

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Bojana P. Vasiljević

**HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA,
ANTIMIKROBNA I CITOTOKSIČNA
AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I
POSTDESTILACIONOG OSTATKA KLEKE
(*Juniperus communis* L.) I NJIHOVO
KOMBINOVANO DELOVANJE SA
KONVENCIONALNIM ANTIBIOTICIMA
I CITOSTATICIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Bojana P. Vasiljević

**CHEMICAL CHARACTERIZATION,
ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITY
OF ESSENTIAL OIL AND
POST-DISTILLATION WASTE OF JUNIPER
(*Juniperus communis* L.) AND THEIR
COMBINATIONS WITH CONVENTIONAL
ANTIBIOTICS AND CYTOSTATICS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTOR I ČLANOVI KOMISIJE DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentor:

dr Biljana Nikolić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Jelena Knežević-Vukčević, redovni profesor u penziji,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Dragana Mitić-Ćulafić, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Dejan Orčić, vanredni profesor,
Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet,
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine

dr Tatjana Srdić-Rajić, naučni savetnik,
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je najvećim delom u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, dok su pojedini delovi rađeni u: laboratoriji Katedre za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda, Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu; eksperimentalnoj laboratoriji Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije; Mikološkoj laboratoriji Odeljenja za fiziologiju biljaka, Univerziteta u Beogradu – Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“; Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Katedri za upravljanje bezbednošću i kvalitetom hrane, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i na Odseku za poljoprivredna istraživanja i razvoj Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije izvedena su u okviru projekta OI 172058 „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svima onima koji su na bilo koji način učestvovali u izradi ove doktorske disertacije. Bez vas ne bi bilo ove priče!

Hvala...

Prof. dr Biljani Nikolić, mom mentoru, učitelju, saradniku i prijatelju! Hvala Biljo na ukazanom poverenju i stručnom vođenju od početka do kraja izrade ove teze. Hvala za razumevanje i strpljenje, podsticanje razvoja kritičkog mišljenja, na brojnim idejama i savetima koji su mi pomogli da budem danas ovde gde jesam. Zahvaljujući vama, spremna sam za novo životno poglavlje!

Prof. dr Jeleni Knežević-Vukčević na dragocenim sugestijama tokom izrade i pregleda ove disertacije. Hvala Vam na ukazanom poverenju, nenametljivom profesionalizmu, mnogobrojnim stručnim savetima i prilici da se usavršavam na Katedri za mikrobiologiju.

Dr Dragani Mitić-Ćulafić na korisnim savetima tokom izvođenja eksperimentalnog rada, kao i dragocenim sugestijama u završnoj fazi pisanja. Hvala na prijateljskim savetima, nesebičnoj pomoći i saradnji tokom svih ovih godina.

*Prof. dr Dejanu Orčiću za hemijsku analizu etarskog ulja i postdestilacionog ostatka *Juniperus communis*, na kritičkoj oceni teze kao i dragocenim savetima prilikom finalnog oblikovanja teksta.*

Dr Tatjani Srdić Rajić za pomoć u eksperimentalnom radu i obradi rezultata koji se odnose na citometrijske analize, kao i na uobličavanju finalne verzije doktorke teze.

*Dipl. biologu Nataši Milojević za sakupljanje biljnog materijala i pripremu uzoraka, dr Marini Francisković za pomoć u izradi testova antioksidativnosti; doc. dr Emiliji Svirčev na prijateljskoj podršci i nesebičnoj pomoći u obradi rezultata koji se odnose na testove antioksidativnosti; dr Ani Ćirić za pomoć u ispitivanju antifungalnog efekta, prof. dr Iliji Đekiću i prof. dr Igoru Tomaševiću za pomoć u izvođenju senzorne analize, pripremi uzoraka mesa za in situ eksperimente i za pomoć u statističkoj obradi podataka; dr Tatjani Marković za pomoć u ispitivanju hemijskog sastava komercijalno nabavljenih etarskih ulja; prof. dr Miroslavu Živiću za statističku obradu dela podataka; dr Branku Velebitu, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, za ljubazno ustupljene izolate *Listeria monocytogenes*, korišćene u ovom radu.*

Članovima Katedre za mikrobiologiju prof. dr Slaviši Stankoviću, prof. dr Branki Vuković-Gaćić i prof. dr Tanji Berić na pruženom znanju iz oblasti mikrobiologije, profesionalnoj i prijateljskoj podršci tokom rada u laboratoriji. Hvala Vam na besprekornoj saradnji!

