodom detektovano je prisustvo i drugih alkaloida, čija identifikacija je zahtevala dalju hemijsku analizu (Tabela 2).

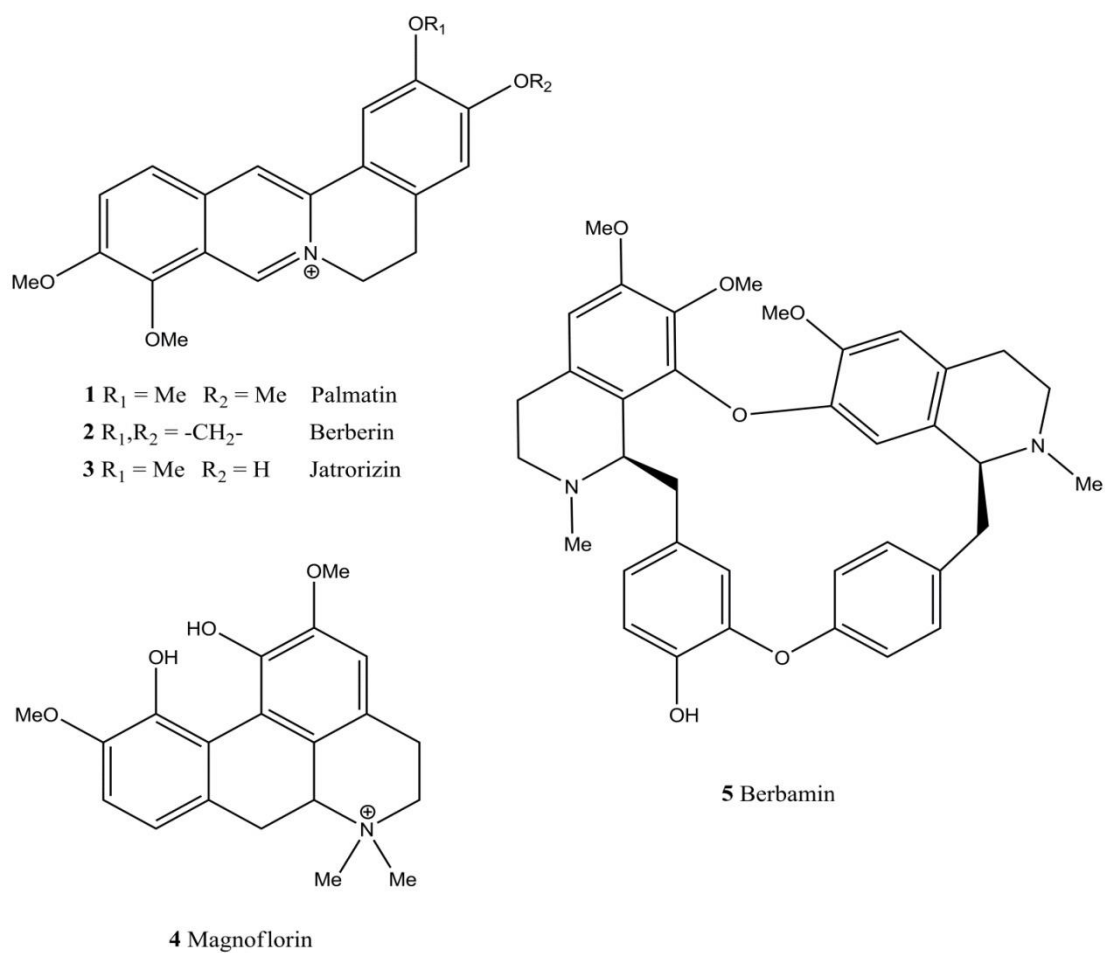
Na osnovu detaljne analize 1D i 2D NMR spektara, kao primarni metaboliti u hloroformskim, etanolnim (ekstrakcija sa 62% etanolom) i frakcionisanim ekstraktima detektovani su šećeri saharoza i glukoza, kao i nezasićene masne kiseline. Kao sekundarni metaboliti NMR spektroskopijom detektovani su protoberberinski alkaloidi (palmatin, berberin i jatrorizin), aporfinski alkaloid (magnoflorin) i bisbenzilzohinolinski alkaloid (berbamin) (Slika 4). Takođe, poređenjem NMR spektara ekstrakata koji su pripremani na različite načine uočene su razlike u njihovom sastavu. U hloroformskim i 62% etanolnim ekstraktima kao glavni sastojci detektovani su magnoflorin i protoberberinski alkaloidi. U etanolnim ekstraktima više su bili prisutni šećeri, dok su u hloroformskim ekstraktima više bili prisutni lipidi, što je u skladu sa polarnošću primenjenih rastvarača. Reekstrakcija etanolnog ekstrakta hloroformom na pH = 8 dovela je do prisustva berbamina, berberina i palmatina kao glavnih sastojaka. Reekstrakcija je značajno povećala prisustvo tercijarnog, bisbenzilzohinolinskog alkaloida berbamina zahvaljujući njegovim kiselobaznim osobinama i različitom rastvorljivošću protonovanog i neprotovanog oblika u hloroformu. U hloroformskim i etanolnim ekstraktima ovaj alkaloid prisutan je samo u tragovima (Slika 5).

Tabela 2 Rezultati HPLC-MS analize ekstrakata *M. aquifolium*

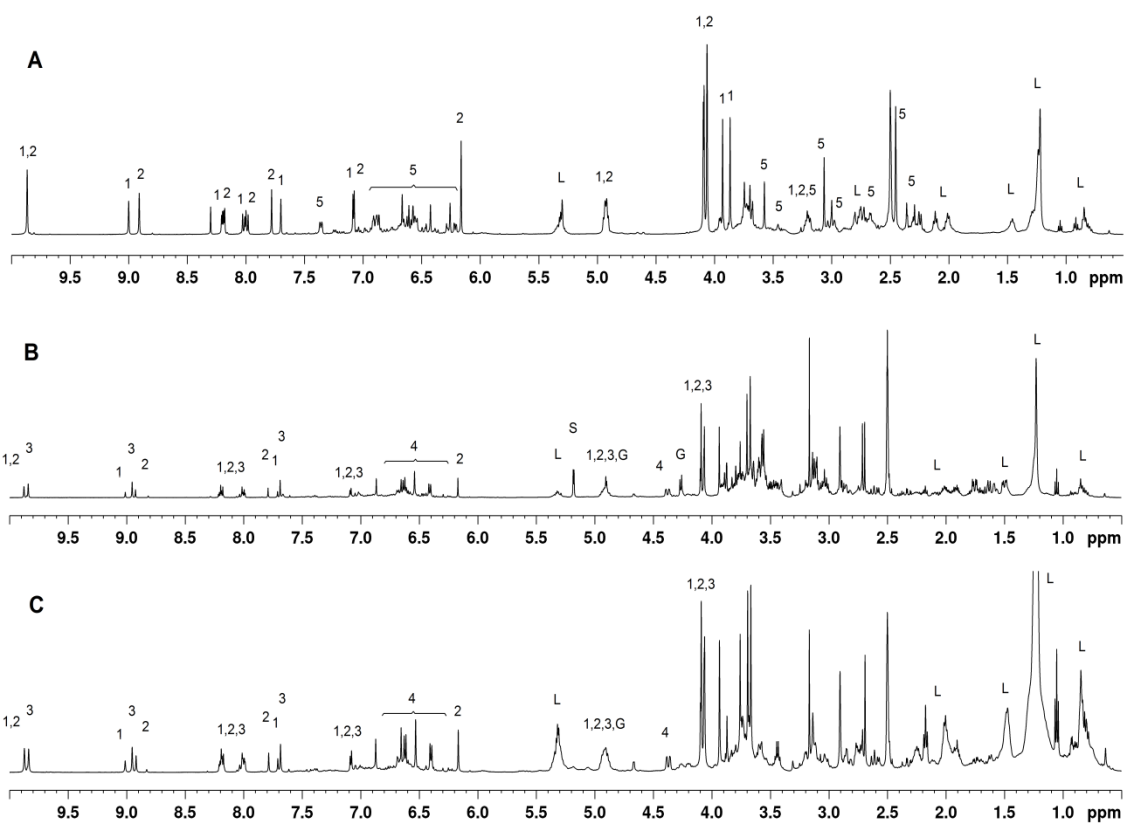
Retenciono vreme u LC/DAD hromatogramu (min) i položaj UV maksimuma (nm)	Retenciono vreme u ESI(+) ToF masenom hromatogramu (min) i izmerene m/z vrednosti identifikovanih jona	Molekulska formula i masa komponente	Izračunate m/z vrednosti identifikovanih jona	Greška merenja mase jona (ppm)	Uzorak
3,92: 214; 285	4,03: M ⁺ : 298,14335	C ₁₈ H ₂₀ NO ₃ ⁺ ; 298,14377	M ⁺ : 298,14377	-1,40	EtOH; H ₂ O
4,16; 224; 268; 302	4,28; [M+H] ⁺ : 342,17026	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄ ; 341,16271	[M+H] ⁺ : 342,16998	+0,81	EtOH; H ₂ O
4,44: 284	4,56: M ⁺ : 314,17482	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ ⁺ ; 314,17562	M ⁺ : 314,17507	-0,78	EtOH; H ₂ O
5,24: 226; 238sh; 264; 276; 346; 430	5,37; [M+H] ⁺ : 338,13889	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄ ; 337,13141	[M+H] ⁺ : 338,13868	+0,60	EtOH; H ₂ O
5,64: 224; 238sh; 266sh; 274; 338sh; 346; 428	5,78: M ⁺ : 352,15511	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺ ; 352,15488	M ⁺ : 352,15433	+2,21	EtOH; H ₂ O
5,70: 230; 236sh; 264; 276sh; 338sh; 348; 428	5,84: M ⁺ : 336,12236	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺ ; 336,12358	M ⁺ : 336,12303	-2,02	EtOH; H ₂ O

U cilju korelisanja hemijskog sastava hloroformskih, etanolnih i frakcionisanih ekstrakata sa podacima o njihovoj citotoksičnosti prema HeLa ćelijskoj liniji (Tabela 3), primenjena je metoda multivarijantne analize podataka pod nazivom ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS). Nakon prethodne obrade, ¹H NMR spektri svih ispitivanih ekstrakata su pretvoreni u brojčane vrednosti koje su uređene u vidu tabele (matrica X). Matrica Y je sadržavala IC₅₀ vrednosti koje su dobijene iz testa merenja citotoksične aktivnosti. Korelacija matrice X sa matricom Y je zatim izvršena primenom OPLS metode. U dobijenom grafiku skorova (score plot) se uočava jasno razdvajanje između uzoraka sa različitom citotoksičnom aktivnošću (Slika 6). Promenljive koje su odgovorne za ovo razdvajanje su identifikovane iz grafika

doprinosa (loading plot) (Slika 6). Ovim putem, utvrđeno je da najveći doprinos u citotoksičnoj aktivnosti imaju berberin, palmatin i berbamin.



Slika 4 Hemijske strukture alkaloida detektovanih u ekstraktima *M. aquifolium*



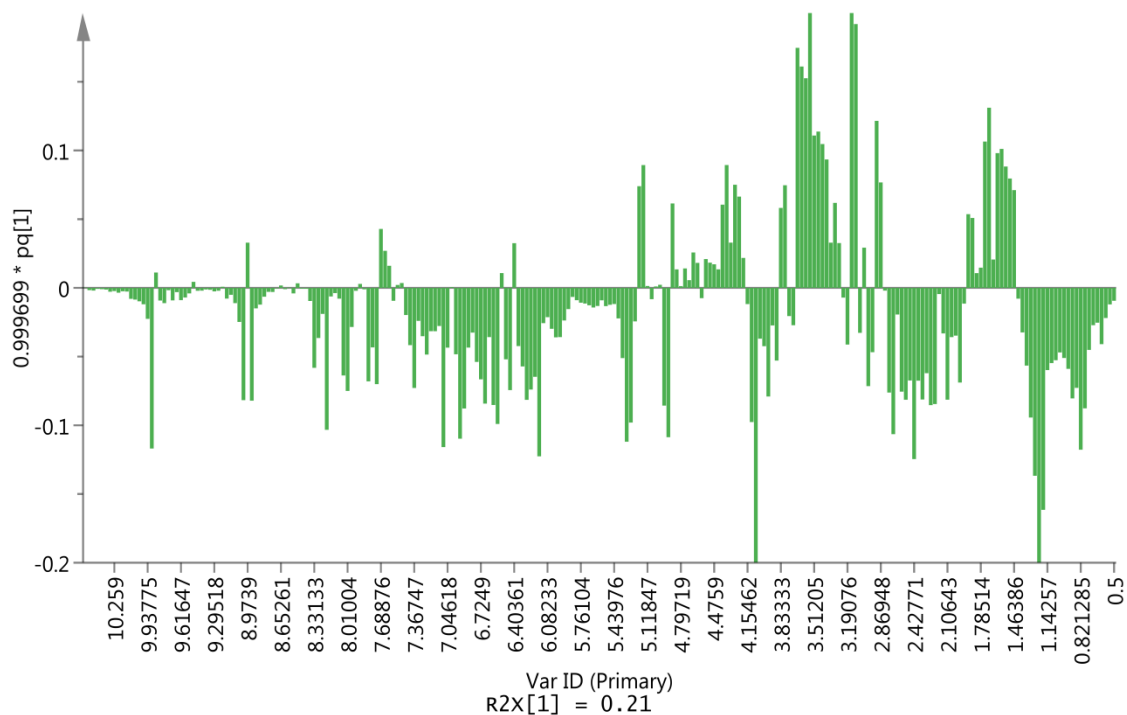
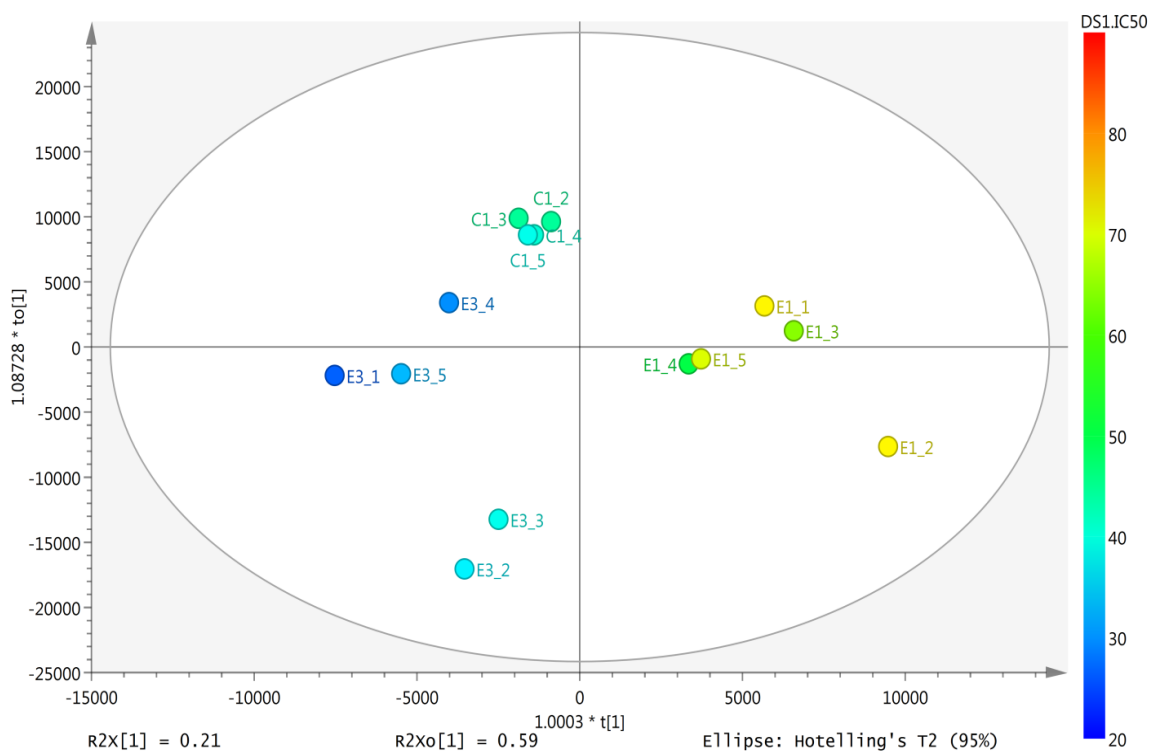
Slika 5 Reprezentativan ¹H NMR spektar ekstraktata vrste *M. aquifolium*: A- frakcionisani ekstrakt; B-62% etanolni ekstrakt; C-hloroformski ekstrakt; palmatin (1), berberin (2), jatrorizin (3), magnoflorin (4), berbamin (5), saharoza (S), glukoza (G), nezasićene masne kiseline (L).

Tabela 3 Koncentracije ekstrakata koje su za 50% inhibirale preživljavanje HeLa ćelija nakon 72 h tretmana

Tretman	IC ₅₀ (µg/ml)
	HeLa
C1_2	44.41 ± 1.15
C1_3	44.54 ± 7.51
C1_4	40.36 ± 3.20
C1_5	38.76 ± 2.65
E1_1	73.01 ± 16.22
E1_2	72.97 ± 12.22
E1_3	64.38 ± 2.35
E1_4	50.18 ± 7.81
E1_5	70.16 ± 0.69
E3_1	26.66 ± 0.18
E3_2	36.78 ± 5.50
E3_3	38.70 ± 5.74
E3_4	29.88 ± 2.70
E3_5	32.71 ± 5.38

*IC₅₀ vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti ± standardna devijacija (SD) od tri nezavisna eksperimenta

**C1-hloroformski ekstrakt *M. aquifolium*; E1-sirovi 62% etanolni ekstrakt *M. aquifolium*; E3-frakcionisani ekstrakt *M. aquifolium*



Slika 6 Grafik skorova (gore) i grafik doprinosa (dole) OPLS modela za ekstrakte vrste *M. aquifolium*. Tačke koje predstavljaju uzorke u grafiku skorova obojene su na osnovu IC_{50} vrednosti. C₁-hloroformski ekstrakti; E₁-sirovi 62% etanolni ekstrakti; E₃-frakcionisani ekstrakti.

4.2. Citotoksična aktivnost ekstrakata *M. aquifolium*, *in vitro*

Citotoksična aktivnost vodenog i etanolnog ekstrakta biljne vrste *M. aquifolium* ispitana je na humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), LS 174T (adenokarcinom kolona), A549 (adenokarcinom pluća), MDA-MB-231 (adenokarcinom dojke), K-562 (mijeloidna leukemija), kao i na normalnim ćelijskim linijama MRC-5 (fibroblasti pluća) i EA.hy926 (humane transformisane endotelijalne ćelije umbilikalne vene), *in vitro*.

Oba analizirana ekstrakta pokazala su umerenu citotoksičnu aktivnost na odabranim malignim ćelijskim linijama nakon 72 h inkubacije (Tabela 4). Najosetljivijim pokazale su se ćelije adenokarcinoma cerviksa i adenokarcinoma kolona (HeLa i LS 174T), dok su najmanje osjetljive bile ćelije adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231). Takođe, oba ispitana ekstrakta pokazala su izrazito slabu aktivnost na normalnim fibroblastima pluća, MRC-5 ćelijama. Ovaj podatak ujedno ukazuje i na dobru selektivnost ekstrakata, jer je njihova aktivnost bila tri do četiri puta slabija na normalnim ćelijama, nego na malignim ćelijama (Tabela 5).

Tabela 4 Koncentracije ekstrakata koje su za 50% inhibirale preživljavanje ćelija nakon 72 h tretmana (**IC₅₀**)

Ekstrakti	IC ₅₀ (µg/ml)					
	HeLa	LS 174T	A549	K-562	MDA-MB-231	MRC-5
MAV	42.91 ± 2.60	44.13 ± 2.87	56.36 ± 0.30	52.40 ± 4.40	191.98 ± 1.80	163.67 ± 1.29
MAE	48.60 ± 3.53	38.96 ± 9.04	51.97 ± 3.27	73.25 ± 4.60	>200.00	181.59 ± 7.82

*IC₅₀ vrednost je predstavljena kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) tri nezavisna eksperimenta

**MAV- vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE- etanolni ekstrakt *M. aquifolium*

Tabela 5 Indeks selektivnosti antitumorske aktivnosti ekstrakata

Ekstrakti	IC ₅₀ MRC-5/IC ₅₀ (maligna ćelijska linija)				
	HeLa	LS 174T	A549	K-562	MDA-MB-231
MAV	3.81	3.71	2.90	3.12	0.85
MAE	3.73	4.66	3.49	2.48	<0.91

*Indeks selektivnosti > 2.5 - dobra selektivnost

**MAV- vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE- etanolni ekstrakt *M. aquifolium*

Citotoksična aktivnost vodenog i etanolnog ekstrakta ispitana je i na humanim transformisanim endotelijalnim ćelijama umbilikalne vene (EA.hy926), nakon 24 h i 48 h. Oba ekstrakta pokazala su slab efekat na preživljavanje ovih ćelija (Tabela 6). Rezultati ovog eksperimenta korišćeni su u ispitivanju uticaja ekstrakata na migraciju ćelija i na proces angiogeneze.