Mojim dragim kolegama Stefani Cvetković, dr Olji Stanojević, dr Marini Jovanović, Stefani Đukanović, Jeleni Đorđević, Tamari Pavlović i dr Ivanu Nikoliću na korisnim savetima, kolegijalnosti i oslobađanju od brojnih dužnosti za vreme pisanja rada, druženju i prijateljskoj atmosferi na poslu.

Dragim kolegama i prijateljima Ivici, Stoimiru, Karolini, Jovani i Tamari na svim godinama zajedničkog rada, na svesrdnoj pomoći tokom izvođenja eksperimenata i najboljim danima na poslu i van posla. Zadovoljstvo mi je što sam imala priliku da upoznam tako kvalitetne ljude i vrhunske istraživače. Kao deo tima, naučila sam mnogo toga!

Tatjani Popržen, Dragani Kovačević, Ani Paunkov i Ani Marković, tadašnjim master studentima, koje su pomogle u izvođenju pojedinih eksperimenata.

Članovima Narodne biblioteke Arilje, zato što su moj boravak u čitaonici učinili prijatnim tokom pisanja teze.

Svim mojim prijateljima na podršci, smehu i činjenici da ste svaki moj uspeh doživljavali kao svoj! Na sve ovo, tebi dugujem jedno veliko hvala, Sara!

Neveni za veliku pomoć oko Relje, i pruženoj prilici da radim mirne glave. Hvala ti Neno!

Mojim Vasilijevićima, Jovanovićima i Vasovićima za svu ljubav, razumevanje i podršku, tokom proteklih godina.

Mojim roditeljima na bezrezervnoj podršci, poverenju i školovanju! Hvala vam za svu pruženu ljubav, za životnu školu i za ono što jesam. Hvala vam za sve!

Jovani i Nemanji...nema tih reči kojima bih mogla da vam se zahvalim. Mogu samo reći da sam srećna što vas imam!

Mom Borivoju na безусловnoj ljubavi i strpljenju! Hvala ti što si uvek podržavao moje ambicije i verovao u mene kada ni sama nisam! Hvala ti što si ovaj put prešao sa mnom!

Mom Relji, mojoj glavnoj motivaciji! Znaj, da su mi tvoje ručice oko vrata, kada zakasnim kući, dale najveću snagu i volju da završim ovaj rad! Zbog tebe, još više verujem u sebe i sigurno koračam napred!

*Mojim roditeljima
Mom sinu Relji*

Hemijska karakterizacija, antimikrobna i citotoksična aktivnost etarskog ulja i postdestilacionog ostatka kleke (*Juniperus communis* L.) i njihovo kombinovano delovanje sa konvencionalnim antibioticima i citostaticima

SAŽETAK

U ovom radu ispitivana su etarska ulja i postdestilacioni ostatak (PDO) *Juniperus communis* L. GC-MS analiza ulja je pokazala dominantno učešće α -pinena, a LC-MS/MS je identifikovala hinsku kiselinu i rutin kao najzastupljenije u PDO. Bolja antioksidativna aktivnost PDO utvrđena je u TBA i naročito DPPH eseju (IC₅₀ 4,4 μ g/mL), što potvrđuju i rezultati FRAP testa. Citotoksičnost je bila veća u slučaju ulja: IC₅₀ vrednosti na ćelijskim linijama HT-29, HCT 116, A549 i MRC-5 bile su u opsegu 69-120 μ g/mL. Efekat kombinacija oba derivata sa doksorubicinom na kancerskim A549 i normalnim MRC-5 ćelijama bio je sinergistički, naročito u slučaju A549. Citometrijska analiza i alkalni komet test su pokazali da PDO indukuje apoptozu, zaustavlja ćelijski ciklus i ima genotoksični efekat.

MIK testom je utvrđeno da su *Listeria monocytogenes* i *Aspergillus versicolor* najosetljivije, posebno prema PDO (MIK 0,39 i 0,12 mg/mL). Sinergizam je uočen u slučaju tretmana listerije kombinacijama ulja/PDO i streptomocina/ampicilina/azitromicina, kao i *Candida albicans* kombinacijom PDO i bifonazola. Adhezija patogena na ćelije kolona u kulturi bila je inhibirana dejstvom PDO ili ulja, u slučaju listerije ili kandidate. Etarska ulja kleke i čubra, primenjena u mikrodilucionim testovima odvojeno ili u kombinacijama, pokazala su dobar potencijal i postojanje sinergizma u slučaju primoizolata *L. monocytogenes*. *Time kill* test je potvrdio sinergizam i ukazao na veću osetljivost listerije u aerobnim nego hipoksičnim uslovima. Ulja primenjena na mariniranom mesu inhibirala su rast ukupnih aerobnih heterotrofa, enterobakterija, bakterija mlečne kiseline i inokulisane listerije.

Uočeni citotoksični i antimikrobni efekat preporučuju derivate kleke za adjuvante koji pojačavaju aktivnost konvencionalnih lekova.

Ključne reči: *Juniperus communis*, etarska ulja, postdestilacioni ostatak, citotoksičnost, genotoksičnost, doksorubicin, antimikrobna aktivnost, *Listeria monocytogenes*, sinergizam, antibiotici;

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija mikroorganizama

Chemical characterization, antimicrobial and cytotoxic activity of essential oil and post-distillation waste of juniper (*Juniperus communis* L.) and their combinations with conventional antibiotics and cytostatics

ABSTRACT

In this work essential oils and post-distillation waste (PDW) of *Juniperus communis* L. were screened. GC-MS analysis pointed at α -pinene as dominant constituent of oils; LC-MS/MS identified quinic acid and rutin as the most prevalent in PDW. Higher antioxidativity of PDW was shown in TBA and especially DPPH assay (IC_{50} 4.4 μ g/mL), which is additionally confirmed by FRAP test. Oil induced higher cytotoxicity against HT-29, HCT 116, A549 and MRC-5 cells, with IC_{50} values ranging 69-120 μ g/mL. Combinations of each derivative with doxorubicin, applied on cancer A549 and normal MRC-5 cells induced synergism especially pronounced in A549. Cytometric analysis and alkaline comet test showed that PDW induced apoptosis and cell cycle arrest, and was genotoxic.

Microdilution assay pointed at *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus versicolor* as the most sensitive, especially to PDW (MIC 0.39 and 0.12 mg/mL). Synergism was observed in the case of listeria treated with combinations of oil/PDW and streptomycin/ampicillin/azithromycin, as well as *Candida albicans* with a combination of PDW and bifonazole. *In vitro* adhesion of *L. monocytogenes*/*C. albicans* to colon cells was inhibited by PDW and oil, respectively. Additionally, juniper and savory essential oils, applied in microdilution tests separately or in combinations, showed notable potential and synergism in the case of primoisolates of listeria. Time kill assay confirmed synergism and indicated a higher bacterial sensitivity under aerobic than hypoxic conditions. Oils applied to marinated meat inhibited the growth of total aerobic heterotrophs, enterobacteria, lactic acid bacteria and inoculated listeria.

Observed cytotoxic and antimicrobial effect recommends juniper derivatives as adjuvants that enhance conventional drugs activity.

Key words: *Juniperus communis*, essential oils, post-distillation waste, cytotoxicity, genotoxicity, doxorubicin, antimicrobial activity, *Listeria monocytogenes*, synergism, antibiotics;