Tabela 6 Koncentracije ekstrakata koje su za 50% inhibirale preživljavanje EA.hy926 ćelija nakon 24 h i 48 h

IC ₅₀ EA.hy926		
Ekstrakti	24 h	48 h
MAV	195.62 ± 6.2	199.25 ± 1.06
MAE	>200	120.65 ± 2.05

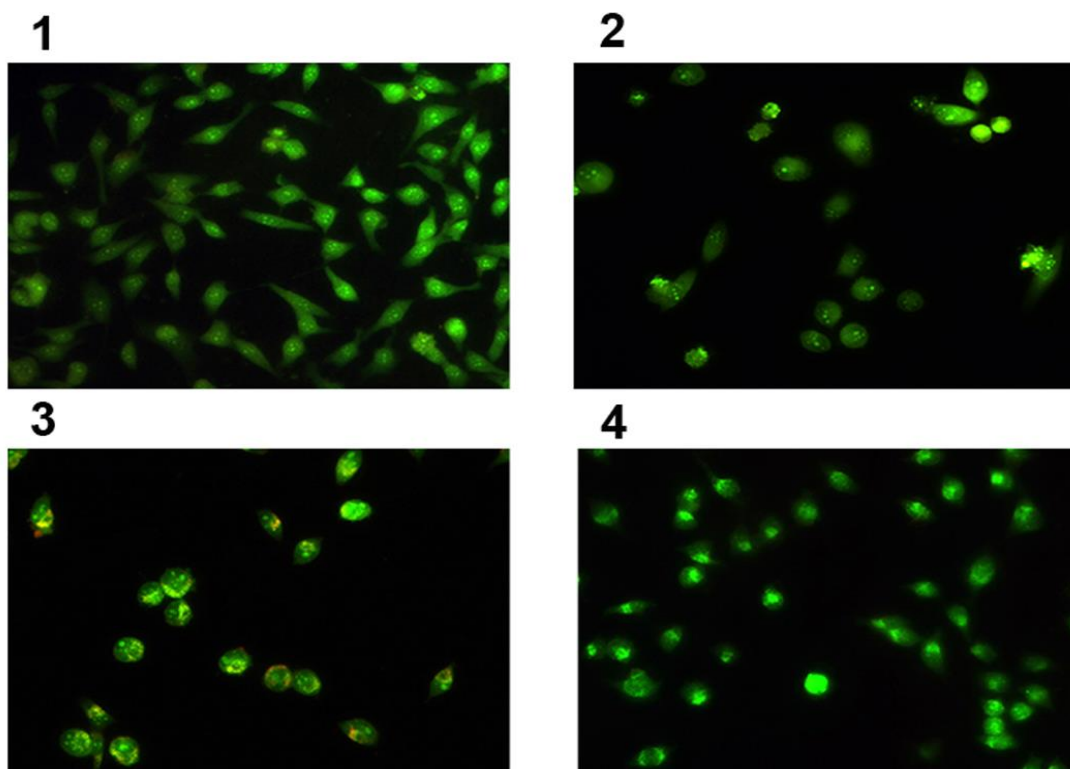
*IC₅₀ vrednost je predstavljena kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) tri nezavisna eksperimenta

**MAV- vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE- etanolni ekstrakt *M. aquifolium*

4.3. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti indukovane ekstraktima *M. aquifolium*

Da bi se ispitao i definisao tip ćelijske smrti, koju indukuju vodeni i etanolni ekstrakt biljne vrste *M. aquifolium* za ciljne ćelije odabrana je HeLa ćelijska linija, a kao pozitivna kontrola korišćena je cisplatina.

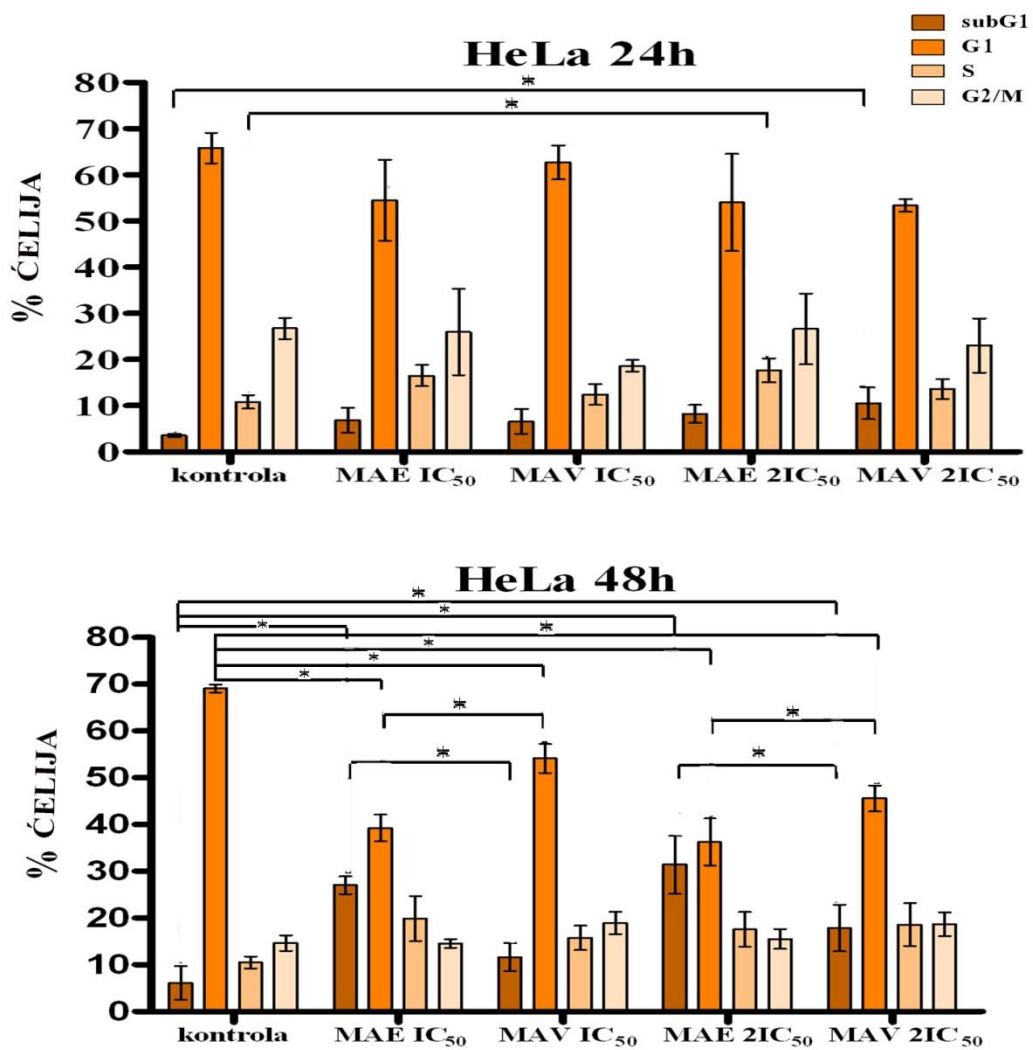
Morfološka analiza promena pokazala je da oba ispitana ekstrakta indukuju apoptozu u ciljnim, maligno transformisanim ćelijama, nakon 24 h inkubacije (Slika 7). Tipične morfološke karakteristike apoptoze uočene su kako u ćelijama koje su tretirane cisplatinom, tako i u ćelijama koje su tretirane vodenim ili etanolnim ekstraktom. Oba ekstrakta u tretiranim ćelijama dovode do skupljanja i zaokrugljivanja ćelija, kondenzacije i fragmentacije nukleusa. Ovakve promene nisu uočene u kontrolnom uzorku, gde su ćelije inkubirane samo u hranljivom medijumu.



Slika 7 Fluorescentna mikroskopija HeLa ćelija koje su obojene akridin oranž/etidijum bromidom: 1-kontrolni uzorak, 2-ćelije tretirane cisplatinom, 3-ćelije tretirane vodenim ekstraktom *M. aquifolium*, 4-ćelije tretirane etanolnim ekstraktom *M. aquifolium*

4.4. Analiza ćelijskog ciklusa

HeLa ćelije tretirane vodenim i etanolnim ekstraktom *M. aquifolium* indukuju povećanje procenta Hela ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa. Iako ovo povećanje nakon 24 h nije bilo statistički značajno, sugerisalo je da ekstrakti imaju sposobnost da uvode ćelije u proces apoptoze (Slika 8). Nakon 48 h tretmana povećanje u subG1 fazi bilo je statistički značajno kod uzoraka koji su bili tretirani etanolnim ekstraktom u obe koncentracije (IC_{50} i $2IC_{50}$) i vodenim ekstraktom u višoj koncentraciji ($2IC_{50}$), u odnosu na kontrolni uzorak (Slika 8). Takođe postojala je i statistički značajna razlika u procentu Hela ćelija u subG1 fazi između uzoraka koji su tretirani vodenim i etanolnim ekstraktom (Slika 8). Povećanje u procentu ćelija kod kojih je indukovana ćelijska smrt, udruženo je sa opadanjem broja ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolu. Takođe, u tretiranim uzorcima vidi se povećanje procenta ćelija i u S fazi ćelijskog ciklusa, a ova promena u odnosu na kontrolne uzorke ima statističku značajnost kada su ćelije tretirane etanolnim ekstraktom u koncentraciji $2IC_{50}$.

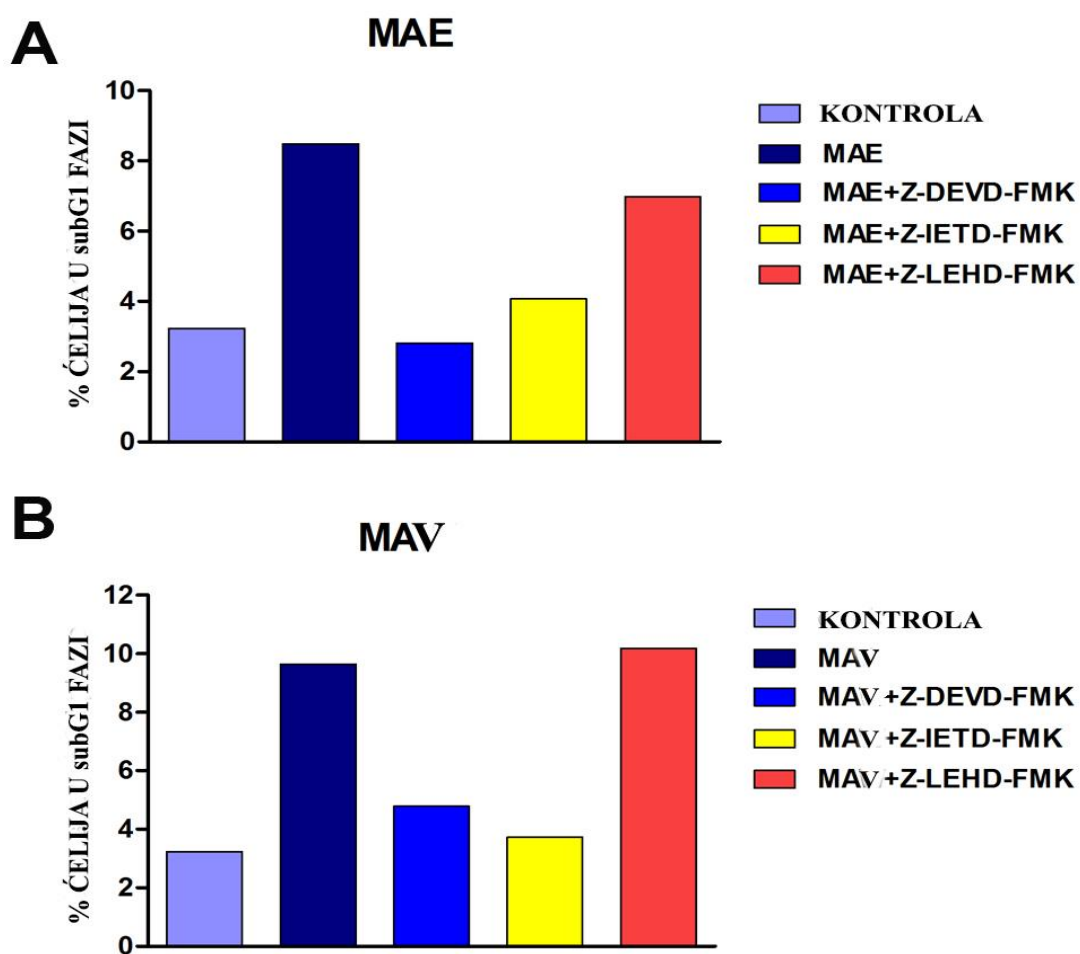


Slika 8 Promene u raspodeli HeLa ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h i 48 h tretmana sa (A) vodenim ekstraktom (MAV) i etanolnim ekstraktom (MAE).

4.5. Određivanje ciljnih kaspaza

Da bi se dalje ispitaio mehanizam dejstva, neophodno je da se se rasvetli signalni put kojim MAV i MAE ekstrakti indukuju apoptozu u HeLa ćelijama određivanjem ciljnih kaspaza.

Rezultati eksperimenta su pokazali da prisustvo specifičnog inhibitora kaspaze-3 (Z-DEVD-FMK) ili specifičnog inhibitora kaspaze-8 (Z-IETD-FMK) dovodi do značajnog sniženja u procentu apoptotskih HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na procenat istih ćelija koje nisu bile pretretirane odgovarajućim inhibitorom (Slika 9). Prisustvo specifičnog inhibitora kaspaze-9 (Z-LEHD-FMK) dovodi do blagog sniženja u procentu apoptotskih ćelija u uzorcima tretiranim etanolnim ekstraktom, dok ovo sniženje nije zabeleženo u uzorcima tretiranim vodenim ekstraktom.



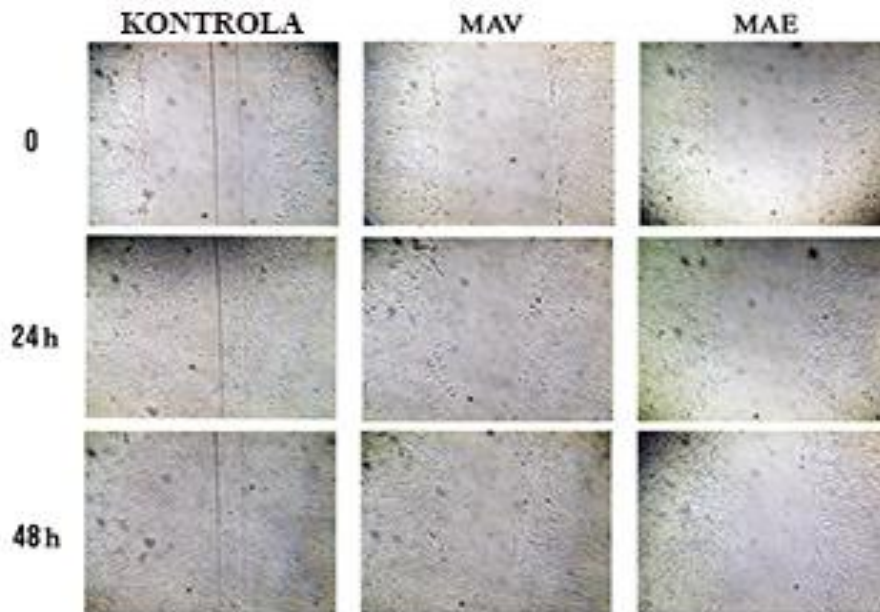
Slika 9 Efekti specifičnih inhibitora kaspaza na procenat apoptotskih HeLa ćelija nakon 24 h inkubacije sa: (A) etanolnim ekstraktom *M. aquifolium*, (B) sa vodenim ekstraktom *M. aquifolium*

4.6. Efekat ekstrakata na proces migracije ćelija

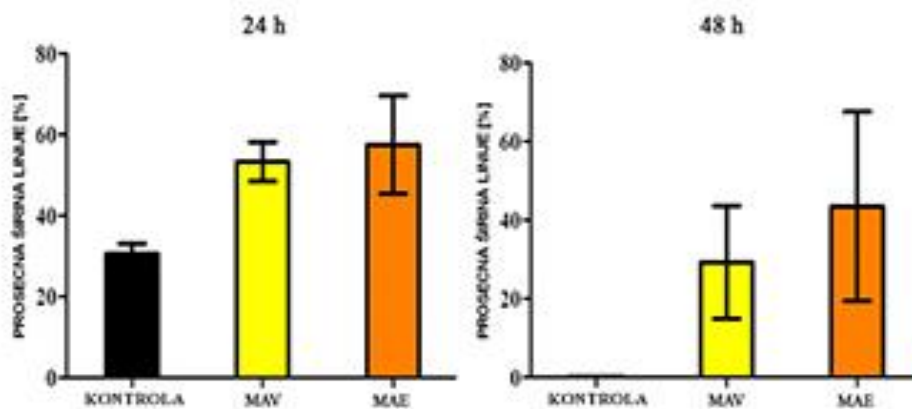
Efekat ekstrakata na proces migracije ćelija određen je primenom *in vitro* "scratch" eseja.

Oba ekstrakta *M. aquifolium* pokazala su sposobnost da inhibiraju migraciju ćelija umbilikalne vene (Slika 10). Ovaj efekat vidljiv je posle 24 h i posle 48 h tretmana. Upotrebljene koncentracije ispitivanih ekstrakata bile su subtoksične (80 µg/ml, IC₂₀) i određene su ranije izvedenim MTT testom nakon 72 h tretmana. Na osnovu širine formirane linije može se zaključiti da je efekat inhibicije ćelijske migracije izraženiji kod uzoraka tretiranih etanolnim ekstraktom, nakon 24 h i nakon 48 h. Eksperiment je ponovljen tri puta i za svaki uzorak je određeno srednje rastojanje između ćelija. Srednja vrednost širine linije, odnosno rastojanja između ćelija, izračunata je iz tri eksperimenta i predstavljena u procentima, pri čemu se širina linije u 0 h za svaki uzorak smatrala kontrolnom (100%). Na grafiku (Slika 10B) može se videti kako se rastojanje između ćelija brže smanjuje u kontrolnom, netretiranom uzorku i u 48 h iznosi 0%, dok u uzorcima tretiranim vodenim ili etanolnim ekstraktom ne dolazi do potpunog približavanja ćelija i linija formirana na početku eksperimenta zadržava se u određenom procentu i nakon 48 h tretmana.

A



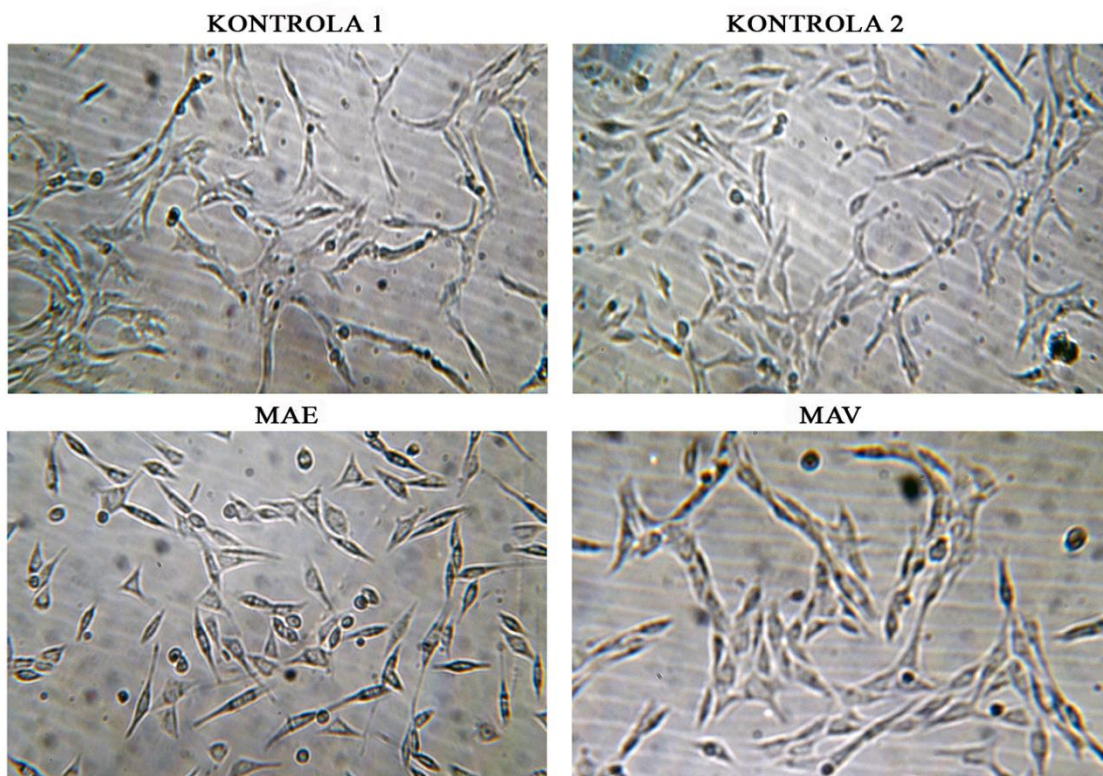
B



Slika 10 Efekat vodenog i etanolnog ekstrakta *M. aquifolium* (MAV i MAE) na migraciju EA.hy926 ćelija. (A) Reprezentativne fotografije jednog od tri nezavisna eksperimenta. (B) Kvantitativna analiza rezultata prikazanih pod A. Srednja vrednost širine formirane linije izražena u % , u odnosu na srednje vrednost širine u 0 h koja je smatrana kontrolnom i iznosi 100%.