Scientific field: Biology

Scientific sub-field: Biology of microorganisms

Spisak skraćenica i oznaka

A549 – ćelijska linija epitelnih ćelija adenokarcinoma pluća
AA-tRNK – aminoacil-tRNK
AHMB – **aerobne heterotrofne mezofilne bakterije**
Amp – **ampicilin**
Aneksin V-FITC – **Anneksin V- fluorescein isothiocyante**
ATCC – američki tip kolekcije kultura (eng. *American Type Culture Collection*)
Azm – **azitromicin**
BHT– **butil-hidroksitoluen**
Bif– **bifonazol**
BMK – **bakterije mlečne kiseline**
CDK – ciklin zavisna kinaza (eng. *Cyclin Dependent Kinase*)
CFU– eng. *Colony-Forming Unit*
cMIK – dinamički (eng. *curve*) **MIK** (vidi dole za MIK)
DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DMSO – dimetil sulfoksid
DOX – doksorubicin
ECACC – evropska kolekcija autentičnih ćelijskih kultura (eng. *The European Collection of Authenticated Cell Cultures*)
EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*)
ENT – **Enterobacteriaceae**
FIC_i – indeks fracione inhibitorne koncentracije (eng. *Fractional Inhibitory Concentration index*)
FRAP – *Ferric Reducing Ability of Plazma*
CI – kombinatorni indeks
5-FU – 5-fluorouracil
GC-MS – gasna hromatografija sa masenim detektorom (eng. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*)
HCT116 – ćelijska linija epitelnih ćelija kolorektalnog adenokarcinoma
HT-29 – ćelijska linija epitelnih ćelija kolorektalnog adenokarcinoma
IC₅₀ – **inhibitorna koncentracija koja dovodi do smanjenja praćenog efekta (preživljavanja, koncentracije DPPH radikala isl.) za 50 %**
Jc-EU-P – etarsko **ulje** proizvedeno iz ženskih šišarki kleke (*Juniperus communis* var. *saxatilis*)
Jc-EU-K – komercijalno nabavljeno etarsko **ulje** ženskih šišarki kleke (*Juniperus communis*)
Kkz – **ketokonazol**
LC-MS/MS - tečna hromatografija sa tandemskim masenim detektorom (eng. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)
LP – **lipidna peroksidacija**
MeOH – metanol
MBK/MFK – **minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija**
MDA – **malonildialdehid**
MDR – multirezistencija, rezistencija kancerskih ćelija/mikroorganizama na veći broj terapeutika (eng. *Multidrug Resistance*)
MIK – **minimalna inhibitorna koncentracija**

MMR – ispravka pogrešno sparenih baza u molekulu DNK (eng. *Mismatch Repair*)

MRC-5 – ćelije fibroblasta normalnog tkiva pluća

MRSA – meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (eng. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*)

MTT- (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

NER –reparacija DNK isecanjem nukleotida (eng. *Nucleotide Excision Repair*)

NSCLC – nemikrocelularni karcinom pluća (eng. *Non-Small Cell Lung Cancer*)

Nst – **nistatin**

PABA – **para-amino-benzoeva kiselina**

PBP – penicilin-vezujući proteini (eng. *Penicillin Binding Proteins*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PDO – post-destilacioni ostatak ženskih šišarki *Juniperus communis* var. *saxatilis*

PI – *Propidium-Iodide*

P-gp – P-glikoprotein

QS – (eng. *Quorum Sensing*); signalni put kod bakterija koji reguliše međucelijsku komunikaciju i reguliše ekspresiju pojedinih metaboličkih puteva, u zavisnosti od brojnosti ćelija u populaciji

RAPD – metod nasumično umnožene polimorfne DNK (eng. *Random Amplification of Polymorphic DNA*)

Rif – **rifampicin**

RKV – reaktivne kiseonične vrste

RNaza A – Ribonuclease A

SCGE – elektroforeza pojedinačnih ćelija (eng. *Single Cell Gel Electrophoresis*)

SI_K – indeks selektivne toksičnosti prema kancerskim ćelijama (eng. *Selectivity Index against cancer cells*)

SI_M – indeks selektivne toksičnosti prema mikroorganizmima (eng. *Selectivity Index against microorganisms*)

Sm-EU – komercijalno nabavljeno etarsko ulje čubra (*Satureja montana*)

SRM -*Selected Reactions Monitoring*

Str – **streptomycin**

TBA – tiobarbiturna kiselina (eng. *thiobarbituric acid*)

TI – intenzitet repa komete (eng. *Tail Intensity*)

VM – osnovna vinska **marinada**

VM+J – vinska **marinada** sa dodatkom ulja kleke (*Juniperus*) koncentracije 0,25 %