4.7. Efekat ekstrakata na proces angiogeneze

Antiangiogenetski potencijal vodenog i etanolnog ekstrakta biljne vrste *M. aquifolium* ispitan je na EA.hy926 ćelijama *in vitro* primenom engl. "endothelial cell tube formation" eseja. Etanolni ekstrakt u subtoksičnoj koncentraciji (80 µg/ml) pokazao je značajan antiangiogenetski efekat na tretiranim ćelijama, inhibirajući povezivanje ćelija i formiranje tubularnih i poligonalnih struktura (Slika 11). Efekat vodenog ekstrakta u subtoksičnoj koncentraciji (80 µg/ml) bio je slabije izražen, uz vidljivo smanjenje broja ćelijskih veza i tubularnih struktura kod tretiranih ćelija (Slika 11). Uzorci tretirani vodenim ili etanolnim ekstraktom poređeni su sa kontrolnim uzorcima u kojima su ćelije inkubirane samo u hranljivom medijumu. Inkubacija je trajala 24 h.



Slika 11 Efekat ekstrakata *M. aquifolium* na proces angiogeneze: 1-kontrolni uzorak, 2-kontrolni uzorak, 3-ćelije tretirane etanolnim ekstraktom, 4-ćelije tretirane vodenim ekstraktom

4.8. Efekat ekstrakata na citotoksičnu aktivnost doksorubicina, *in vitro*

Kombinovani efekat doksorubicina i ekstrakata evaluiran je metodom izoblografičke analize. IC₅₀ vrednost za doksorubicin nakon inkubacije A549 ćelija tokom 72 h iznosila je 0.44±0.02 µg/ml. Nakon inkubacije ćelija sa subtoksičnim koncentracijama ekstrakata (5, 10 i 15 µg/ml) i doksorubicinom, zabeležen je porast citotoksične aktivnosti u odnosu na ćelije tretirane samo doksorubicinom (Tabela 7). Vrednost kombinatnog indeksa kreće se od 0.14 do 0.38 za doksorubicin/vodeni ekstrakt i od 0.12 do 0.4 za doksorubicin/etanolni ekstrakt kombinovani tretman, što ukazuje na izraženi sinergizam (Tabela 8).

Tabela 7 Koncentracija doksorubicina samog ili u kombinaciji sa ekstraktom, koja za 50% smanjuje preživljavanje ćelija, nakon 72 h

	IC ₅₀ (µg/ml)
	A549
DOX	0.4457 ± 0.0154
DOX + 5 µg/ml MAV	0.0234 ± 0.0022
DOX + 10 µg/ml MAV	0.0141 ± 0.0046
DOX + 20 µg/ml MAV	0.0067 ± 0.0018
DOX + 5 µg/ml MAE	0.0113 ± 0.0006
DOX + 10 µg/ml MAE	0.0103 ± 0.0016
DOX + 20 µg/ml MAE	0.0036 ± 0.0012

*IC₅₀ vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti ± standardna devijacija (SD) od tri nezavisna eksperimenta

**DOX-doksorubicin; MAV-vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE-etanolni ekstrakt *M. aquifolium*

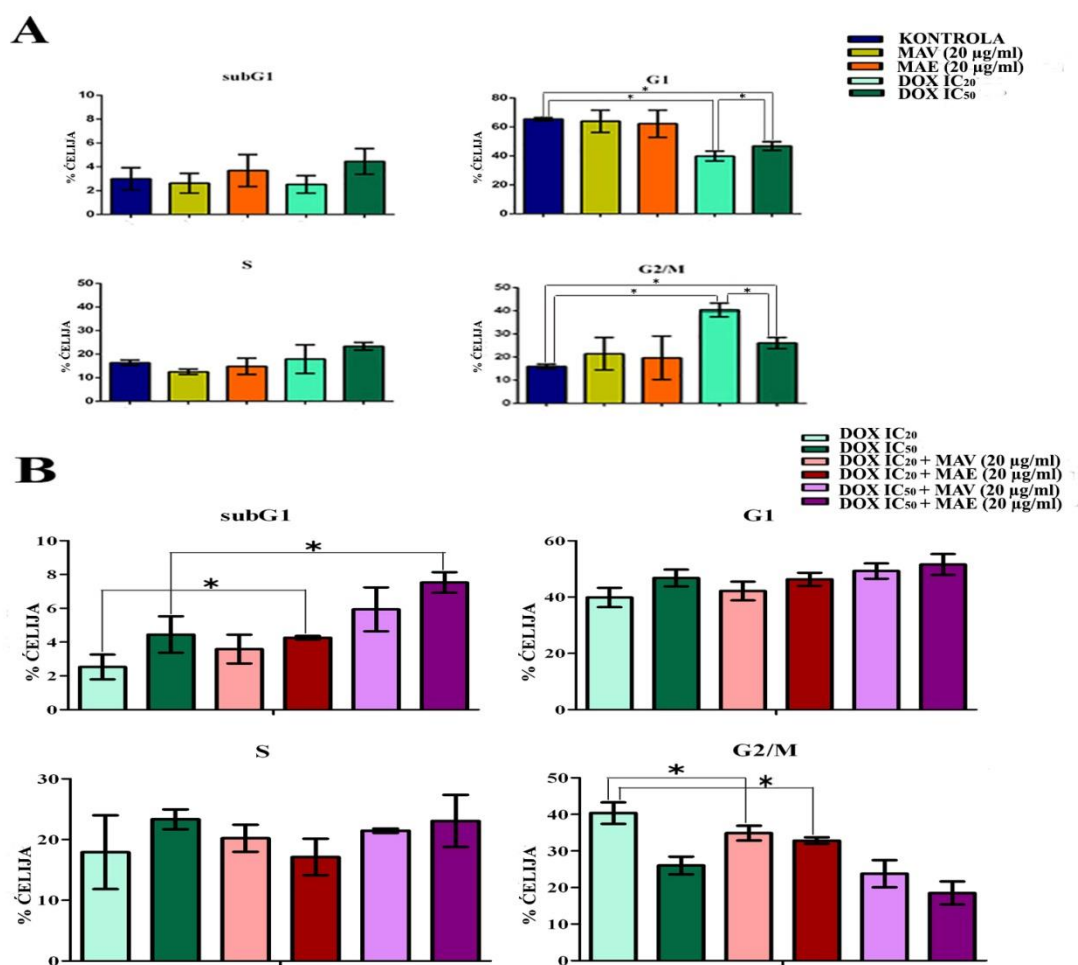
Tabela 8 Izobolografička analiza, kombinatorni indeks (CI)

Tretman	CI
	A549
DOX + 5 µg/ml MAV	0.14
DOX + 10 µg/ml MAV	0.21
DOX + 20 µg/ml MAV	0.38
DOX + 5 µg/ml MAE	0.12
DOX + 10 µg/ml MAE	0.22
DOX + 20 µg/ml MAE	0.40

*DOX-doksorubicin; MAV-vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE-etanolni ekstrakt *M. aquifolium*

4.9. Analiza ćelijskog ciklusa A549 ćelija nakon doksorubicin/ekstrakt tretmana

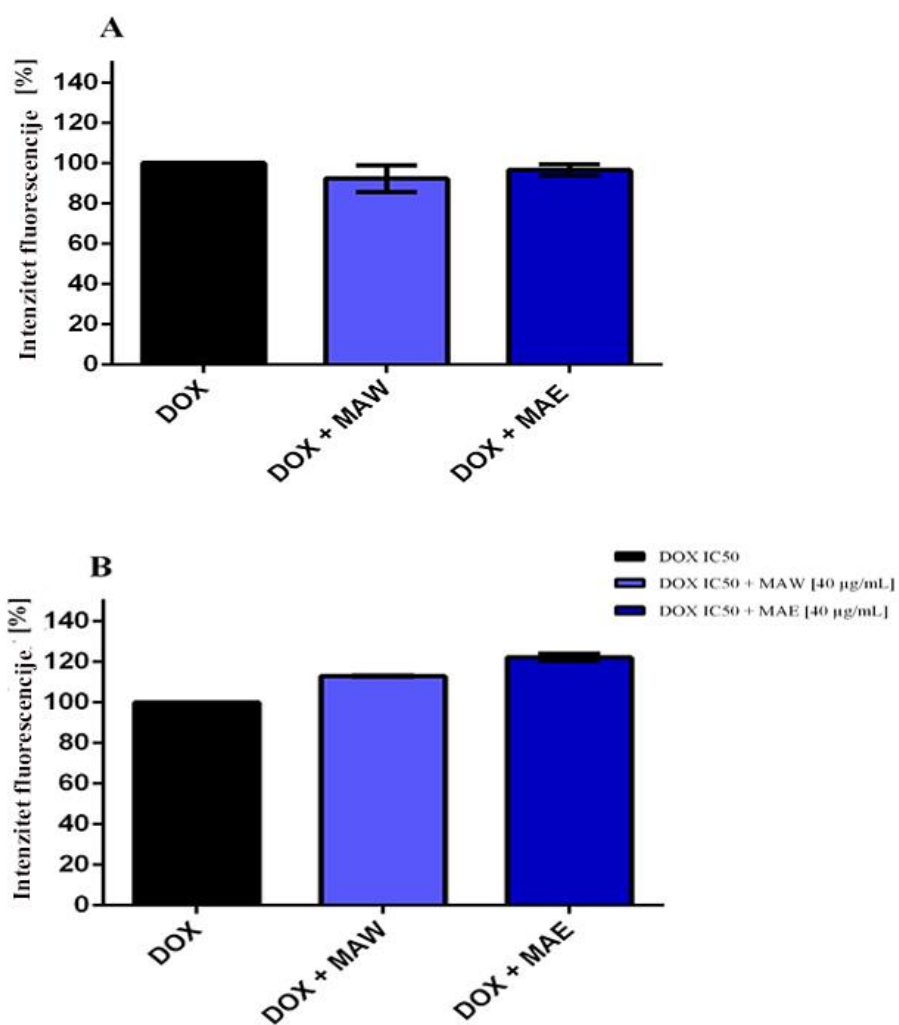
Tretman A549 ćelija sa subtoksičnim koncentracijama vodenog ili etanolnog ekstrakta u toku 24 h, doveo je do diskretnog povećanja procenta ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Inkubacija ćelija sa doksorubicinom u koncentracijama IC₂₀ i IC₅₀ doveo je do značajnog nagomilavanja A549 ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Slika 12A). A549 ćelije tretirane istovremeno sa doksorubicinom (IC₂₀ ili IC₅₀) i sa vodenim ili etanolnim ekstraktom (20 µg/mL) pokazale su nagomilavanje ćelija u G1 fazi, u poređenju sa ćelijama koje su tretirane samo doksorubicinom (Slika 12B). Takođe kombinovani tretman doksorubicin/ekstrakt doveo je do značajnog povećanja broja ćelija i u subG1 fazi, u poređenju sa uzorcima koji su tretirani samo doksorubicinom. Povećanje u subG1 fazi ćelijskog ciklusa statistički je značajno u uzorcima koji su tretirani kombinacijom doksorubicin i etanolni ekstrakt (Slika 12B).



Slika 12 Promene u raspodeli A549 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h tretmana sa (A) vodenim ekstraktom (MAV (20 µg/ml)), etanolnim ekstraktom (MAE (20 µg/ml)), doksorubicinom DOX IC₂₀ i DOX IC₅₀ u poređenju sa kontrolom; (B) kombinovanim tretmanom DOX/ekstrakt u poređenju sa čistim doksorubicinom.

4.10. Uticaj ekstrakata na preuzimanje i zadržavanje doksorubicina

U eksperimentu u kome je ispitan uticaj ekstrakata na preuzimanje doksorubicina, A549 ćelije su tretirane samo rastvorom doksorubicina u koncentraciji IC₅₀ ili kombinacijom rastvora doksorubicina u istoj koncentraciji i vodenim ili etanolnim ekstraktom u subtoksičnoj koncentraciji 40 µg/ml. U ovom slučaju nije primećena značajna promena u preuzimanju doksorubicina bez obzira da li su ćelije tretirane i ispitivanim ekstraktima ili samo doksorubicinom (Slika 13A). U eksperimentu u kome je ispitan uticaj ekstrakata na zadržavanje doksorubicina, A549 ćelije su prvo tretirane samo doksorubicinom u koncentraciji IC₅₀, a nakon 24 h i subtoksičnim koncentracijama vodenog ili etanolnog ekstrakta (40 µg/ml). Rezultati su pokazali da A549 ćelje koje su tretirane vodenim ili etanolnim ekstraktom *M.aquifolium* zadržavaju značajno više doksorubicina u ćeliji (do 22% više) nego ćelije koje su nakon doksorubicina tretirane samo medijumom (Slika 13B).



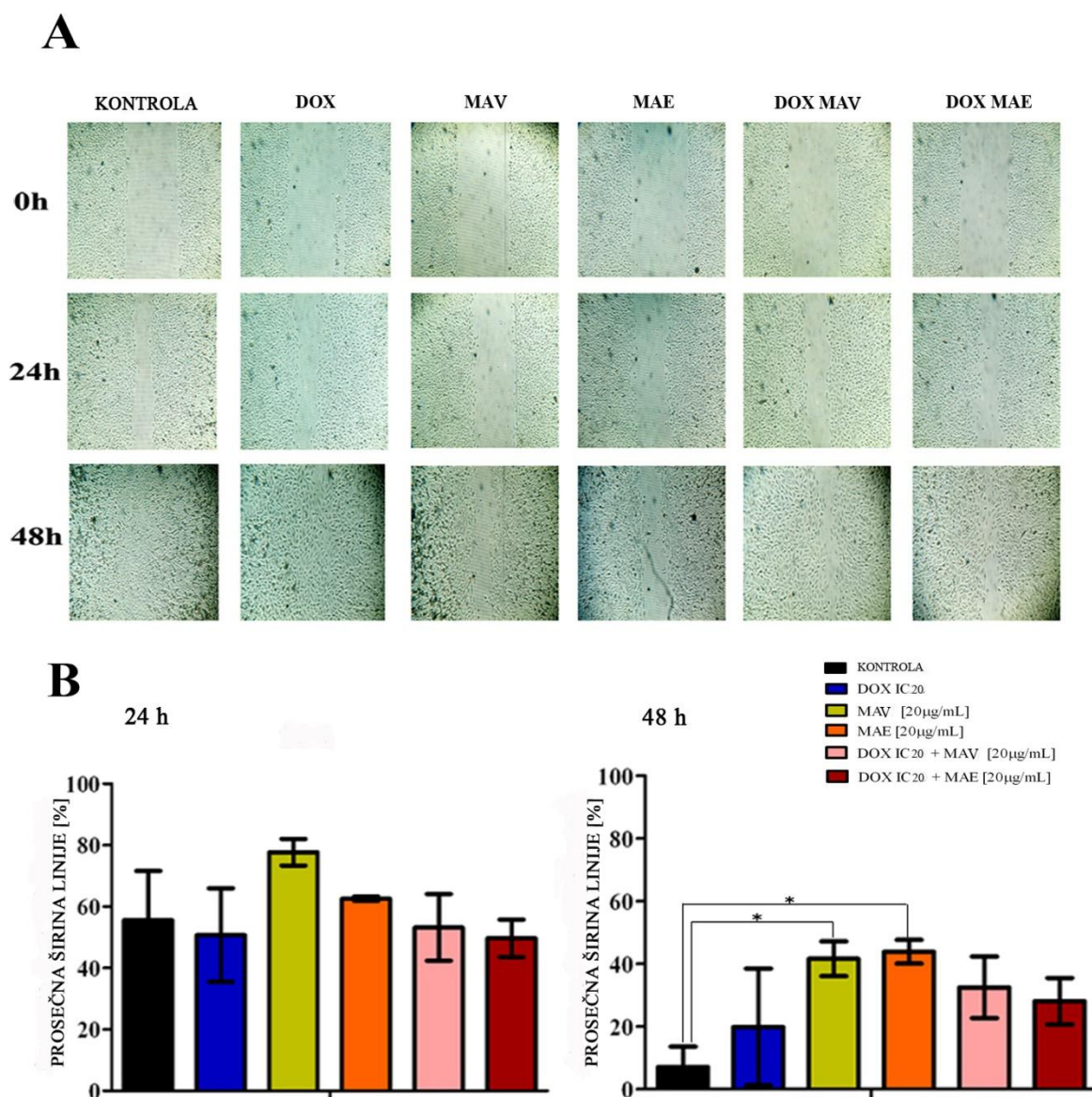
Slika 13 Efekat vodenog i etanolnog ekstrakta *M. aquifolium* na preuzimanje (A) i zadržavanje (B) doksorubicina u A549 ćelijama

4.11. Uticaj kombinovanog tretmana doksorubicin/ekstrakt na migraciju ćelija

Ispitivane A549 ćelije tretirane su rastvorom doksorubicina u koncentraciji IC₂₀, ekstraktima u koncentraciji 20 µg/ml ili kombinacijom doksorubicina i vodenog/etanolnog ekstrakta u istim navedenim koncentracijama. Sve korišćene koncentracije su subtoksične i njihove vrednosti dobijene su prethodno urađenim MTT testom na A549 ćelijama u trajanju od 72 h.

Oba ekstrakta pokazala su dobru sposobnost da inhibiraju migraciju A549 ćelija u odnosu na kontrolu, ili na ćelije koje su tretirane samo doksorubicinom, i nakon 48 h smanjenje migracije pokazalo se kao statistički značajno u oba uzorka, koja su tretirana ekstraktima (Slika 14). Sam doksorubicin nije pokazao uticaj na ćelijsku migraciju, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Ćelije tretirane kombinovanim tretmanom doksorubicin/vodeni ili etanolni ekstrakt pokazale su značajno smanjenje migratorne sposobnosti posebno nakon 48 h, u odnosu na kontrolu (Slika 14).

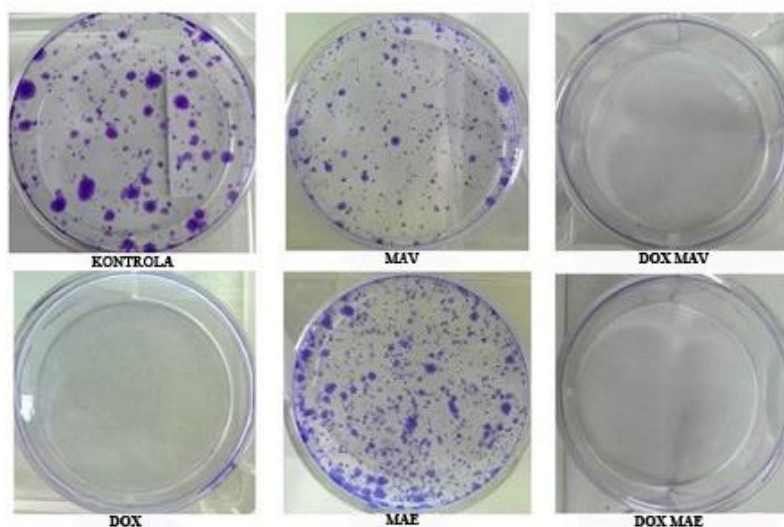
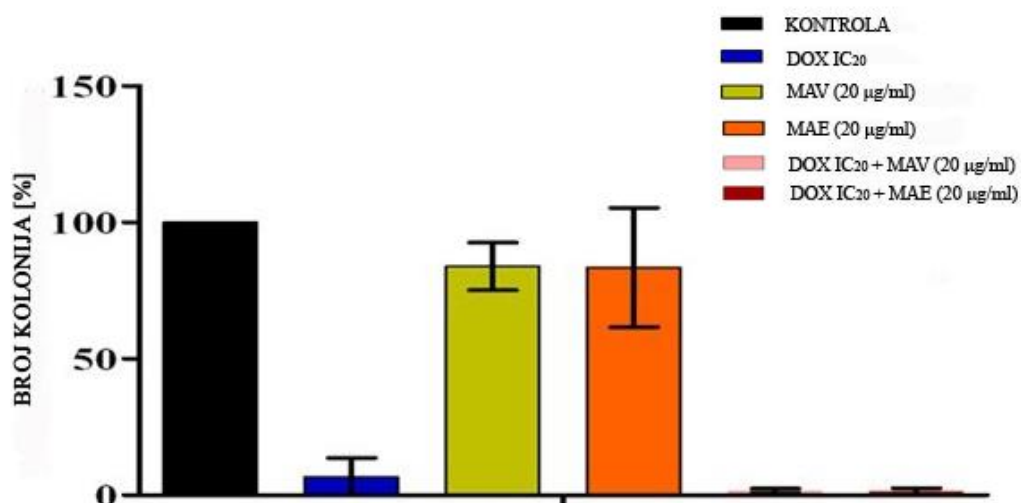
Eksperiment je ponovljen tri puta i za svaki uzorak je određeno srednje rastojanje između ćelija, a srednja vrednost širine linije izračunata je iz tri eksperimenta i predstavljena u procentima, pri čemu se širina linije u 0 h za svaki uzorak smatrala kontrolnom (100%).