VM+S – vinska **marinada** sa dodatkom ulja čubra (*Satureja*) koncentracije 0,125 %

VM+JS – vinska **marinada** sa dodatkom kombinacije ulja kleke – *Juniperus* (0,25 %) i čubra – *Satureja* (0,125 %)

VRE – vankomicin-rezistentni enterokok (eng. *Vancomycin-Resistant Enterococci*)

WHO – Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*)

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Antibakterijski agensi i mehanizmi njihovog delovanja	1
1.2. Mehanizmi rezistencije bakterija na antimikrobne agense	3
1.3. Antifungalni agensi i mehanizmi njihovog delovanja.....	5
1.4. Mehanizmi rezistencije gljiva na antifungalne agense	6
1.5. Kancerogeneza i kancer pluća.....	7
1.6. Citostatici i mehanizmi njihovog delovanja	7
1.7. Mehanizmi rezistencije kancerskih ćelija na citostatike.....	9
1.8. Biljke kao izvori biološki aktivnih materija	11
1.8.1. Sekundarni metaboliti biljaka i mehanizmi njihovog delovanja	12
1.8.1.1. Etarska ulja i mehanizmi njihovog delovanja na bakterije	12
1.8.1.2. Fenolna jedinjenja i mehanizmi njihovog delovanja na bakterije	13
1.8.1.3. Sekundarni metaboliti i mehanizmi delovanja na gljive.....	14
1.8.1.4. Antikancerski efekat biljnih derivata.....	15
1.8.2. Rod <i>Juniperus</i>	17
1.8.2.1. Biološke aktivnosti <i>J. communis</i>	18
1.9. Mikroorganizmi kontaminanti hrane	20
1.9.1. Gljive kao kontaminanti hrane	20
1.9.2. Patogene bakterije prenosive hranom.....	22
1.9.2.1. Gram-pozitivne bakterije	22
1.9.2.2. Gram-negativne bakterije	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
3. MATERIJAL I METODE	27
3.1. MATERIJAL	27
3.1.1. Biljni materijal.....	27
3.1.2. Etarska ulja.....	27
3.1.3. Biološki materijal	27
3.1.3.1. Mikroorganizmi	27
3.1.3.2. Ćelijske linije.....	28
3.1.4. Rastvori i reagensi koršćeni u hemijskim testovima	29
3.1.5. Materijal za gajenje mikroorganizama	30
3.1.5.1. Hranljive podloge	30
3.1.5.2. Rastvori i reagensi	31
3.1.5.3. Antimikrobni agensi	31

3.1.5.4. Dodatni materijal za ispitivanje antibakterijskog potencijala <i>in situ</i>	32
3.1.6. Materijal za gajenje sisarskih ćelija.....	33
3.1.6.1. Hranljive podloge.....	33
3.1.6.2. Rastvori i reagensi.....	34
3.1.6.3. Citostatici.....	35
3.2. METODE.....	35
3.2.1. Hemijske analize i detekcija antioksidativne aktivnosti.....	35
3.2.1.1. Priprema etarskog ulja i postdestilacionog ostatka <i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	35
3.2.1.2. GC-MS analiza etarskih ulja.....	36
3.2.1.3. Kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja LC-MS/MS metodom.....	37
3.2.1.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	37
3.2.1.5. Određivanje antioksidativnog potencijala.....	38
3.2.1.5.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (DPPH test).....	38
3.2.1.5.2. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije (TBA test).....	38
3.2.1.5.3. Određivanje redukcionog kapaciteta (FRAP test).....	39
3.2.2. Detekcija antimikrobnog potencijala.....	39
3.2.2.1. Gajenje mikroorganizama.....	39
3.2.2.2. Priprema inokuluma mikroorganizama za mikrodilucione eseje.....	40
3.2.2.3. MIK test.....	41
3.2.2.4. <i>Checkerboard</i> test.....	43
3.2.2.5. Ispitivanje vremenski zavisne inhibicije rasta test supstancama <i>in vitro</i>	44
3.2.2.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti prirodnih proizvoda <i>in situ</i>	46
3.2.2.6.1. Priprema mesa i inokulacija bakterijama <i>L. monocytogenes</i>	46
3.2.2.6.2. Mariniranje.....	46
3.2.2.6.3. Mikrobiološka analiza.....	46
3.2.2.6.4. Senzorna analiza prirodnih proizvoda u odabranom matriksu hrane.....	47
3.2.3. Metode koje obuhvataju gajenje humanih ćelija u kulturi.....	48
3.2.3.1. Odmrzavanje zamrznutih ćelija i njihovo gajenje.....	48
3.2.3.2. Tripsinizacija ćelijskih kultura.....	48
3.2.3.3. Određivanje broja ćelija bojenjem tripan plavim.....	48
3.2.3.4. Krioprezervacija ćelija.....	49
3.2.3.5. Ispitivanje citotoksične aktivnosti biljnih derivata <i>in vitro</i>	49
3.2.3.6. Ispitivanje citotoksičnog efekta dva agensa u kombinaciji.....	50
3.2.3.6.1. Analiza tipa interakcije test supstanci u binarnim kombinacijama.....	50
3.2.3.7. Citometrijska analiza ćelija u kulturi.....	51
3.2.3.7.1. Priprema suspenzije ćelija.....	51