Slika 14 Efekat vodenog i etanolnog ekstrakta *M. aquifolium* (MAV i MAE) i doksorubicina (DOX) na migraciju A549 ćelija. (A) Reprezentativne fotografije jednog od tri nezavisna eksperimenta. (B) Kvantitativna analiza rezultata prikazanih pod (A), predstavlja srednju vrednost širine linije u % izračunatu iz tri nezavisna eksperimenta, pri čemu je širina linije za svaki uzorak u 0 h kontrolna i iznosi 100%.

4.12. Uticaj ekstrakata i doksorubicina na formiranje ćelijskih kolonija

Zasejane ćelije tretirane su subtoksičnim koncentracijama doksorubicina (IC_{20}), vodenog i etanolnog ekstrakta ($20 \mu\text{g/ml}$) ili kombinacijom doksorubicin/ekstrakt. Nakon 24 h ćelije su ostavljene sedam dana da rastu samo u medijumu, nakon čega se procenjivala njihova sposobnost da formiraju kolonije. Rezultati su pokazali da doksorubicin i u subtoksičnim koncentracijama izrazito smanjuje sposobnost ćelija da formiraju kolonije. Oba ekstrakta, vodeni i etanolni, nisu pokazali značajan uticaj na formiranje kolonija. Kombinovani tretman doksorubicin/vodeni ili etanolni ekstrakt pokazao je značajan efekat inhibicije formiranja kolonija, u poređenju sa uzorcima koji su tretirani samo doksorubicinom (Slika 15). Za svaki uzorak izračunat je odnos broja formiranih kolonija i gustine ćelija. Srednja vrednost ovog odnosa određena je iz tri nezavisna eksperimenta.

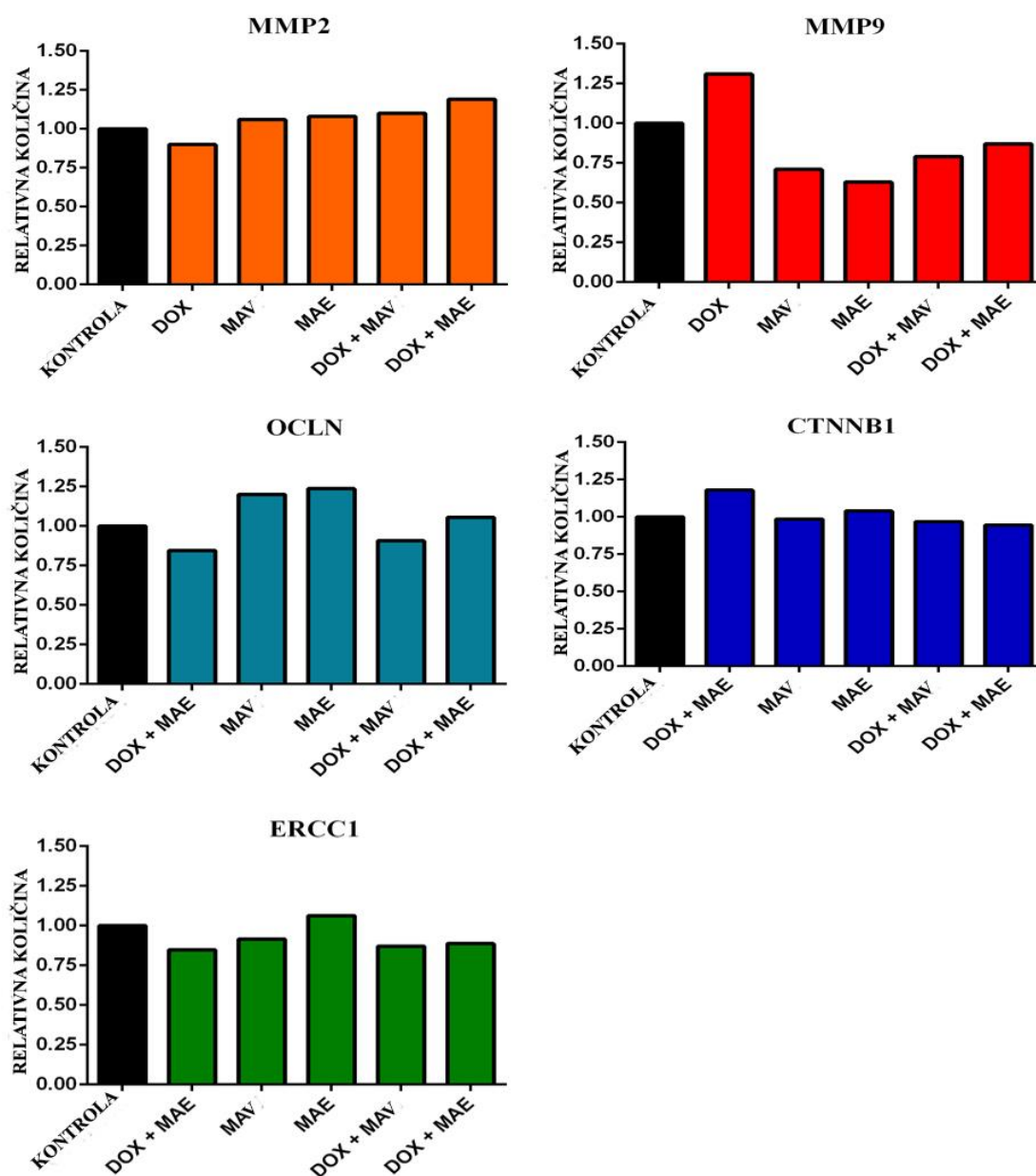
A**B**

Slika 15 Efekat vodenog i etanolnog ekstrakta *M. aquifolium* (MAV i MAE) i doksorubicina (DOX) na sposobnost A549 ćelija da formiraju kolonije. (A) Reprezentativni eksperiment, fotografije kolonija nakon tretmana. (B) Kvantitativna analiza rezultata prikazanih pod (A). Srednja vrednost odnosa broja formiranih kolonija i gustine ćelija za svaki uzorak, određena iz tri nezavisna eksperimenta.

4.13. Analiza genske ekspresije A549 ćelija

Nivoi genske ekspresije u tretiranim A549 ćelijama poređeni su sa nivoima u netretiranim, kontrolnim ćelijama, koje su gajene samo u hranljivom medijumu. Odabrani geni *MMP2* i *MMP9* odgovorni su za invazivnost i migraciju tumorskih ćelija, geni *OCLN* i *CTNNB1* za formiranje međućelijskih veza, dok gen *ERCC1* učestvuje u procesu reparacije genetskog materijala.

Tretman doksorubicinom smanjuje ekspresiju *MMP2*, dok oba kombinovana tretmana doksorubicin/ekstrakt blago povećavaju ekspresiju ovog gena. Ekspresija *MMP9* povećana je nakon inkubacije ćelija samo sa doksorubicinom, dok su oba kombinovana tretmana doksorubicin/ekstrakt značajno smanjila *MMP9* ekspresiju. Tretman doksorubicinom smanjuje ekspresiju *OCLN*. Oba ekstrakta pojedinačno, kao i tretman doksorubicin/etanolni ekstrakt indukuju ekspresiju *OCLN* u poređenju sa kontrolom, dok je ekspresija *OCLN* u ćelijama tretiranim sa kombinovanim tretmanom doksorubicin/vodeni ekstrakt povećana u odnosu na nivo ovog gena u ćelijama koje su tretirane samo doksorubicinom. Doksorubicin indukuje ekspresiju *CTNNB1*. Ekspresija *CTNNB1* blago je smanjena nakon inkubacije ćelija sa kombinovanim tretmanom doksorubicin/etanolni ekstrakt, u poređenju sa netretiranim ćelijama. Ćelije tretirane samo etanolnim ekstraktom pokazale su blago povećanje u ekspresiji *ERCC1*, dok je inhibicija ove ekspresije zabeležena u uzorcima tretiranim samo sa doksorubicinom, vodenim ekstraktom ili kombinovanim tretmanom doksorubicin/ekstrakt (Slika 16).



Slika 16 Efekat vodenog i etanolnog ekstrakta *M. aquoufolium* (MAV i MAE), doksorubicina (DOX) i kombinovanog tretmana doksorubicin/ekstrakt na ekspresiju gena u A549 ćelijama

4.14. Efekat ispitivanih ekstrakta na osetljivost mikroorganizama

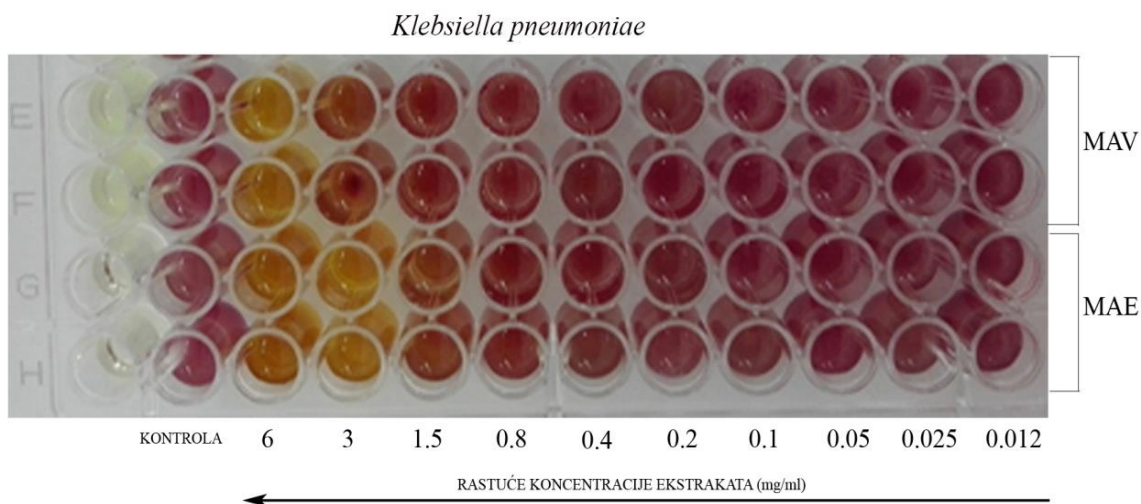
Vodeni i etanolni ekstrakt *M. aquifolium* ispoljili su antimikrobni efekat na ispitivanim sojevima (Tabela 9). Vrednosti MIK za etanolni ekstrakt su od 0.8 do 3.5 mg/ml, dok su za vodeni od 1.6 do 3.25 mg/ml. Etanolni ekstrakt pokazao je jači efekat prema svim sojevima od vodenog ekstrakta. Vrsta *S. aureus* je najosetljivija na oba ekstrakta. Najmanju osetljivost pokazali su sojevi *K. pneumoniae* i *C. albicans*.

Tabela 9 Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ekstrakata za ispitivane sojeve nakon 24 h tretmana

	MIK (mg/ml)					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
MAV	1.6	1.6	3	3.25	6	6
MAE	0.8	0.8	1.75	0.9	3	3.5

*MIK-minimalna inhibitorna koncentracija

**MAV- vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE- etanolni ekstrakt *M. aquifolium*



Slika 17 Ispitivanje osetljivosti *K. pneumoniae* na ekstrakte. MAV-vodeni ekstrakt *M. aquifolium*, MAE-etanolni ekstrakt *M. aquifolium*. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za MAV iznosi 6 mg/ml, za MAE iznosi 3 mg/ml.

4.15. Efekat ekstrakata na produkciju biofilma

Uticaj vodenog i etanolnog ekstrakta *M. aquifolium* na produkciju biofilma ispitan je na soju *S. aureus*. Bakterije su inkubirane sa različitim razblaženjima ekstrakata (od 0.015 mg/ml do 0.4 mg/ml) tokom 24 h. Sva ispitana razblaženja predstavljala su subinhibitorne koncentracije za odabrani bakterijski soj. Kontrolni uzorci inkubirani su samo u hranljivom medijumu i pokazali su izraženu produkciju biofilma nakon 24 h (kategorija 3). Bakterije tretirane vodenim ili etanolnim ekstraktom nakon 24 h pokazale su umerenu produkciju biofilma (Tabela 10). Oba ekstrakta pokazala su potencijal da umereno inhibiraju svojstvo bakterija da formiraju biofilm u *in vitro* uslovima.

Tabela 10 Produkcija biofilma *S. aureus* soja nakon 24 h kultivacije sa ekstraktima

Tretman	Kategorija
MAV (mg/ml)	
0.015	2
0.03	2
0.05	2
0.1	2
0.2	2
0.4	2
MAE (mg/ml)	
0.015	2
0.03	2
0.05	3
0.1	2
0.2	2
0.4	2

*0-odsustvo produkcije biofilma; 1-slaba produkcija biofilma; 2-umerena produkcija biofilma; 3-izražena produkcija biofilma

**MAV- vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE- etanolni ekstrakt *M. aquifolium*

4.16. Efekat ekstrakata na produkciju glikokaliksa

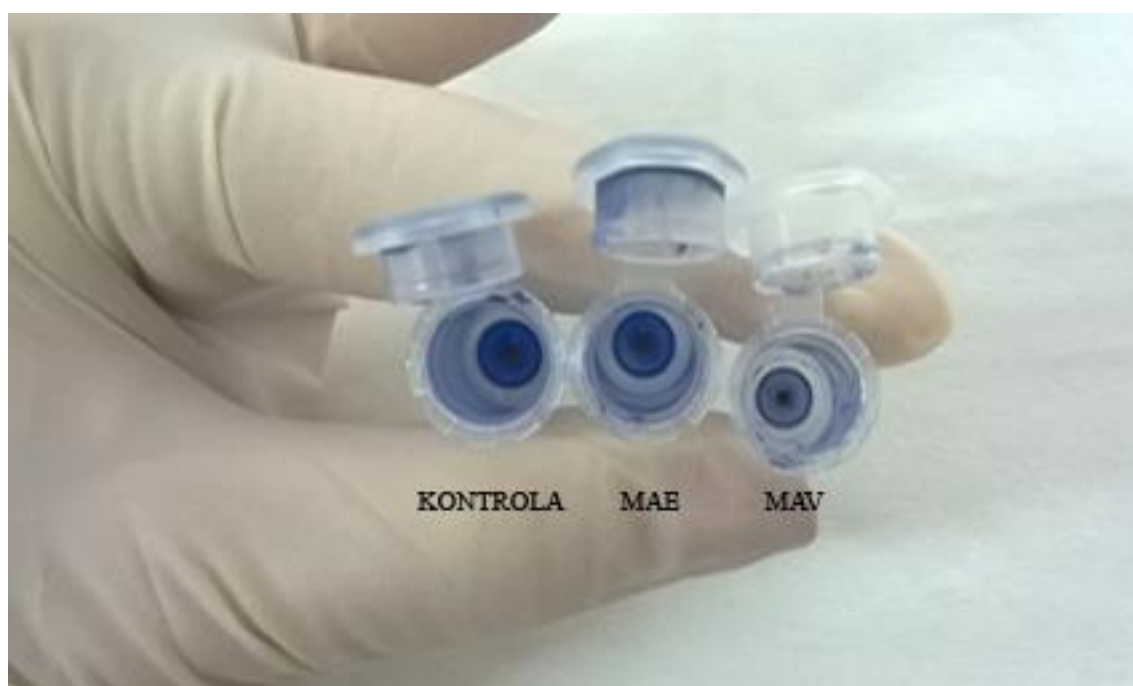
Za ispitivanje uticaja vodenog i etanolnog ekstrakta *M. aquifolium* na produkciju glikokaliksa odabran je soj *S. aureus*, a korišćene su dve metode: CRA i Christensenova metoda. U oba eksperimenta razblaženja ispitivanih ekstrakata predstavljala su subinhibitorne koncentracije za odabrani bakterijski soj. Za oba ekstrakta one su iznosile 0.5xMIK za soj *S. aureus*, odnosno 0.4 mg/ml za etanolni ekstrakt i 0.8 mg/ml za vodeni ekstrakt.

Analiza rezultata dobijenih CRA metodom pokazala je da oba ekstrakta imaju sposobnost da inhibiraju produkciju glikokaliksa. Bakterije tretirane etanolnim ekstraktom u značajnoj meri su izgubile sposobnost da formiraju glikokaliks, što se vidi prisustvom vlažnih ružičastih kolonija. Takođe, uzorci tretirani etanolnim ekstraktom imali su znatno manje suvih crnih kolonija u poređenju sa kontrolnim uzorkom (Slika 18). Bakterije tretirane vodenim ekstraktom u manjoj meri su izgubile sposobnost za produkciju glikokaliksa. Na ovim uzorcima detektovane su crne vlažne kolonije, što sugeriše da je pod uticajem vodenog ekstrakta došlo do morfoloških promena na soju, što je uticalo na formiranje drugačijih kolonija u poređenju sa kontrolom (Slika 18).



Slika 18 Produkcija glikokaliksa ispitana CRA metodom. Uzorak tretiran etanolnim ekstraktom *M. aquifolium* (MAE) pokazuje smanjenu produkciju glikokaliksa. Uzorak tretiran vodenim ekstraktom *M. aquifolium* (MAV) pokazuje smanjenu produkciju glikokaliksa i prisustvo morfološki izmenjenih kolonija u odnosu na kontrolu.

Rezultati dobijeni Christensenovom metodom pokazali su da uzorci tretirani etanolnim ekstraktom manje proizvode glikokaliks u odnosu na kontrolu (Slika 19). Kod uzoraka tretiranih vodenim ekstraktom pored inhibicije u produkciji glikokaliksa vidi se i razlika u bojenju u poređenju sa kontrolom, što potvrđuje da je došlo do morfoloških promena na samom soju (Slika 19).



Slika 19 Produkcija glikokaliksa određena Christensen-ovom metodom. Uzorak tretiran etanolnim ekstraktom *M. aquifolium* pokazuje smanjenje u produkciji glikokaliksa. Uzorak tretiran vodenim ekstraktom *M. aquifolium* pokazuje smanjenje u produkciji glikokaliksa i promene u bojenju u odnosu na kontrolu.

4.17. Efekat istovremene primene ekstrakata i antibiotika/antimikotika

U prvom delu eksperimenta određene su MIK za odabrane antibiotike na soju *S. aureus* i za odabrane antimikotike za soj *C. albicans* (Tabele 11 i 12).

Tabela 11 Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) antibiotika za ispitivani soj *S. aureus* nakon 24 h tretmana

	MIK (µg/ml)
	<i>S. aureus</i>
Amoksicilin	200
Cefaleksin	200
Ceftriakson	12.5
Tetraciklin	200
Eritromicin	200
Gentamicin	0.78
Hloramfenikol	200
Bacitracin	200

*MIK-minimalna inhibitorna koncentracija

Tabela 12 Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) antimikotika za ispitivani soj *C. albicans* nakon 24 h tretmana

	MIK (µg/ml)
	<i>C. albicans</i>
Nistatin	3.125
Vorikonazol	6.25

*MIK-minimalna inhibitorna koncentracija

Efekat kombinacije antibiotika/antimikotika i ekstrakata *M. aquifolium* se kretao između sinergizma i aditivnosti. Dobijene FICI vrednosti su u opsegu od 0.03 do 0.56 (Tabela 13 i 14). Najznačajniji sinergizam utvrđen je u kombinaciji tetraciklina i ekstrakata, a najslabiji sinergizam i aditivni efekat zabeleženi su u kombinacijama ekstrakata sa eritromicinom i bacitracinom.

Tabela 13 Efekat kombinacije antibiotika i ekstrakata *M. aquifolium*

<i>S.aureus</i>		
	MAV	MAE
Amoksisilin	0.56	0.06
Cefaleksin	0.31	0.31
Ceftriakson	0.13	0.10
Tetraciklin	0.06	0.03
Eritromicin	0.50	0.50
Gentamicin	0.19	0.16
Hloramfenikol	0.09	0.09
Bacitracin	0.56	0.31

*MAV-vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE-etanolni ekstrakt *M. aquifolium*.

*FICI \leq 0.5 sinergizam, $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ aditivnost i $1 < \text{FICI} \leq 2$ indiferentan efekat

Tabela 14 Efekat kombinacije antimikotika i ekstrakata *M. aquifolium*

<i>C. albicans</i>		
	MAV	MAE
Nistatin	0.21	0.18
Vorikonazol	0.21	0.18

*MAV-vodeni ekstrakt *M. aquifolium*; MAE-etanolni ekstrakt *M. aquifolium*.