3.2.3.7.2. Određivanje tipa ćelijske smrti	51
3.2.3.7.3. Citometrijska analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	52
3.2.3.8. Ispitivanje genotoksičnog potencijala primenom komet testa	52
3.2.3.8.1. Pripremanje suspenzije ćelija	52
3.2.3.8.2. Komet test – elektroforeza pojedinačnih ćelija	53
3.2.4. Metode za ispitivanje interakcije mikrororganizama i humanih ćelija gajenih u kulturi i uporednu analizu antimikrobnog i citotoksičnog potencijala	53
3.2.4.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti biljnih derivata <i>in vitro</i> - test adhezivnosti	53
3.2.4.2. Procena selektivnosti uočenih efekata prema mikroorganizmima	54
3.2.5. Statističke analize	55
4. REZULTATI	56
4.1. Hemijska karakterizacija test supstanci i njihova antioksidativna aktivnost	56
4.1.1. Hemijski sastav etarskih ulja	56
4.1.2. Hemijski sastav PDO	58
4.1.3. Antioksidativni potencijal derivata <i>J. communis</i> var. <i>saxatilis</i>	60
4.2. Citotoksična aktivnost derivata <i>J. communis</i> var. <i>saxatilis in vitro</i>	60
4.2.1. Citotoksična aktivnost pojedinačnih test supstanci	60
4.2.2. Citotoksična aktivnost dve test supstance u kombinaciji	62
4.2.3. Efekat derivata kleke na apoptozu i zaustavljanje ćelijskog ciklusa	67
4.2.4. Genotoksičnost test supstanci	68
4.3. Antimikrobni potencijal derivata kleke	68
4.3.1. Antifungalni i antibakterijski efekat pojedinačno primenjenih test supstanci	69
4.3.2. Antimikrobni potencijal kombinacije derivata kleke i antibiotika/antimikotika	71
4.3.3. Selektivni antimikrobni efekat derivata kleke	72
4.3.4. Efekat derivata kleke na adheziju patogena <i>in vitro</i>	73
4.3.5. Antimikrobni potencijal kleke u prehrambenim proizvodima	74
4.3.5.1. Antilisterijalni efekat etarskih ulja i tip interakcije u binarnim kombinacijama	74
4.3.5.2. Analiza senzorne prihvatljivosti	76
4.3.5.3. Dinamika inhibicije rasta sojeva <i>L. monocytogenes</i>	78
4.3.5.4. Antibakterijski efekat vinskih marinada sa etarskim uljima	82
5. DISKUSIJA	89
6. ZAKLJUČCI	105
7. LITERATURA	107
8. PRILOZI	126