*FICI \leq 0.5 sinergizam, $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ aditivnost i $1 < \text{FICI} \leq 2$ indiferentan efekat

5. Diskusija

Osnovni ciljevi u savremenoj farmakoterapiji, bez obzira na veliki broj lekova danas, su pronalaženje novih i još efikasnijih agenasa. Ovo se posebno odnosi na agense sa antitumorskim i antimikrobnim delovanjem, jer se u oba slučaja javlja problem rezistencije koji bitno utiče na efikasnost procesa izlečenja. Takođe od velikog značaja u terapiji je i selektivnost novih preparata. U lečenju onkoloških oboljenja, cilj je da se zaštiti zdrava ćelija odnosno tkivo, čime bi se osim funkcionalnosti organa očuvao i kvalitet života obolelih. U farmakološkom tretmanu infekcija, dobra selektivnost leka doprinosi očuvanju mikrobioma, čime se pospešuje odbrambeni potencijal samog organizma.

Dosadašnji literaturni podaci sugerisali su da biljna vrsta *M. aquifolium* po svojim farmakološkim osobinama, može posedovati i značajan antikancerski potencijal (He i Mu, 2015). Naše istraživanje u okviru doktorske disertacije po prvi put je dovelo do novih saznanja o antitumorskom i antimikrobnom dejstvu ekstrakata iz vrste *M. aquifolium*.

Postojeći podaci o ekstraktima predstavnika roda *Mahonia*, *M. oiwakensis* i *M. balei*, kao i o pojedinačnim izolovanim alkaloidima pokazuju njihovu sposobnost da inhibiraju rast različitih humanih maligno transformisanih ćelijskih linija (Hu i sar., 2011; Wong i sar., 2009). Naši rezultati potvrdili su da biljke roda *Mahonia*, u čiji sastav ulaze protoberberinski i bisbenzilohinolinski alkaloidi poseduju citotoksični efekat.

In vitro MTT test citotoksičnosti pokazao je da ispitivani ekstrakti, etanolni i vodeni, ispoljavaju selektivnu dozno zavisnu citotoksičnost. Oba ekstrakta najbolju aktivnost pokazali su prema ćelijskim linijama HeLa i LS174T, odnosno prema ćelijama adenokarcinoma cerviksa i kolona. Na drugom mestu po osetljivosti su linije A549 i K562, ćelije adenokarcinoma pluća i mijeloidne leukemije. Ćelije adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 bile su rezistentne na dejstvo oba ispitana ekstrakta. Prema evaluaciji koju predlaže protokol američkog nacionalnog instituta za rak (engl. *National Cancer Institute* – NCI) sve vrednosti $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ za sirove biljne ekstrakte se smatraju veoma značajnim (Geran i sar., 1972). Iz naših rezultata možemo zaključiti da su vodeni i etanolni ekstrakti prema četiri maligne ćelijske linije pokazali umerenu

citotoksičnu aktivnost. IC₅₀ vrednosti oba ekstrakta za svaku ispitanu liniju su bile slične, što je ukazivalo na sličan sastav aktivnih principa, a što je i potvrđeno HPLC/MS hemijskom analizom. Takođe je značajno napomenuti da su ispitivani ekstrakti prema normalnim fibroblastima pluća pokazali izrazito slabu citotoksičnost. Iz indeksa selektivnosti antitumorske aktivnosti, čije su vrednosti kod svih ćelijskih linija bile veće od 2.5, osim kod rezistentnog adenokarcinoma dojke, može se zaključiti da oba ekstrakta pokazuju izuzetno dobru selektivnost. Poređenja radi, vrednosti za indeks selektivnosti leka cisplatine na HeLa i LS174T ćelijskoj liniji iznosile su 2.16 i 0.5 (Damjanovic i sar., 2015), iz čega se može zaključiti da ispitivani ekstrakti imaju znatno nižu toksičnost od cisplatine.

Podaci iz literature o pojedinačnim alkaloidima, glavnim aktivnim principima predstavnika roda *Mahonia*, ukazuju da ovi biljni metaboliti poseduju citotoksični efekat. Berberin značajno smanjuje preživljavanje mnogih humanih maligno transformisanih ćelija (Lin, 1996; Jabbarzadeh Karboli i sar., 2014). Alkaloidi palmatin, jatrorizin i berbamin takođe su pokazali citotoksičnost na različitim malignim ćelijskim linijama (Rahmatullah i sar., 2014; Liu i sar., 2013; Hambright i sar., 2015). Nakon izvršene hemijske identifikacije utvrđeno je prisustvo ovih alkaloida u ispitivanim ekstraktima i potvrđeni su podaci prethodnih studija, da su upravo alkaloidi glavni nosioci aktivnosti biljaka roda *Mahonia* (He i Mu, 2015).

Na osnovu HPLC/MS analize etanolnog i vodenog ekstrakta vrste *M. aquifolium* detektovano je prisustvo alkaloida u oba ispitivana ekstrakta. U etanolnom ekstraktu određen je veći sadržaj berberina u odnosu na vodeni ekstrakt. Za dalju identifikaciju ostalih alkaloida prisutnih u ekstraktima vrste *M. aquifolium* izvršena je dodatna hemijska analiza. Kroz obavljene eksperimente i dobijene rezultate potvrdili smo literaturne podatke da su alkaloidi zapravo glavni nosioci aktivnost biljaka roda *Mahonia*.

U daljem istraživanju korišćeni su ekstrakti bogati alkaloidima i u njima je potvrđeno prisustvo berberina, palmatina, jatrorizina, berbamina i magnoflorina. Svi alkaloidi sem magnoflorina su u do sada objavljenim istraživanjima pokazali kako antimikrobni, tako

i antitumorski potencijal. Ovakav rezultat bio je u potpunosti u saglasnosti sa celokupnim našim istraživanjem.

Što se tiče citotoksičnog efekta, statističkom analizom je utvrđeno da su za ovaj efekat najodgovorniji berberin, palmatin i berbamin. Berberin je svakako najispitivaniji alkaloid iz ove grupe, a naši rezultati sugerišu da su i ostali alkaloidi jako dobri kandidati za dalja ispitivanja.

Na osnovu rezultata testa citotoksičnosti, oba ekstrakta vrste *M. aquifolium* bili su kandidati za dalja ispitivanja sa ciljem da se razjasni mehanizam i tip ćelijske smrti koju indukuju.

Sledeći eksperimenti odnose se na analizu citopatoloških efekata etanolnog i vodenog ekstrakta vrste *M. aquifolium* fluorescentnom mikroskopijom u cilju ispitivanja njihove sposobnosti da indukuju apoptotsku ćelijsku smrt.

Apoptoza je kontrolisan tip ćelijske smrti, odvija se uz utrošak energije i dovodi do skupljanja ćelije, kondenzacije hromatina, pupljenja membrane, izlaska na površinu fosfatidilserina i aktivacije kaspaza (Salvesen i Dixit, 1997; Cummings i sar., 2000). Metode svetlosne i elektronske mikroskopije, omogućile su identifikaciju morfoloških promena na apoptotskoj ćeliji (Hacker i sar., 2000). U toku rane faze apoptoze, ćelija se skuplja i započinje proces piknoze. U ovako smanjenoj ćeliji citoplazma je gušća i organele su gušće raspoređene. Piknoza je posledica kondenzacije hromatina, što predstavlja glavni dokaz procesa apoptoze. Ćelije koje su započele sa procesom apoptoze zaokrugljuju se i gube svoju prvobitnu formu (Kerr i sar., 1972). Zatim dolazi do pupljenja membrane i formiranja apoptotskih tela, koja se sastoje od citoplazme i organela sa ili bez delova nukleusa. Kasnije, makrofage ili parenhimske ćelije uklanjaju ova tela procesom fagocitoze. Za proces apoptoze kao kontrolisanog tipa ćelijske smrti ključno je da ne dolazi do inflamacije. Razlozi za to su da apoptotske ćelije ne otpuštaju slobodno svoj intraćelijski sadržaj u međućelijski prostor, da bivaju brzo fagocitovane čime se sprečava sekundarna nekroza i da nema oslobađanja antiinflamatornih citokina (Savill i Fadok, 2000; Kurosaka i sar., 2003).

Nova saznanja u oblasti molekularne biologije kancera razjasnila su da poremećaji u signalnim putevima apoptoze, indukovani onkogenim mutacijama, mogu dovesti do

maligne transformacije ćelije. Zbog toga većina novih citotoksičnih agenasa ili antikancerskih lekova kao glavnu metu ima proces apoptoze. Apoptoza je regulisana različitim mehanizmima i svaki od njih obuhvata različite signalne puteve (Lowe i Athena, 2000).

Analizom morfoloških promena na HeLa ćelijama koje su tretirane ispitivanim vodenim i etanolnim ekstraktom vrste *M. aquifolium*, dobili smo prvi dokaz da oba ekstrakta imaju sposobnost da indukuju proces apoptoze u ćeliji (Slika 7). Kao pozitivna kontrola korišćen je lek cisplatina koji ima sposobnost da se vezuje za purinske baze DNK molekula, da intereaguje sa mehanizmima reparacije, oštećuje DNK i posledično indukuje apoptozu (Dasari i Tchounwou, 2014). Ćelije tretirane ispitivanim ekstraktima ili cisplatinom pokazale su sve karakteristike ćelija u ranoj fazi apoptoze (Slika 7). Na našim fotografijama, zabeleženim elektronskim mikroskopom, vidi se da se ćelije zaokrugljuju u odnosu na netretirane, kontrolne uzorke, i da u unutrašnjosti ćelija dolazi do kondenzacije i fragmentacije hromatina.

Alternativni put apoptozi je ćelijska smrt nekrozom. Ovaj proces je energetski nezavisan u kome je ćelija pasivna. Membrana gubi integritet i dolazi do oslobađanja citoplazmatskog sadržaja u međućelijski prostor. Otpuštaju se hemotaktični signali koji privlače ćelije imunskog sistema i dolazi do procesa inflamacije, zbog čega je ovaj put ćelijske smrti toksičan (Savill i Fadok, 2000; Kurosaka i sar., 2003). Morfološke promene u nekrotičnoj ćeliji su: oticanje ćelije, gubitak strukture ćelijskih organela i ruptura membrane. S obzirom da nije jednostavno samo na osnovu morfoloških promena ćelije zaključiti da li se radi o apoptozi ili nekrozi, potrebno je i razjasniti mehanizam kojim ispitivani agens indukuje ćelijsku smrt (Elmore, 2007).

Nakon analize morfoloških promena, pristupili smo eksperimentima u kojima smo pokazali efekat ekstrakata vrste *M. aquifolium* na distribuciju ćelijskog ciklusa kod tretiranih HeLa ćelija. Analiza rezultata ćelijskog ciklusa uzoraka tretiranih ispitivanim ekstraktima potvrdila je da oba ekstrakta imaju sposobnost da indukuju ćelijsku smrt maligno transformisanih ćelija. Naši rezultati nisu dali značajniju informaciju o mehanizmu delovanja ekstrakata, što je takođe bilo očekivano s obzirom da su hemijske analize pokazale da su oba ekstrakta izuzetno bogata različitim alkaloidima. Samo na primeru berberina možemo se uveriti da su mehanizmi kojima se indukuje ćelijska smrt

različiti, što je karakteristično i za ostale alkaloidne, i da u kompleksnim sistemima kao što su ekstrakti ne treba očekivati jasne rezultate ovakvom metodom (Jabbarzadeh i sar., 2014). Ipak za nas je bio bitan podatak da je postojala statistički značajna razlika u broju događaja u subG1 fazi između uzoraka tretiranih vodenim i etanolnim ekstraktom (Slika 8). Iako je *in vitro* test citotoksičnosti pokazao da ekstrakti poseduju približno isti efekat nakon 72 h, eksperiment u kome je ispitan uticaj na aktivaciju ćeljske smrti pokazao je da etanolni ekstrakt, koji ima veću količinu alkaloida deluje znatno efikasnije, nakon 24 h i 48 h (Slika 8). Ovaj podatak se može smatrati još jednom potvrdom da su alkaloidi glavni nosioci aktivnosti ekstrakata i da njihova količina direktno utiče na efikasnost kojom se indukuje ćeljska smrt.

U sledećim eksperimentima, kako bi dodatno potvrdili proapoptotski efekat testiranih ekstrakata, kao i da bi identifikovali ciljne kaspaze preko kojih ekstrakti aktiviraju apoptozu ciljnih ćelija, primenjeni su specifični ireverzibilni peptidni inhibitori kaspaza (Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK). Naime, proces apoptoze se može odvijati na dva načina, spoljašnjim putem aktivacije preko receptora smrti ili unutrašnjim putem preko mitohondrija. Danas postoje dokazi da ova dva puta nisu potpuno nezavisna i da molekuli koji učestvuju u jednom putu mogu uticati na drugi i obrnuto (Igney i Krammer, 2002). Postoji još jedan dodatni put aktivacije apoptoze koji se naziva granzim B put. Svi putevi se susreću u tački gde dolazi do aktivacije enzima kaspaze 3, nakon čega dolazi do fragmentacije DNK, degradacije citoskeleta i nuklearnih proteina, formiranja apoptotskih tela, ekspresije receptora za fagocitozu i fagocitoze. Kaspaze su enzimi koji učestvuju u procesu apoptoze i imaju proteolitičku ulogu u razgradnji proteina do aminokiselinskih rezidua. Kaspaza 8 je deo spoljašnjeg puta i učestvuje u aktivaciji kaspaze 3, kao i kaspaza 9 koja predstavlja deo unutrašnjeg puta aktivacije apoptoze (Elmore, 2007).

Studije o berberinu pokazale su da ovaj alkaloid, jedan od glavnih sekundarnih metabolita predstavnika roda *Mahonia*, preko različitih signalnih puteva utiče na proces apoptoze (Jabbarzadeh i sar., 2014). Neki od mehanizama delovanja berberina su između ostalih i aktivacija kaspaza 3, 8 i 9 (Ho i sar., 2009; Lin i sar., 2006; Mantena i sar., 2006). Sekundarni metabolit berbamin u eksperimentima je pokazao da indukuje proces apoptoze preko kaspaza 9 i 3 (Rahmatullah i sar., 2014). U našim eksperimentima zabeleženo je smanjenje procenta HeLa ćelija u apoptozi, odnosno

subG1 fazi ćelijskog ciklusa, kada su ćelije pretretirane inhibitorima kaspaze 3 i 8 i tretirane ispitivanim vodenim i etanolnim ekstraktom (Slika 9). Pretretman ćelija sa inhibitorom kaspaze 9 doveo je do neznatnog sniženja u subG1 fazi, samo u uzorcima koji su tretirani etanolnim ekstraktom. Ovaj rezultata može se objasniti količinom alkaloida u ispitivanim ekstraktima, odnosno nedovoljnom količinom alkaloida u vodenom ekstraktu, koji bi indukovali apoptozu i preko kaspaze 9. Na osnovu ovih dobijenih rezultata možemo zaključiti da oba ekstrakta indukuju proces apoptoze u ćeliji pre svega aktivacijom kaspaze 3 i kaspaze 8. Izostanak, odnosno slaba aktivacija kaspaze 9, iako je to bilo očekivano zbog prisutnog berberina i berbamina, može biti objašnjen i prisustvom drugih aktivnih principa, koji dominantno indukuju apoptozu spoljašnjim signalnim putem. Za ostale identifikovane alkaloida u našim ekstraktima vrste *M. aquifolium* još uvek ne postoje literaturni podaci o tipu i mehanizmu kojim inhibiraju proliferaciju, što bi svakako trebalo da bude jedan od ciljeva daljeg istraživanja ove biljne vrste.

Iako hirurško uklanjanje i adjuvantna terapija mogu dovesti do izlečenja ukoliko je primarni tumor na vreme uočen, bolest u metastazi je uglavnom neizlečiva zbog same prirode i rezistencije na postojeću terapiju diseminovanih tumorskih ćelija. Zato uspešnost izlečenja u mnogome zavisi od mogućnosti hemioterapije da zaustavi ili čak i preokrene proces metastaze (Gupta i Massague, 2006; Steeg, 2006).

Proces metastaze povezan je sa sposobnošću ćelija da migriraju i da slabe svoje međućelijske veze. Zato smo u sledećem koraku pristupili eksperimentima kojima bi ispitali da li testirani ekstrakti ostvaruju inhibitorno dejstvo na migraciju ćelija, invazivnost i angiogenezu. Iako do sada nije bilo poznato da li ekstrakti predstavnika roda *Mahonia* mogu uticati na invazivnost, odnosno na migraciju i angiogenezu, maligno transformisanih ćelija, podaci da supstance biljnog porekla, kao što su alkaloidi, mogu da utiču na više komponenti onkogenih signalnih puteva i da tako modulišu različita svojstva ćelije, bili su dobro polazište za dalja ispitivanja. Dobar primer je alkaloid berberin, koji preko više različitih mehanizama utiče na proliferaciju malignih ćelija (Jabbarzadeh i sar., 2014). Prema do sada objavljenim rezultatima berberin ima i sposobnost da blokira Wnt/ β -katenin signalni put, kao i da aktivira protein zonula okcludens 1 (ZO-1) koji je bitan za formiranje čvrstih međućelijskih veza

i smanjenje ćelijske mobilnosti. Na ovaj način berberin smanjuje ćelijsku migraciju, što je od izuzetnog značaja za smanjivanje i zaustavljanje procesa metastaze (Park i sar., 2012; Albring i sar., 2013; Liu i sar., 2009). Na osnovu ovih podataka prepostavili smo da bi ekstrakti vrste *M. aquifolium* mogli imati antimigratorni potencijal. U eksperimentu sa endotelijalnim ćelijama umbilikalne vene (EA.hy926) dobili smo i dokaz za ovu pretpostavku. Oba ekstrakta su efikasno inhibirala ćelijsku migraciju i mobilnost, čime su pokazali da mogu dovesti do smanjenja invazivnosti i metastatskog potencijala ćelija, kao i do zaustavljanja procesa angiogeneze (Slika 10 i 11). Ćelije umbilikalne vene zatim su korišćene i u samom testu ispitivanja uticaja ekstrakata na angiogenezu. Formiranje novih krvnih sudova bitno je za metastatsko širenje kancera, gde nova vaskularna mreža snabdeva ćelije kiseonikom i nutrientima. Danas inhibitori procesa angiogeneze nalaze svoje mesto u terapiji onkoloških bolesti, dovode do smanjenja mortaliteta i morbiditeta pacijenata sa kancerom. Od novih antiangiogenih agenasa u kliničkim studijama očekuje se da pored migracije, kao početnog koraka u procesu angiogeneze, inhibiraju i proliferaciju endotelnih ćelija (Nishida i sar., 2006). Oba ekstrakta su pokazala da u većim koncentracijama inhibiraju proliferaciju endotelnih ćelija, dok već u subtoksičnim koncentracijama smanjuju njihovu migraciju (Slika 10). Očekivano, u eksperimentu oba ispitana ekstrakta pokazala su sposobnost da redukuju proces angiogeneze. Ćelije tretirane vodenim ekstraktom vrste *M. aquifolium* formirale su manje izražene međućelijske mreže u poređenju sa kontrolom, dok su ćelije tretirane etanolnim ekstraktom vrste *M. aquifolium* potpuno izgubile sposobnost formiranja tubularnih, poligonalnih struktura i međućelijskih veza tipičnih za endotelne ćelije (Slike 11). Ovo su prvi rezultati koji su pokazali da biljna vrsta *M. aquifolium* poseduje antimetastatski potencijal.

Kada smo dokazali prisustvo antikancerskog potencijala ekstrakata vrste *M. aquifolium*, naše dalje istraživanje trebalo je da utvrdi kakva bi mogla biti uloga ove biljne vrste u savremenoj terapiji onkoloških oboljenja. Literaturni podaci pokazali su da berberin može ograničiti toksičnost prouzrokovanu doksorubicinom, hemoterapeutikom koji se koristi u tretiranju različitih maligniteta, a čiji veliki nedostatak predstavlja dozno zavisna toksičnost (Zhao i sar., 2011). Na osnovu ovog podatka i saznanja da je berberin

jedan od glavnih aktivnih principa oba ekstrakta, naš cilj je bio da ispitamo kakav uticaj ekstrakti imaju na citotoksičan i antimetastatski efekat doksorubicina.

Za dalja ispitivanja odabrali smo kao *in vitro* model A549 ćelijsku liniju, nesitnoćelijski adenokarcinom pluća.

Ove ćelije često razvijaju rezistenciju na postojeću terapiju (Ihde i Minna, 1991), prouzrokovanu različitim mehanizmima, kao što su povećana ekspresija proteina za izbacivanje leka iz ćelije i ABC transportera (engl. *ATP-binding cassette transporters*) (Borst i sar., 2000). Mnoge studije su potvrdile da sem ABC transportera u A549 ćelijama dolazi i do ekspresije drugih proteina odgovornih za rezistenciju (engl. *breast cancer resistant protein (BCRP)*, *lung resistance-related protein (LRP)*) (Salomon i Ehrhardt, 2011; Lee i Lim, 2006; Meschini i sar., 2002).

Rezultati naših istraživanja pokazali su da IC₅₀ vrednost doksorubicina može biti više puta smanjena u kombinaciji sa ekstraktima vrste *M. aquifolium* (Tabela 7). Iz ovih podataka može se zaključiti da će intenzitet antiproliferativnih efekata doksorubicina biti potpuno očuvan i prilikom upotrebe znatno nižih koncentracija doksorubicina. Efekat kombinovanog tretmana doksorubicin/ekstrakt je sinergistički, što znači da su oba agensa zadržala svoje individualne antikancerske karakteristike. Iz do sada objavljenih podataka o toksičnosti doksorubicina može se zaključiti da zbog kumulativnog efekta leka ne postoji apsolutno bezbedna doza, ali da niže doze smanjuju mogućnost za razvoj neželjenih efekata. Ovo je posebno važno kod kardiomiopatije, najvažnijeg neželjenog efekta koji se razvija u toku terapije doksorubicinom (Chatterjee i sar., 2010; De Angelis i sar., 2016; Lipshultz i sar., 2005). U skladu sa ovim podacima, i naši rezultati sugerišu da bi istovremena primena doksorubicina i nekog agensa sa kojim ovaj lek ima sinergistički efekat, mogla značajno smanjiti toksičnost bez uticaja na antikancersku aktivnost doksorubicina. Takođe, kao što je napred navedeno, oba ekstrakta vrste *M. aquifolium* pokazuju značajnu selektivnost prema normalnim MRC-5 ćelijama, što sve predstavlja dobru osnovu za dalja istraživanja. .

Doksorubicin indukuje G2/M zastoj u ćelijskom ciklusu kod A549 ćelija (Miwa i sar., 2015), a značajno povećanje procenta ćelija u subG1 fazi, u poređenju sa kontrolnim uzorkom, pokazuje da ćelije tretirane doksorubicinom ne mogu da prođu kroz proces mitoze i da ulaze u apoptozu (Wlodkowic i sar., 2011; Vermes i sar., 2000). Naši dobijeni rezultati, u skladu su sa navedenim literaturnim podacima. Rezultati naših

eksperimenata pokazali su i da je procenat ćelija u subG1 fazi identičan kada su ćelije tretirane sa IC₅₀ koncentracijom čistog doksorubicina ili sa ekstraktom vrste *M. aquifolium* i IC₂₀ koncentracijom doksorubicina (Slika 12). Ovaj podatak potvrđuje rezultate prethodnog eksperimenta, gde je utvrđeno sinergističko delovanje ekstrakata i doksorubicina, da ekstrakti omogućavaju ispoljavanje antikancerskog efekta doksorubicina i pri njegovim znatno nižim koncentracijama. Takođe, ako se pogledaju vrednosti procenata ćelija u G1 fazi, kada su ćelije tretirane istim koncentracijama doksorubicina, vidi se da kombinovani tretman sa ekstraktom daje više vrednosti nego tretman čistim doksorubicinom. S obzirom da je jedan od ciljeva u procesu pronalazjenja novih lekova da ispitivani agens ima sposobnost dejstva na kontrolne tačke u ćelijskom ciklusu, koje su odgovorne za praćenje i proveru progresije ćelija kroz faze ciklusa (DiPaola, 2002), podatak o povećanju broja ćelija u kontrolnoj tački G1 pri upotrebi kombinovanog tretmana, može se smatrati veoma značajnim za dalje ispitivanje ekstrakata. Povećanje procenta ćelija u subG1 i G1 fazi prilikom primene kombinovanog tretmana doksorubicin/ekstrakt, može biti pokazatelj da je blok u tački G1 ireverzibilan i da ovakav tretman uvodi ćelije u apoptozu. Povećanje u subG1 fazi je statistički značajno kada su ćelije tretirane sa doksorubicin/etanolni ekstrakt tretmanom u odnosu na ćelije tretirane čistim doksorubicinom.

Vodeni i etanolni ekstrakt vrste *M. aquifolium* nisu pokazali uticaj na proces ulaska doksorubicina u malignu ćeliju. Oba ispitivana ekstrakta pokazala su sposobnost da zadrže doksorubicin u ćeliji, pri čemu je efekat etanolnog ekstrakta bio izraženiji.

Da bi se prevazišla rezistencija u terapiji kancera jedna od mogućnosti je povećanje doze leka, što u slučaju doksorubicina nije moguće zbog neželjenih efekata (Tripton, 2003). Drugi pristupi u rešavanju rezistencije su poboljšanje akumulacije leka i produžavanje vremena retencije leka u ćeliji ili povećanje vremena izloženosti ćelije leku (Wong i sar., 2006; Millenbaugh i sar., 2000). Inhibicija transportera za izbacivanje leka iz ćelije kao što su p-glikoprotein (Pgp) i BCRP, kod ćelija osteosarkoma rezistentnih na doksorubicin povećava nivo leka u ćeliji i njegovo zadržavanje usled čega ćelije ulaze u apoptozu (Gonçalves i sar., 2015), što može biti i jedan od mehanizama kojim ispitivani ekstrakti povećavaju retenciju doksorubicina. Takođe, na ovaj način ekstrakti mogu povećavati osetljivost ćelije na lek i indukovati uvođenje ćelija u apoptozu, što se manifestuje povećanjem broja događaja u subG1 fazi ćelijskog

ciklusa nakon kombinovanog doksorubicin/ekstrakt tretmana i može biti jedan od mehanizama sinergističkog efekta koji zajedno ostvaruju doksorubicin i ekstrakti vrste *M. aquifolium* (Bamodu i sar., 2015).

U sledećem setu eksperimenata, ispitivali smo potencijal ekstrakata vrste *M. aquifolium* kao inhibitora matriksnih metaloproteinaza. Naime, ključnu ulogu u progresiji kancera ima interakcija maligno transformisanih ćelija sa njihovom mikrosredinom u procesima migracije, invazivnosti, angiogeneze i metastaze. Odavno je poznato da matriksne metaloproteinaze (MMP) aktivno učestvuju u promenama tumorske sredine koje omogućavaju njegovo dalje širenje. Ovi enzimi spadaju u cink zavisnu porodicu endopeptidaza, koje su deo mnogih fizioloških i patoloških procesa u organizmu, kao što su: zarastanje rana, organogeneza, inflamacija, autoimuni poremećaji i kancerogeneza (Kessenbrock i sar., 2010; Page-McCaw i sar., 2007). Nekoliko različitih studija potvrdilo je da povećana ekspresija metaloproteinaza u tumorskoj mikrosredini ne zavisi samo od kancerskih ćelija, nego i od susednih ćelija strome. Naime, ćelije kancera stimulišu okolne ćelije, kao što su fibroblasti, da učestvuju u produkciji MMP-a tako što će proizvoditi interleukine i faktore rasta, koji će biti signali za dalju ekspresiju i stvaranje metaloproteinaza (Murphy, 2008). Međutim, uloga ovih endopeptidaza u kancerogenezi može biti dosta različita i u velikoj meri zavisi od gradusa tumora, od toga da li se radi o primarnom tumoru ili metastazi, kao i od lokalizacije tumora (Decock i sar., 2008; Korpi i sar., 2008).

Za inhibitore matriksnih metaloproteinaza se smatralo da će biti novi agensi sa potencijalom da inhibiraju rast i metastazu malignih tumora. Međutim u nekoliko kliničkih studija ovi agensi su se pokazali prilično neuspešnima, što se može pripisati dvostrukoj ulozi matriksnih metaloproteinaza u toku invazije i metastaze tumora (Chen i sar., 2005). Ovi enzimi mogu da degradiraju ekstracelularni matriks, da promovišu invaziju, migraciju i neovaskularizaciju (Hiraoka i sar., 1998), ali takođe mogu da inhibiraju rast tumora i njegovu vaskularizaciju indukujući stvaranje inhibitora angiogeneze kao što su angiostatin i tumstatin (Hiraoka i sar., 1998; Cornelius i sar., 1998; Sang, 1998; Hamano i sar., 2003). Naši rezultati pokazali su da ekstrakti imaju sposobnost da inhibiraju ekspresiju *MMP9* u tretiranim ćelijama, i da se ta inhibicija održava i u kombinovanom doksorubicin/ekstrakt tretmanu (Slika 16) Ranije studije

utvrdile su da povećanje nivoa MMP9 u plazmi promoviše razvoj tumora *in vivo*. Ovakvi tumori su sitniji i slabije vaskularizovani u poređenju sa onima koji su se razvijali u miševima sa nižim nivoom MMP9, što se može objasniti MMP9 indukovanom sintezom angiostatina. To znači da inhibitori MMP9 mogu dovesti do smanjenja u broju kolonija tumora, ali je primarni tumor veći i bolje vaskularizovan (Chen i sar., 2005). Jedan od načina da se prevaziđe ovakav nedostatak inhibitora MMP9 je da se aplikuju istovremeno sa antiangiogenetskim agensima (Chen i sar., 2005). Kao što je ranije objašnjeno u našem istraživanju ekstrakti vrste *M. aquifolium* pokazali su sposobnost da inhibiraju proces angiogeneze u eksperimentima sa EA.hy926 ćelijama. Posebno izražen efekat na ćelije umbilikalne vene imao je etanolni ekstrakt (Slika 11). Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da ekstrakti kao potencijalni inhibitori MMP9 neće potencirati vaskularizaciju i proces angiogeneze zbog svog antiangiogenetskog efekta, a da sniženje ekspresije *MMP9* smanjuje sposobnost tumorskih ćelija da migriraju i formiraju nove kolonije.

S obzirom da berberin blokiranjem Wnt/ β -katenin signalnog puta i aktivacijom ZO-1 redukuje pokretljivost ćelija i smanjuje metastatski potencijal, i da su naši rezultati pokazali da oba ekstrakta deluju antimigratorno, bilo je potrebno proveriti kako se ovaj efekat ekstrakata ispoljava u prisustvu doksorubicina. Naši eksperimenti su potvrdili antimigratorni efekat ekstrakata i na A549 ćelijskoj liniji, i ovaj efekat očuvan je i u prisustvu doksorubicina. Čist doksorubicin ispoljio je slab efekat na migraciju ćelija.

U sledecim eksperimentima, ispitivali smo i sposobnost malignih celija da formiraju kolonije u prisustvu ispitivanih ekstrakata. Vodeni i etanolni ekstrakti vrste *M. aquifolium* blago snižavaju sposobnost malignih ćelija da formiraju kolonije, dok je dejstvo čistog doksorubicina veoma izraženo, u ovom slučaju on snažno inhibira stvaranje kolonija kod maligno transformisanih ćelija (Slika 15). U kombinaciji sa ekstraktima efekat doksorubicina je još izraženiji.

Takođe, u okviru našeg istraživanja ispitivali smo uticaj doksorubicina, ekstrakta i njihove kombinacije na ekspresiju gena koji su bitni u procesu adherence ćelija i formiranja čvrstih veza. *CTNNB1* kodira β -katenin, dok *OCN* kodira protein okcludin,

jedne od glavnih komponenti u formiranju čvrstih međucelijskih veza. Dobijeni rezultati pri tretiranju ćelija kombinovanim tretmanom sugerišu da smanjenje u ekspresiji *MMP9* i povećanje *OCN* gena može dovesti do inhibiranja ćelijske migracije i redukcije metastatskog potencijala maligno transformisnih ćelija.

ERCC1 gen kodira ERCC1 protein (engl. DNA excision repair protein), koji učestvuje u reparaciji i rekombinaciji DNK. Ranije je dokazano da ovaj protein može imati prediktivni značaj za pacijente sa nesitnoćelijskim kancerom pluća, jer pacijenti kod kojih je tumor ERCC1 negativan imaju znatno bolje preživljavanje u poređenju sa pacijentima kod kojih je tumor ERCC1 pozitivan (Holm i sar., 2009). Naši rezultati pokazali su da doksorubicin snižava ekspresiju *ERCC1* gena u poređenju sa kontrolnim uzorcima i da se takav nivo ekspresije kod ćelija održava i kada se tretiraju kombinovanim tretmanom doksorubicin/ekstrakt. Iz ovih podataka možemo zaključiti da ekstrakti ne utiču na promenu u nivou ekspresije *ERCC1* koju indukuje doksorubicin i da samim tim ne utiču na reparaciju DNK molekula preko ekspresije ovog gena.

Jednu veliki grupu eksperimenata posvetili smo ispitivanju antimikrobne aktivnosti ekstrakata vrste *M. aquifolium*. Predstavnici roda *Mahonia* su u tradicionalnoj medicini korišćeni za tretiranje stanja koja imaju simptome kao infekcije izazvane različitim patogenima. Na osnovu takvih podataka ove biljke su bile kandidati za ispitivanje antimikrobnog potencijala, što su ujedno bila i jedna od prvih istraživanja roda, a rezultati su opravdali njihovu upotrebu u tradicionalnoj medicini. Najbolji primeri su svakako *M. balei* i *M. fortunei*, koje su dale dobre rezultate kako na izolovanim bakterijskim sojevima, tako i u terapiji samih pacijenata samostalno i u kombinaciji sa antibioticima (Li i sar., 2007; Zeng i sar., 2003; Zhao i sar., 1991; Yao i sar., 2010).

Biljna vrsta *M. aquifolium* se u tradicionalnoj medicini takođe koristila u tretiranju infekcija, ali i inflamatornih procesa, posebno na koži. Studije koje su se bavile ispitivanjem biljke uglavnom su se koncentrisale na antiinflamatorni potencijal i upotrebu u lečenju psorijaze (Gieler i sar., 1995; Gieler, 1993; Wiesenauer, 1992; Gulliver i Donsky, 2005). Antimikrobni potencijal ekstrakata i izolovanih alkaloida (berberin, palmatin i jatrorizin) ispitan je na dermatofitama, kvasnicama i bakterijskim sojevima koji izazivaju akne ((Slobodnikova i sar., 2004; Vollekova i sar., 2001; Vollekova i sar., 2004), a potvrđeno je i da berberin izolovan iz vrste *M. aquifolium*

može inhibirati rast bakterija kao što su: *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* i *S. aureus* (Cernakova i Kostalova, 2002). Berberin i palmatin izolovani iz biljke *Coptis chinensis* pokazali su antibakterijski efekat prema *Helicobacter pylori* (Jung i sar., 2014), dok su palmatin i jatrorizin izolovani iz biljke *Enantia chlorantha* pokazali antimikrobni efekat prema nizu različitih bakterijskih sojeva (Moody i sar., 1995).

Za naša ispitivanja odabrali smo sojeve mikroorganizama koji su značajni kod imunokompromitovanih pacijenata, u koje spadaju pacijenti na terapiji za lečenje malignih bolesti. *S. aureus* je jedan od najčešćih izazivača infekcija kod pacijenata sa malignim bolestima na terapiji danas. *S. mutans* je predstavnik viridans streptokoka i stanovnik usne duplje čoveka, koji kod imunokompromitovanih pacijenata može postati patogen i izazvati ozbiljne infekcije. *B. subtilis* je stanovnik gastrointestinalnog trakta kod ljudi, ali može se naći i u kontaminiranoj hrani i može biti izazivač ozbiljnih infekcija. U poslednjih nekoliko godina beleži se porast infekcija kod pacijenata sa malignim bolestima izazvanih Gram negativnim bakterijama među kojima su infekcije izazvane *E. coli* i *K. pneumoniae*. *C. albicans* je najčešći uzročnik gljivičnih infekcija kod onkoloških pacijenata na terapiji.

Oba ispitana ekstrakta, vodeni i alkoholni, pokazali su umeren do slab antimikrobni efekat (Tabela 9). S obzirom da se ne radi o čistim, izolovanim alkaloidima, koji su glavni nosioci aktivnosti, ovakav rezultat je bio očekivan. Takođe, rezultati su pokazali da je efekat vodenog ekstrakta slabiji, u slučaju *E. coli* čak više nego duplo, od etanolnog ekstrakta. HPLC/MS hemijskom analizom se pored sličnog sastava oba ekstrakta utvrdilo, na osnovu standarda berberina, da je u etanolnom ekstraktu ovaj alkaloid znatno više zastupljen. Ovaj podatak implicira da je etanolni ekstrakt znatno bogatiji alkaloidima, što bi ujedno mogao biti razlog njegovog boljeg antimikrobnog efekta (Tabela 9). Za dalje istraživanje je takođe bio značajan podatak da su se *S. aureus* i *S. mutans* pokazale kao najosetljivije na dejstvo oba ekstrakta. Kao što je objašnjeno *S. aureus* danas predstavlja glavnog uzročnika infekcija kod pacijenata sa rakom. Iako kod većine ljudi ova bakterija ne izaziva ozbiljne posledice, kod imunokompromitovanih osoba infekcije stafilokokom mogu dovesti do sistemskih infekcija sa letalnim ishodom-sepsa, endokarditisa i pneumonije (Gotz, 2004). Iz tog razloga za dalje eksperimente u

kojima je ispitan uticaj ekstrakata na faktore virulencije korišćena je ova bakterijska vrsta.

Poslednjih godina se poseban značaj pridaje biofilmu, kao faktoru virulencije *S. aureus*. Bolesti koje nastaju kao posledica formiranja biofilma, zbog njegove prirode, karakterišu se prolongiranim tokom, otpornošću na antibiotike, rekurencijom i diseminacijom. Ono što je važno za pacijente sa malignim bolestima je da su zbog formiranja biofilma na medicinskim pomagalicama svi nakon hirurške intervencije i/ili na bolničkom lečenju u većem riziku da razviju infekciju izazvanu *S. aureus*. Biofilm se najčešće formira na ortopedskim implantima i osteosintetskom materijalu, kao i na materijalima od plastičnih polimera i silikona u šta spadaju: kateteri, tubusi, drenovi kozmetički implantati (Costerton i sar., 2003). Bakterije se mogu vezati za površinu implanta ili za komponente ekstracelularnog matriksa, i s obzirom na nepermeabilnost biofilma za antibiotike u ovakvim slučajevima mora se hirurški odstraniti implant i zameniti novim (Periasamy i sar., 2012; Herrmann i sar., 1988).

Naši rezultati uticaja ekstrakata na formiranje biofilma pokazali su da oba ekstrakta u subinhibitornim koncentracijama imaju sposobnost da umereno inhibiraju stvaranje biofilma. (Tabela 10) Ovo je prvi put da je ispitan ovakav uticaj biljke *M. aquifolium*. S obzirom da još uvek nema literaturnih podataka o tome kako na ovaj faktor virulencije utiču alkaloidi, to bi svakako trebalo da predstavlja jedan od sledećih ciljeva istraživanja. Naime, upotreba alkaloda, ukoliko pokažu dobro dejstvo, ili standardizovanih biljnih preparata sa efektom na sintezu biofilma, mogla bi u budućnosti biti jedna vrsta profilakse za sprečavanje infekcije stafilokom u bolničkim uslovima kod imunokompromitovanih pacijenata.

Ekstrakti su pokazali sposobnost da u subinhibitornim koncentracijama delimično inhibiraju sintezu glikokaliksa, kao još jednog bitnog faktora virulencije za *S. aureus*, i posledično smanjuju adherenciju bakterija za polimerne površine. U oba eksperimenta, CRA i Christensenova metoda, potvrđen je ovaj rezultat (Slika 18 i 19). Uzorci tretirani vodenim ekstraktom CRA metodom pokazali su da sem na sposobnost inhibicije, ovaj ekstrakt utiče i na morfologiju samih bakterijskih kolonija, što može dodatno uticati na smanjenje virulencije. Obe metode koje smo koristili su kvalitativne i subjektivne, i

moгу pokazati različitu pouzdanost prilikom očitavanja rezultata (Christensen i sar., 1982; Johannes i sar., 2003; Freeman i sar., 1989; Mariana i sar., 2009). Metode su u dobroj korelaciji sa metodom detekcije biofilma u mikrotitracionim pločama, koja je kvantitativna, pa se zajedno mogu koristiti radi bolje detekcije produkcije ovih faktora virulencije. U našim eksperimentima može se videti u slučaju oba ekstrakta da su uz pomoć sve tri metode dobijeni isti, odnosno veoma slični rezultati.

Glavni izazov u današnjoj terapiji antibioticima svakako je razvoj rezistencije. Kada je penicilin uveden u terapiju 40-ih godina prošlog veka više od 90% sojeva *S. aureusa* bilo je osetljivo na dejstvo ovog antibiotika. Tokom narednih godina taj procenat je sve više opadao, do 50-ih godina kada su se pojavili prvi multirezistentni sojevi koji su pored penicilina bili rezistentni i na hloramfenikol, tetraciklin i eritromicin (Jevons i sar., 1961).

Osim rezistencije široka upotreba antibiotika bitno utiče na sastav mikrobioma. Na mikroorganizme koji naseljavaju ljudski organizam bili oni deo humanog mikrobioma ili patogeni dugo se gledalo kao na pojedinačne vrste u određenoj sredini. Međutim istraživanja u poslednjih nekoliko godina bitno su promenila shvatanja o mikrobiomu, i njegovom uticaju na zdravlje čoveka. Danas se zna da ni jedan mikroorganizam ne živi u izolaciji, već naprotiv svi mikroorganizmi predstavljaju kompleksnu zajednicu više vrsta sa intenzivnim međusobnim interakcijama unutar domaćina (Oh i sar., 2014). Novije studije su pokazale da se na mikrobiom gastrointestinalnog trakta može gledati kao na veliki ekosistem, koji ima jednu od ključnih uloga u sazrevanju i aktivaciji imunskog odgovora domaćina, čime se obezbeđuje odbrambeni mehanizam za patogene; kontroliše se proliferacija ćelija, vaskularizacija, endokrina funkcija, neurološki signali; održava se gustina kostiju, biosinteza vitamina, potrošnja energije; reguliše se reakcija na lekove i eliminisanje toksina. S obzirom na široku funkciju ovog mikrobioma nije bilo iznenađujuće kada su se pojavile i prve potvrde o uticaju intestinalne mikroflore na razvoj hroničnih bolesti kao što je kancer, autoimune bolesti, inflamatorni poremećaji, bolesti metabolizma i kardiovaskularnog sistema (Lynch i sar., 2016). Takođe, istraživanja su pokazala da primena antibiotika ili imunosupresivnih lekova ima veliki uticaj na sastav mikroflore, posebno u gastrointestinalnom traktu, što bi zahtevalo i veću kontrolu primene ovakve terapije (Knights i sar., 2014).

U zdravom organizmu na svakoj epitelijalnoj barijeri postoji mikrobiom koji je štiti od različitih patogena. Poremećaji u procentualnoj zastupljenosti vrsta u mikrobiomu dovode do narušavanja interakcije između epitelnih ćelija i mikroorganizama, što slabi barijeru, izaziva inflamaciju i može dovesti do inicijacije ili progresije malignih oboljenja (Goldszmid i Trinchieri, 2012; Jobin, 2012).

Dalja istraživanja mikrobioma dovešće do saznanja o tome koji je najbolji sastav mikroorganizama u organizmu čoveka za tretiranje određenog patološkog stanja i njegovu profilaksu. U lečenju malignih oboljenja to bi na primer značilo da bi se među mikroorganizmima promovisale one bakterijske vrste koje redukuju sistemsku toksičnost i povećavaju efekat antikancerske terapije (Faith i sar., 2013). Tada će se još više kontrolisati i redukovati upotreba antibiotika sa ciljem da se očuva uspostavljena ravnoteža u mikrobiomu. Takav trend u farmakoterapiji obezbediće mesto za širu upotrebu svih preparata koji su netoksični, a sa antibioticima deluju sinergistički, čime smanjuju njihovu dozu i dužinu upotrebe.

Rezistencija i očuvanje mikrobioma su svakako bili dovoljni razlozi da se ispita uticaj ekstrakata vrste *M. aquifolium* na efekat antibiotika, a za ove eksperimente odabrani su antibiotici koji su danas u širokoj upotrebi, i koji imaju različite mehanizme delovanja.

Amoksisicilin ima snažan inhibitorni efekat na velikom broju Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, koji ispoljava vezujući se za peniciln vezujuće proteine, čime zaustavlja proces transpeptidacije i sinteze peptidoglokana u bakterijskom zidu. Inhibiranjem sinteze ćelijskog zida dolazi do lize bakterijske ćelije (Grumezescu i sar., 2014; Pal i sar., 2008; Qureshi i sar., 2011; Stanhope i sar., 2008; Wronska i sar., 2015). Cefaleksin spada u prvu generaciju cefalosporina, koristi se u lečenju infekcija urinarnog i respiratornog trakta, kože i mekih tkiva. Deluje i na Gram pozitivne i na Gram negativne organizme, mehanizmom inhibiranja sinteze peptidoglikana i formiranja ćelijskog zida (Shukla i Quarishi, 2010). Ceftriakson je treća generacija cefalosporina, takođe svoju aktivnost ispoljava i na Gram pozitivnim i na Gram negativnim bakterijama (Kaus i sar., 2017). Tetraciklin ima širok spektar dejstva i koristi se u lečenju ljudi i životinja. Vezuje se za 30S podjedinicu ribozoma i onemogućava vezivanje transportne ribonukleinske kiseline (aminoacil-tRNK). Na ovaj način dolazi do zastoja u procesu sinteze proteina (Gzyl i Wieden, 2017). Hloramfenikol se zbog svoje toksičnosti najčešće aplikuje lokalno, a ako se primenjuje sistemski

preporučuje se praćenje leka u organizmu. Vezuje se za 50S podjedinicu ribozoma i sprečava sintezu proteina u bakterijakoj ćeliji (Kostopoulou i sar., 2015). Eritromicin iz grupe makrolida deluje na veći broj Gram pozitivnih i na nekoliko Gram negativnih bakterija. Svoj mehanizam ostvaruje vezivanjem za 50S podjedinicu ribozoma usled čega prekida sintezu proteina u bakterijskoj ćeliji (Hansen i sar., 2002). Gentamicin se koristi za tretiranje infekcija izazvanih *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, i u profilaksi posebno kod endokarditisa, gde bi moglo da dođe do razvoja infekcije višestruko rezistentnim organizmima (Liu i sar., 2011; McConeghy i La Plante, 2010). Pripada grupi aminoglikozida i sprečava sintezu proteina vezivanjem za 30S podjedinicu ribozoma (Muralee i sar., 2015). Bacitracin je polipeptidni antibiotik sa jedinstvenom strukturom koja ga štiti od razgradnje i dejstva proteaza. Deluje na Gram pozitivne bakterije, sprečavajući ugradnju peptidoglikana u ćelijski zid. Ispoljava snažan inhibitorski efekat na razvoj rezistencije kod *S. aureus* (Mascher i sar., 2003; Ming i Epperson, 2002; Tay i sar., 2010).

Efekat ekstrakata je ispitan i u kombinaciji sa antimikotikom, na *C. albicans*. Razlog za ovaj eksperiment je česta pojava infekcija u kojima se iz kliničkog uzorka izoluju i *S. aureus*, i *C. albicans*. Ova dva patogena se često nalaze udruženi u vaginalnim i oralnim brisevima. Kandida takođe ima sposobnost da formira biofilm. Hife *C. albicans* mogu služiti i za dodatno vezivanje *S. aureus*, koja na njima formira biofilm. Takođe, hife mogu prodreti u epitelne ćelije domaćina što dovodi do prenosa stafilokoka u intracelularnu sredinu i nastanka lokalne i/ili sistemske infekcije (Peters i sar., 2010).

Nistatin spada u makrolide, vezuje se za ergosterol, komponentu gljivične ćelijske membrane. Može dovesti do promena u propustljivosti membrane, acido-baznoj ravnoteži, usled čega nastupa smrt gljivice. Kada se primenjuje oralno ne resorbuje se iz digestivnog trakta. Ima bitnu ulogu u profilaksi oralnih i sistemskih kandidijaza posebno kod imunokompromitovanih pacijenata (Lyu i sar., 2016). Vorikonazol spada u grupu triazola i deluje na sve infekcije izazvane pre svega vrstama kandidate, ali i drugih gljivica, posebno *Aspergillus spp.* Mehanizam dejstva vorikonazola je preko inhibicije citohrom P450-zavisne 14 α -lanosterol demetilacije čime se sprečava i sinteza ergosterola, komponente gljivičnih membrana (Pearson i sar., 2003).

Efekat vodenog ekstrakta je sa većinom ispitivanih antibiotika bio slabiji nego efekat etanolnog ekstrakta (Tabela 13 i 14). Razlog za ovakav rezultat svakako može biti veća zastupljenost alkaloida u etanolnom nego u vodenom ekstraktu. Generalno dobri rezultati oba ekstrakta sa ispitanim antibioticima sugerišu da su ekstrakti i izolovani alkaloidi dobri kandidati za ispitivanje mehanizma antimikrobnog dejstva i daljeg razjašnjavanja osnove njihovog sinergističkog efekta sa antibioticima.

Svakako upotreba novih agenasa koji mogu povećati efekat lekova, čime može doći do smanjenja doze i vremena izlečenja, mogu biti ključan faktor u prevazilaženju problema rezistencije i povećanju selektivnosti postojeće antimikrobne terapije. Ovde ukazujemo i na rezultate kliničkih studija koji su pokazali da preparati na bazi biljke *M. balei*, jedne od biljnih vrsta roda *Mahonia*, u kombinaciji sa azitromicinom znatno povećavaju procenat izlečenja pneumonije kod dece (Yao i sar., 2010). Naši rezultati su u skladu sa ovim podacima, da predstavnici roda *Mahonia*, kao i aktivni principi, imaju potencijala da svoje mesto nađu kao adjuvantna terapija antimikrobnoj terapiji u širokoj upotrebi.

6. Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata tokom našeg istraživanja biljne vrste *M. aquifolium*, došli smo do sledećih zaključaka:

- Vodeni i etanolni ekstrakt ispoljavaju citotoksičnu aktivnost prema ciljnim malignim ćelijskim linijama, koja je selektivna, što je dokazano na liniji normalnih, humanih ćelija.
- Oba ekstrakta imaju sposobnost da indukuju proces apoptoze u malignotransformisanim, humanim ćelijama.
- Vodeni ekstrakt do ćelijske smrti malignotransformisanih ćelija dovodi aktivacijom spoljašnjeg puta, dok etanolni ekstrakt ovaj proces indukuje aktivacijom i spoljašnjeg i unutrašnjeg puta.
- Oba ekstrakta zaustavljaju migraciju malignih ćelija i inhibiraju proces angiogeneze endotelnih ćelija, čime upotpunjuju svoj antitumorski potencijal.
- Oba ekstrakta deluju sinergistički sa doksorubicinom, i smanjuju migraciju i formiranje kolonija malignih ćelija u kombinovanom tretmanu sa doksorubicinom.
- Oba ekstrakta pokazala su antimikrobni efekat prema odabranim vrstama mikroorganizama.
- Oba ekstrakta imaju sposobnost da smanje produkciju faktora virulencije, kao što su glikokaliks i biofilm.
- Oba ekstrakta pokazuju sinergistički efekat sa većinom ispitanih antibiotika i antimikotika.
- Za biološku aktivnost ekstrakata odgovorni su alkaloidi tipa berberina.
- Glavni nosioci citotoksičnosti su berberin, palmatin i berbamin.

7. Literatura

Abelson P.H. Medicine from plants. *Science*. 1990; 247:513.

Albring K.F., Weidemüller J., Mittag S., Weiske J., Friedrich K., Geroni M.C., Lombardi P., Huber O. Berberine acts as a natural inhibitor of Wnt/ β catenin signaling—identification of more active 13-arylalkyl derivatives. *Biofactors*. 2013; 39:652-662.

Ariffin H., Navaratnam P., Lin H.P. Surveillance study of bacteraemic episodes in febrile neutropenic children. *Int J Clin Pract*. 2002; 56:237-240.

Augustin M., Andrees U., Grimme H., Schopf E., Simon J. Effects of Mahonia aquifolium ointment on the expression of adhesion, proliferation, and activation markers in the skin of patients with psoriasis. *Forschende Komplementarmedizin*. 1999; 6:19-21.

Bamodu O.A., Huang W.C., Tzeng D.T., Wu A., Wang L.S., Yeh C.T., Chao T.Y. Ovatodiolide sensitizes aggressive breast cancer cells to doxorubicin, eliminates their cancer stem cell-like phenotype, and reduces doxorubicin-associated toxicity. *Cancer Lett*. 2015; 364:125-134.

Bezakova, L., Misik, V., Malekova, L., Svajdlenka, E., Kostalova, D., Lipoxygenase inhibition and antioxidant properties of bisbenzylisoquinoline alkaloids isolated from Mahonia aquifolium. *Pharmazie*. 1996; 51:758-761.

Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92:1295-1302.

Brady R.A., Leid J.G., Kofonow J., Costerton J.W., Shirtliff M.E. Immunoglobulins to surface-associated biofilm immunogens provide a novel means of visualization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:6612-6619.

- Bremner P., Heinrich M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- κ B pathway. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54:453–472.
- Bodey G., Bueltmann B., Duguid W., Gibbs D., Hanak H., Hotchi M., i sar. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992; 11:99-109.
- Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I., Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect, *Curr Med Chem.* 2009; 16:3267-3285.
- Cernáková M, Kostálová D. Antimicrobial activity of berberine--a constituent of *Mahonia aquifolium*. *Folia Microbiol (Praha).* 2002; 47:375-378.
- Cernáková M., Kost'álová D., Kettmann V., Plodová M., Tóth J., Drímal J. Potential antimutagenic activity of berberine, a constituent of *Mahonia aquifolium*. *BMC Complement Altern Med.* 2002; 2:2.
- Chatterjee K., Zhang J., Honbo N., Karliner J.S. Doxorubicin Cardiomyopathy, *Cardiology*, 2010; 115:155-162.
- Chao J., Liao J.W., Peng W.H., Lee M.S., Pao L.H., Cheng H.Y. Antioxidant, Analgesic, Anti-Inflammatory, and Hepatoprotective Effects of the Ethanol Extract of *Mahonia oiwakensis* Stem. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:2928-2945.
- Chen X., Su Y., Fingleton B., Acuff H., Matrisian L.M., Zent R., Pozzi A, Increased plasma MMP9 in integrin alpha1-null mice enhances lung metastasis of colon carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2005; 116:52-61.
- Cheng S.Q. Efficacy of Berberine Combined with Ofloxacin on Acute Bacillary Dysentery in Infants and Children by Retentional Enema Treatment. *Herald of Medicine.* 2004; 23:652-653.

Cho J.Y., Nam K.H., Kim A.R., Park J., Yoo E.S., Baik K.U., Yu Y.H., Park M.H. In-vitro and in-vivo immunomodulatory effects of syringin. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53:1287-1294.

Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun,* 1982; 37:318-326.

Cometta A., Calandra T., Bille J., Glauser M.P. Escherichia coli resistant to fluoroquinolones in patients with cancer and neutropenia. *N Engl J Med.* 1994; 330:1240-1241.

Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420:860–867.

Cornelius L.A., Nehring L.C., Harding E., Bolanowski M., Welgus H.G., Kobayashi D.K., Pierce R.A. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization, *J Immunol.* 1998; 161:6845-6852.

Costerton J.W., Montanaro L., Aricola B.R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs* 2003; 28:1062-1068.

Cragg G.M., Newman D.J., Snader, K.M., 1997. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.* 1997; 60:52–60.

Cummings B.S., Lasker J.M., Lash L.H. Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293:677–685.

Damjanović A., Zdunić G., Šavikin K., Mandić B., Jadranin M., Matić I.Z., Stanojković T.P. Evaluation of the anti-cancer potential of *Mahonia aquifolium* extracts via apoptosis and anti-angiogenesis, *Bangl J Pharmacol.*, 2016; 11:741-749.

Dasari S., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740:364–378.

De Angelis A., Urbanek K., Cappetta D., Piegari E., Ciuffreda L.P., Rivellino A., Russo R. i sar. Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: a broader perspective. *Cardio-Oncology.* 2016; 2:2.

Decock J., Hendrickx W., Vanleeuw U., Van Belle V., Van Huffel S., Christiaens M.R., Ye S. i sar. Plasma MMP1 and MMP8 expression in breast cancer: protective role of MMP8 against lymph node metastasis. *BMC Cancer.* 2008; 8:77.

DiPaola R.S. To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:3311-3314.

Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-193.

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35:495–516.

Engels E.A., Lau J., Barza M. Efficacy of quinolone prophylaxis in neutropenic cancer patients: a meta-analysis. *J Clin Oncol.* 1998; 16:1179-1187.

Faith J.J., Guruge J.L., Charbonneau M., Subramanian S., Seedorf H., Goodman A.L., Clemente J.C. i sar. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science.* 2013; 341:1237439.

Farnsworth N.R., Soejarto D.D. Potential consequence of plant extinction in United States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Botany*. 1985; 39:231–240.

Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42:872-874.

Galle K., Müller-Jakic B., Proebstle A., Jurcic K., Bladt S., Wagner H. Analytical and pharmacological studies on *Mahonia aquifolium*. *Phytomedicine*. 1994; 1:59-62.

Geran R.I., Greenberg N.H., MacDonald M.M., Schunacher A.M., Abbott B.J. Protocol for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemoth Rep*. 1972; 3:1-103

Gieler U. Neue Perspektive in der Psoriasis therapie mit *Mahonia aquifolium*; Therapie mit homöopathischen Externa. *Dtsch Dermatol*. 1993; 11:1201-1207.

Gieler U., VonderWeth A., Heger M. *Mahonia aquifolium*: A new type of topical treatment for psoriasis. *J dermatol treat*. 1995; 6; 31-34.

Goldszmid R.S., Trinchieri G. The price of immunity. *Nat. Immunol*. 2012; 13:932–938.

Gonçalves C., Martins-Neves S.R., Paiva-Oliveira D., Oliveira V.E., Fontes- Ribeiro C. Gomes CM, Sensitizing osteosarcoma stem cells to doxorubicin-induced apoptosis through retention of doxorubicin and modulation of apoptotic-related proteins. *Life Sci*. 2015; 130:47-56.

Gossetti D.R. Medicinal plants. Salem Press Encyclopedia of Science, January, 2017.

Götz F. Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol*, 2004; 7:477-487.

Grumezescu A.M., Gestal M.C., Holban A.M., Grumezescu V., Vasile B.S., Mogoanta L., i sar. Biocompatible Fe₃O₄ increases the efficacy of amoxicillin delivery against gram-positive and gram-negative bacteria, *Molecules*. 2014; 19:5013–5027.

Gu G.Y., Jiang Y. Chemical constituents and biological activities of plants from genus *Mahonia*. *World Phytomedicines*. 2005; 20:185-190.

Guan, Z.M. Chronic Toxicity Testing for Gong Lao Qu Huo Tablet. *Journal of Chengdu Medical College*. 2013; 8:559-562.

Gudima S.O., Memelova L.V., Borodulin V.B., Pokholok D.K., Mednikov B.M., Tolkachev O.N., Kochetkov S.N. Kinetic analysis of interaction of human immunodeficiency virus reverse transcriptase with alkaloids. *Mol Biol (Mosk)*. 1994; 28:1308-1314.

Gulliver W.P., Donsky H.J. A report on three recent clinical trials using *Mahonia aquifolium* 10% topical cream and a review of the worldwide clinical experience with *Mahonia aquifolium* for the treatment of plaque psoriasis. *Am J Ther*. 2005; 12:398-406.

Gupta G.P., Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006; 127:679-695.

Gzyl K.E., Wieden H.J. Tetracycline does not directly inhibit the function of bacterial elongation factor Tu. *PLoS One*. 2017; 12:e0178523. doi: 10.1371/journal.pone.0178523.

Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000; 301:5–17.

Hamano Y., Zeisberg M., Sugimoto H., Lively J.C., Maeshima Y., Yang C., Hynes R.O. i sar. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin, *Cancer Cell*. 2003; 3:589-601.

Hambright H.G., Bath I.S., Xie J., Ghosh R., Kumar A.P. Palmatine inhibits growth and invasion in prostate cancer cell: Potential role for pS6/NFκB/FLIP. *Mol Carcinog.* 2015; 54:1227-1234.

Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.

Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.

Hansen, J., Ippolito, J. A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol Cell.* 2002; 10:117-128.

He J.M., Mu Q. The medical uses of the genus *Mahonia* in traditional Chinese medicine: An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175:668-683.

Heinrich M., Bremner P. Ethnobotany and ethnopharmacy-their role for anti-cancer drug development. *Curr Drug Targets.* 2006; 7:239-245.

Herrmann M., Vaudaux P.E., Pittet D., Auckenthaler R., Lew P.D., Schumacher-Perdureau F. *in vitro*. Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 1988; 158:693-701.

Hiraoka N., Allen E., Apel I.J., Gyetko M.R., Weiss S.J. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular Fibrinolysins, *Cell.* 1998; 95:365-377.

Ho Y.T., Lu C.C., Yang J.S., Chiang J.H., Li T.C., Ip S.W. *in vitro*. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer Res.* 2009; 10:4063–4070.

Holm B., Mellemegaard A., Skov T., Skov B.G. Different impact of excision repair cross-complementation group 1 on survival in male and female patients with inoperable non-small-cell lung cancer treated with carboplatin and gemcitabine. *J Clin Oncol.* 2009; 27:4254-4259.

Hu W., Yu L., Wang M.H. Antioxidant and antiproliferative properties of water extract from *Mahonia bealei* (Fort.) Carr. leaves. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49:799-806.

Hughes W.T., Armstrong D., Bodey G.P., Bow E.J., Brown A.E., Calandra T., et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:730-751.

Igney F.H., Krammer P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:277–288.

Inde D.C., Minna J.D. Non-small cell lung cancer. Part II: Treatment. *Curr Probl Cancer,* 1991; 15:105-154.

Jabbarzadeh Kaboli P., Rahmat A., Ismail P., Ling K.H. Targets and mechanisms of berberine, a natural drug with potential to treat cancer with Special focus on breast cancer. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740:584-595.

Jevons M.P., Rolinson G.N., Knox R. Celbenin-resistant staphylococci. *British Med J.* 1961; 1:124-125.

Jobin C. Colorectal cancer: CRC — all about microbial products and barrier function? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 9:694–696.

Johannes K.M., Knobloch M.A., Horstkotte H.R., Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2003; 191: 101-106.

Jung J., Choi J.S., Jeong C.S. Inhibitory Activities of Palmatine from *Coptis chinensis* Against *Helicobacter pylori* and Gastric Damage. *Toxicol Res.* 2014; 30:45-48.

Kauss T., Marchivie M., Phoeung T., Gaubert A., Désiré A., Tonelli G. i sar., Preformulation studies of ceftriaxone for pediatric non-parenteral administration as an alternative to existing injectable formulations. *Eur J Pharm Sci.* 2017; 104:382-392.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26:239–257.

Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141:52–67.

Knights D., Silverberg M.S., Weersma R.K. Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med.* 2014; 6:107.

Korpi J.T., Kervinen V., Maklin H., Vaananen A., Lahtinen M., Laara E., Ristimäki A. i sar. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. *Br J Cancer.* 2008; 98:766–775.

Kostálová D., Bukovský M., Koscová H., Kardosová A. Anticomplement activity of *Mahonia aquifolium* bisbenzylisoquinoline alkaloids and berberine extract. *Ceska Slov Farm.* 2001; 50:286-289.

Kostopoulou O.N., Magoulas G.E., Papadopoulos G.E., Mouzaki A., Dinos G.P., Papaioannou D. i sar., Synthesis and evaluation of chloramphenicol homodimers: molecular target, antimicrobial activity, and toxicity against human cells. *PLoS One.* 2015; 10:e0134526.

Kurosaka K., Takahashi M., Watanabe N., Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003; 171:4672–4679.

Lee E., Lim S.J. The association of increased lung resistance protein expression with acquired etoposide resistance in human H460 lung cancer cell lines. *Arch Pharm Res.* 2006; 29:1018-1023.

Li A.R., Zhu Y., Li X.N., Tian X.J. Antimicrobial activity of four species of Berberidaceae. *Fitoterapia.* 2007; 78:379-381.

Li Q., Withoff S., Verma I.M. Inflammation-associated cancer: NF-KB is the lynchpin. *Trends Immunol.* 2005; 26:318–325.

Lin, J. Inhibitory Effects of Berberine on Growth of K562 Cell. *Journal of Fujian Medical College.* 1996; 30:309-312.

Lin J.P., Yang J.S., Le J.H., Hsieh W.T., Chung J.G. Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12:21–28.

Lipshultz S.E., Lipsitz S.R., Sallan S.E., Dalton V.M., Mone S.M., Gelber R.D., Colan S.D. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005; 23:2629-2636.

Liu C., Bayer A., Cosgrove S.E., Daum R.S., Fridkin S.K., Gorwitz R.J. et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin Infect Dis.* 2011; 52:18–55.

Liu J., He C., Zhou K., Wang J., Kang J.X. Coptis extracts enhance the anticancer effect of estrogen receptor antagonists on human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 378:174–178.

Liu R., Cao Z., Pan Y., Zhang G., Yang P., Guo P., Zhou Q. Jatrorrhizine hydrochloride inhibits the proliferation and neovascularization of C8161 metastatic melanoma cells. *Anticancer Drugs.* 2013; 24:667-676.

Liu X.X., Liu B.M., Dong X.M., Zhang K.Y., Lin X., Chen L., He K.J. Analysis of Essential Oil from *Mahonia bodinieri* Gagnep. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*. 2010; 26.

Lowe S.W., Athena L.W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000; 21:485-495.

Lu W.J., He K.J., Ya Q.K., Chen J.Y., Liu B.M., Tan X., Su X.C., 2009. Analysis of Chemical Constituents of Petroleum Ether Fraction from *Mahonia duclouxiana* Gagnep. *Guangxi Sciences*. 2009; 16:79-81.

Lv G.H., Wang L.W., Chen J.M., Xiao P.G. Determination of seven alkaloids in *Mahonia* species by HPLC. *Chinese Journal of Pharmaceutical analysis*. 1999; 19:271-274.

Lynch S.V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016; 375:2369-2379.

Lyu X., Zhao C., Yan Z.M., Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2016; 10:1161-1171.

Mai N.T., Tuan T.A., Huong H.T., Van Minh C., Ban N.K., Van Kiem P. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids From *Mahonia Nepalensis*. *Journal of Chemistry*. 2009; 47:365-370.

Mantena S.K., Sharma S.D., Katiyar S.K. Berberine inhibits growth, induces G1 arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk1-Cdk cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP. *Carcinogenesis*. 2006; 27:2018–2027.

Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454:436–444.

Mariana N.S., Salman S.A., Neela V., Zamberi S. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Afr J Microbiol Res* 2009; 3:330-338.

Mascher T., Margulis N.G., Wang T., Ye R.W., Helmann J.D. Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol*. 2003; 50:1591–1604.

McConeghy K.W., La Plante K.L. *In vitro* activity of tigecycline in combination with gentamicin against biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68:1-6.

Meschini S., Marra M., Calcabrini A., Monti E., Gariboldi M., Dolfini E., Arancia G. Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicol In Vitro*. 2002; 16:389-398.

Millenbaugh N.J., Wientjes M.G., Au J.L. A pharmacodynamic analysis method to determine the relative importance of drug concentration and treatment time on effect. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000; 45:265-272.

Ming L.J., Epperson J.D. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorg Biochem*. 2002; 91:46–58.

Misik V., Bezakova L., Malekova L., Kostalova D. Lipoxygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberine and aporphine alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. *Planta Med*. 1995; 61:372-373.

Miwa S., Yano S., Kimura H., Yamamoto M., Toneri M., Matsumoto Y., Uehara F. *in vitro*. Cell-cycle fate-monitoring distinguishes individual chemosensitive and

chemoresistant cancer cells in drug-treated heterogeneous populations demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle*. 2015; 14:621-629.

Moody J.O., Bloomfield S.F., Hylands P.J. In-vitro evaluation of the antimicrobial activities of *Enantia chlorantha* Oliv. extractives. *Afr J Med Med Sci*. 1995; 24:269-273.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.

Müller K., Ziereis K. The antipsoriatic *Mahonia aquifolium* and its active constituents; I. Pro- and antioxidant properties and inhibition of 5-lipoxygenase. *Planta Med*. 1994; 60:421-424.

Mueller K., Ziereis K., Gawlik I. The antipsoriatic *Mahonia aquifolium* and its active constituents; II. Antiproliferative activity against cell growth of human keratinocytes. *Planta Med*. 1995; 61:74-75.

Muralee M., Deepthi S., Tripthi S., Suman B. Gentamicin: Myths and Truths. *Nitte University Journal of Health Science*. 2015; 5:4-7.

Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:932-941.

Nakamura K., Tsuchiya S., Sugimoto Y., Sugimura Y., Yamada Y. Histamine release inhibition activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Planta Med*. 1992; 58:505-508.

Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006; 2:213-219.

Oh J., Byrd A.L., Deming C., Conlan S., Kong H.H., Segre J.A. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 2014; 514:59-64.

Ohno M., Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods*. 1991; 145:199-203.

O'Neill M.J., Lewis J.A. The renaissance of plant research in the pharmaceutical industry. *Human Medicinal Agents from Plants*. 1993; 5:48–55.

Osman A.M., Bayoumi H.M., Al-Harhi S.E., Damanhoury Z.A., Elshal M.F. Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line. *Cancer Cell Int*. 2012; 12:47.

Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:221–233.

Pal R.B., Pal P., Jain S., Kulkarni K.P. In vitro study to compare sensitivity of amoxicillin + clavulanic acid and cefpodoxime + clavulanic acid among betalactamase positive clinical isolates of gram-positive and gram-negative pathogens, *J Indian Med. Assoc*. 2008; 106:545–548.

Park K.S., Kang K.C., Kim J.H., Adams D.J., Johng T.N., Paik YK. Differential inhibitory effects of protoberberines on sterol and chitin biosyntheses in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 43:667-674.

Park K.S., Kim J., Bae J., Park S.Y., Jee H.G., Lee K.E., Youn Y.K., Berberine inhibited the growth of thyroid cancer cell lines 8505C and TPC1. *Yonsei Med J*. 2012; 53:346-351.

Pearson M.M., Rogers P.D., Cleary J.D., Chapman S.W. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Ann Pharmacother*. 2003; 37:420-432.

Periasamy S., Joo H.S., Duong A.C., Bach T.H., Tan V.Y., Chatterjee S.S., i sar. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109:1281-1286.

Peters B.M., Jabra-Rizk M.A., Scheper M.A., Leid J.G., Costerton J.W., Shirtliff M.E. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms. FEMS Immunol Med Microbiol 2010; 59:493-503.

Pizzo P.A. Menegement of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. N Engl J Med. 1993; 328:1323-1332.

Prance G.T., Chadwick D.J., Marsh J. (Eds.). Ethnobotany and the Search for New Drugs: Ciba Foundation Symposium 185. John Wiley and Sons, New York. 1994; 280.

Qureshi N.N., Morikis D., Schiller N.L. Contribution of specific amino acid changes in penicillin binding protein 1 to amoxicillin resistance in clinical helicobacter pylori isolates, Antimicrob Agents Chemoter. 2011; 55:101–109.

Rahmatullah M., Jahan R., Anwarul Bashar A.B.M., Al-Nahain A., Majumder S., Tabibul Islam M., Rani Das P. A review on berbamine – a potential anticancer drug. WJPPS. 2014; 3:95-110.

Racková L., Májektivá M., Kost'álová D., Stefek M. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. Bioorg Med Chem. 2004; 12:4709-4715.

Rackova, L., Oblozinsky, M., Kostalova, D., Kettmann, V., Bezakova, L., 2007. Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of *Mahonia aquifolium* extract and isoquinoline alkaloids. J Inflamm. 2007; 4:15.

Rani S.A., Pitts B., Beyenal H., Veluchamy R.A., Lewandowski Z., Davison W.M. *in vitro*. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 2007; 189:4223-4233.

Rohrer U., Kunz E.M., Lenkeit K., Schaffner W., Meyer J. Antimicrobial activity of *Mahonia aquifolium* and two of its alkaloids against oral bacteria. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2007; 117:1126-1131.

Rosenthal J. Integrating drug discovery, biodiversity conservation, and economic development: early lessons from the international cooperative biodiversity groups. In: Grifo, F., Rosenthal, J. (Eds.), *Biodiversity and Human Health*. Island Press, Washington. DC. 1997; 281–301.

Salvesen G.S., Dixit V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 1997; 91:443–446.

Salomon J.J., Ehrhardt C. Nanoparticles attenuate P-glycoprotein/MDR1 function in A549 human alveolar epithelial cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 77:392-397.

Sang Q.X. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res.* 1998; 8:171-177.

Sanders M.M., Liu A.A., Li T.K., Wu H.Y., Desai S.D., Mao Y., Rubin E.H., LaVoie E.J., Makhey D., Liu L.F. Selective cytotoxicity of topoisomerase-directed protoberberines against glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56:1157-1166.

Satoh K., Nagai F., Ono M., Aoki N. Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase by the extract of *Stephania cepharantha* HAYATA and bisbenzylisoquinoline alkaloid cycleanine, a major constituent. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66:379-385.

Savill J., Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000; 407:784–788.

Schmeller T., Latz-Brüning B., Wink M. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*. 1997; 44:257-266.

Sethi, M.L. Enzyme inhibition VI: inhibition of reverse transcriptase activity by protoberberine alkaloids and structure activity relationships. *J Pharm SCI-US*. 1983; 72:538-541.

Seow W.K., Ferrante A., Summors A., Thong Y.H. Comparative effects of tetrandrine and berbamine on production of the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Life Sci*. 1992; 50:PL53-PL58.

Shukla S.K., Quraishi M.A. Cefalexin drug: A new and efficient corrosion inhibitor for mild steel in hydrochloric acid solution. *Mater Chem Phys*. 2010; 120:142-147.

Slavik J., Bochorakova J., Kostalova D., Hrochova, V., 1985. Alkaloids of *Mahonia aquifolium* (PURSH) NUTT. 2. *Chemical Papers*. 1985; 39:537-542.

Slobodníková L., Kost'álová D., Labudová D., Kotulová D., Kettmann V. Antimicrobial activity of *Mahonia aquifolium* crude extract and its major isolated alkaloids. *Phyther Res*. 2004; 18:674-676.

Smiley S., Almyroudis N., Segal B.H. Epidemiology and Management of Opportunistic Infections in Immunocompromised Patients With Cancer. *Abstr. Hematol Oncol*. 2005; 8:20-30.

Sotníková R., Kettmann V., Kostálová D., Táborská E. Relaxant properties of some aporphine alkaloids from *Mahonia aquifolium*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1997; 19:589-597.

Sotníková R., Kost'álová D., Vaverková S. Effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Mahonia aquifolium* on the isolated rat aorta. *Gen Pharmacol*. 1994; 25:1405-1410.

Stanhope M.J., Lefebure T., Walsh S.L., Becker J.A., Lang P., Bitar P.D.P. i sar. Positive selection in penicillin-binding proteins 1a, 2b, and 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its correlation with amoxicillin resistance development. *Infect Genet Evol*. 2008; 8:331–339.

Steeg P.S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006; 12:895-904.

Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000; 40:175-179.

Suess T.R., Stermitz F.R. Alkaloids of *Mahonia repens* with a brief review of previous work in the genus *Mahonia*. *J Nat Prod*. 1981; 44:680-687.

Tay W.M., Epperson J.D., Da Silva G.F., Ming L.J. ¹H NMR, mechanism, and mononuclear oxidative activity of the antibiotic metallopeptide bacitracin: the role of D-Glu-4 interaction with pyrophosphate moiety, DNA binding and cleavage, and bioactivity. *J Am Chem Soc*. 2010; 132:5652–5661.

Taylor P., Colman L., Bajoon J. The search for plants with anticancer activity: pitfalls at the early stages. *J Ethnopharmacol*. 2014; 158:246-254.

Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T.E., Altman R.B., Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21:440-446.

Tillhon M., Guamán Ortiz L.M., Lombardi P., Scovassi A.I. Berberine: new perspectives for old remedies. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84:1260-1267.

Tipton J.M. Side effects of cancer chemotherapy, in *Handbook of Cancer Chemotherapy* (Skeel RT ed). 2003; pp 561–580, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Vento S., Cainelli F. Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. *Lancet Oncol*. 2003; 4:595-604.

Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*. 2000; 243:167-190.

Volleková A., Kostálová D., Sochorová R. Isoquinoline alkaloids from *Mahonia aquifolium* stem bark are active against *Malassezia* spp. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001; 46:107-111.

Vollekova, A., Kost'alova, D., Kettmann, V., Toth, J., 2003. Antifungal activity of *Mahonia aquifolium* extract and its major protoberberine alkaloids. *Phytother Res*. 2003; 17:834-837.

Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000; 182:2675-2679.

Weinberg R.A. *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor et Francis Group 2007.

White R.L., Burgess D.S., Mandru M., Bosso J.A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. *Antimicrobial Agents Chemother* 1996; 40:1914-1918.

Wiesnauer M., Lüdtke R. *Mahonia aquifolium* in patients with psoriasis vulgaris - an intraindividual study. *Phytomedicine*. 1996; 3:231-235.

Wiesnauer, M. Wirksamkeit und Verträglichkeit von *Mahonia aquifolium* bei Psoriasis vulgaris. *Extr Dermatol*. 1992; 16:23-31.

Wlodkovic D., Telford W., Skommer J., Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol*. 2011; 103:55-98.

Wong B.S., Hsiao Y.C., Lin T.W., Chen K.S., Chen P.N., Kuo W.H., Chu S.C., Hsieh Y.S. The in vitro and in vivo apoptotic effects of *Mahonia oiwakensis* on human lung cancer cells. *Chem Biol Interact*. 2009; 180:165-174.

Wong C.W., Seow W.K., Thong Y.H. Comparative effects of tetrandrine and berbamine on acute and relapsing experimental allergic encephalitis in Lewis rats. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992; 97:31-36.

Wong H.L., Bendayan R., Rauth A.M., Xue H.Y., Babakhanian K., Wu X.Y. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 317:1372-1381.

Wronska N., Felczak A., Zawadzka K., Poszepczynska M., Rozalska S., Bryszewska M. *in vitro*, Poly(propylene imine) dendrimers and amoxicillin as dual-action antibacterial agents, *Molecules*. 2015; 20:19330–19342.

Yao F.L., Yin X.D., An Y.L. Curative effect observation of leather leaf mahonia, raw licorice root combined with Azithromycin on Mycoplasma Pneumonia in children. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*. 2010; 19:1479.

Yu Q.G., Xiong Z.Q. Study on Antioxidation of Mahonia. *Practical Preventive Medicine*. 2007; 14:695-696.

Yu Q.G., Yan D.H., Liu J.P., Xiong Z.Q. Effect of Mahonia on the SOD Activity and MDA Content in Serum of Mice. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*. 2008; 19:1332-1333.

Zec M., Srdic-Rajic T., Krivokuca A., Jankovic R., Todorovic T., Anelkovic K., Radulovic S. Novel selenosemicarbazone metal complexes exert anti-tumor effect via alternative, caspase-independent necroptotic cell death. *Med Chem.*, 2014; 10:759-771.

Zeng X., Lao B., Dong X., Sun X., Dong Y., Sheng G., Fu J. Study on anti-influenza effect of alkaloids from roots of Mahonia bealei in Vitro. *Zhong Yao Cai*. 2003; 26:29-30.

Zhang S.L., Li H., He X., Zhang R.Q., Sun Y.H., Zhang C.F., Wang C.Z., Yuan C.S. Alkaloids from Mahonia bealei possess anti-H⁺/K⁺-ATPase and anti-gastrin effects on pyloric ligation-induced gastric ulcer in rats. *Phytomedicine* 2014; 21:1356-1363.

Zhang Z.D. Study on Chronic Toxicity of Fu Ke Qian Jin Tablet. *Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine*. 1998; 14:47.

Zhang Y., Zou B.Q., Yi Lin F., Yi X.H., Pan Y.M., 2011. Antioxidant Activity of Extract From Mahonia berlei Fruit. *Journal of Guangxi Normal University: Natural Science Edition*. 2011; 29:43-46.

Zhao T.F., Wang X.K., Rimando A.M., Che C.T. Folkloric medicinal plants: *Tinospora sagittata* var. *cravaniana* and Mahonia bealei. *Planta Med*. 1991; 57:505.

Zhao X., Zhang J., Tong N., Liao X., Wang E., Li Z., Luo Y., Zuo H. Berberine attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *J Int Med Res*. 2011; 39:1720-1775.

8. Prilozi

Biografija

Ana B. Damjanović rođena je 22.06.1982. godine u Jagodini. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut završila je 2009. godine sa srednjom ocenom 8.84 i ocenom 10 (deset) na diplomskom ispitu. U 2010/2011. školskoj godini upisala je doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Farmaceutska mikrobiologija.

Obavezan staž za diplomirane farmaceute obavila je tokom 2009/2010. godine u apoteci „Miroslav Trajković“ ustanova „Apoteka Beograd“ i u apoteci Urgentnog centra, Kliničkog centra Srbije. Stručni ispit za diplomirane farmaceute položila je u junu 2010. godine.

U decembru 2010. godine počela je da volontira na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Odeljenje eksperimentalne onkologije, u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora. Od februara 2011. godine zaposlena je na projektu broj 175011 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Odeljenje eksperimentalne onkologije, u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora.

U januaru 2011. godine dobila je zvanje istraživač pripravnik. U februaru 2013. godine dobila je zvanje istraživač saradnik.

Ana je do sada publikovala 14 naučnih radova: 7 M₂₁ kategorije, 3 M₂₂ kategorije i 4 M₂₃ kategorije.

Od 2011. godine član je Evropskog udruženja za istraživanje raka (EACR), kao i Srpskog društva istraživača raka (SDIR).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ана Дамјановић

Број индекса 34/10

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„*In vitro* испитивање антитуморске и антимикробне активности екстраката махоније, *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.“

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

Потпис аутора

У Београду, 26. јануар 2018.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Дамјановић

Број индекса 34/10

Студијски програм Фармацеутске науке; Фармацеутска микробиологија

Наслов рада

**„*In vitro* испитивање антитуморске и антимикробне активности екстраката
махоније, *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.“**

Ментори dr sc. Јелена Антић Станковић, редовни професор, Фармацеутски
факултет, Универзитет у Београду;

dr sc. Татјана Станојковић, виши научни сарадник, Институт за
онкологију и радиологију Србије

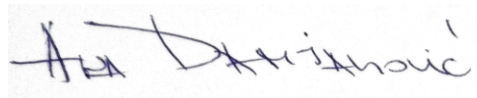
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској
верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму
Универзитета у Београду.**

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

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

Потпис аутора

У Београду, 26. јануар 2018.



Изјава о коришћењу

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

„*In vitro* испитивање антитуморске и антимикробне активности екстраката махоније, *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt.“

која је моје ауторско дело.

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

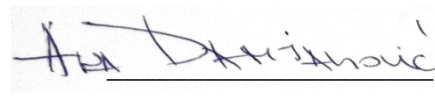
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 26. јануар 2018.



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

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

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

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

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

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