UVOD

1. UVOD

Lečenje biljkama staro je koliko i samo čovečanstvo. Čovekova potreba da pobedi bolest seže daleko u prošlost, o čemu svedoče brojni pisani dokumenti, sačuvani spomenici, čak i originalni biljni lekovi. Imajući u vidu činjenicu da u to vreme nije bilo dovoljno informacija u vezi sa nastankom bolesti, upotreba lekovitog bilja bila je empirijska, a lečenje se zasnivalo na iskustvu. Kao rezultat neprekidne borbe sa bolešću čovek je sticao i znanje o upotrebi lekovitih biljaka. Najstariji pisani dokazi o upotrebi biljnih sirovina i pripremi lekova pronađeni su na sumerskoj glinenoj ploči staroj 5000 godina, kao i u knjigama kineskih i indijskih naroda. Tako su Kinezi pre 2500 godina koristili plesan i usireno sojino mleko za lečenje gnojnih procesa na koži. Egipćani su ostavili zapise na papirusu o upotrebi mirte za lečenje površinskih rana. U tradicionalnoj medicini Indijanaca Perua korišćena je kora kininovog drveta za lečenje malarije, a u 17. veku španski misionari su kinin preneli u Evropu. Početak 19. veka smatra se prekretnicom u saznanju o korišćenju lekovitog bilja (Petrovska, 2012). Otkriće i izolacija brojnih aktivnih supstanci označila je početak razvoja farmacije. Neraskidiva veza između čoveka i lečenja biljkama oslabljena je krajem 19. veka, sa pojavom aspirina. To je bila prva sintetička zamena za salicilnu kiselinu, aktivnu supstancu koju su do tada dobijali iz kore drveta vrbe i koristili kao lek za bolove i groznicu (Raskin i sar., 2002). Ipak, najvećim dostignućima 20. veka smatraju se otkriće „čudotvornog leka“, penicilina, 1928. godine i uvođenje antibiotika u kliničku praksu 1942. godine, čime je započelo „zlatno doba“ antimikrobne terapije (Gaynes, 2017). Ovaj period prati ekspanzija farmaceutske industrije, kao i nastanak brojnih polusintetičkih i sintetičkih lekova. Uvođenje antibiotika u kliničku praksu dovelo je do revolucije u savremenoj medicini, naročito kada je u pitanju lečenje bakterijskih infekcija.

Zahvaljujući širokoj primeni antibiotika, mortalitet uzrokovan infektivnim oboljenjima značajno je opao, te se realnim čine procene da će vodeći uzrok smrtnosti u 21. veku biti kancerska oboljenja (WHO, 2014). Naime, incidenca različitih oblika kancera rapidno raste u čitavom svetu, čemu svakako doprinose i starenje svetske populacije, ali i sve zastupljenije štetne navike, npr. pušenje i neadekvatan način ishrane (Bray i sar., 2018).

Međutim, lečenje infektivnih bolesti i kancerskih oboljenja postaje sve komplikovanije, usled sve češće pojave rezistentnih sojeva/kancera na postojeće lekove, a u slučaju antikancerske terapije i ozbiljnih kontraindikacija i nuspojava koje, u pojedinim slučajevima, čak onemogućavaju lečenje. Budući da biljke predstavljaju nepresušni izvor biološki aktivnih supstanci, potraga za novim medikamentima iz biljaka nikad nije bila izraženija. Ova doktorska teza traži odgovore na pitanja mogućeg unapređenja antimikrobne i antikancerske terapije primenom adjuvanata biljnog porekla. Naime, slede stranice posvećene istraživanju bioloških aktivnosti, pre svega antimikrobnog i citotoksičnog potencijala, derivata biljke *Juniperus communis* L.

1.1. Antibakterijski agensi i mehanizmi njihovog delovanja

Antibakterijski lekovi mogu biti prirodnog porekla ili su to sintetički hemioterapeutici. Antibiotici predstavljaju sekundarne metabolite bakterija i gljiva koji u niskim koncentracijama inhibiraju rast drugih mikroorganizama ili ih ubijaju. Delimičnom ili potpunom modifikacijom prirodnih agenasa nastaju polusintetički ili sintetički antibiotici. Više od dve trećine klinički korišćenih antibiotika su prirodni antimikrobni agensi ili njihovi polusintetički derivati. Na primer, gljive iz rodova *Penicillium* i *Cephalosporium* predstavljaju glavni izvor beta-laktamskih antibiotika, vrste *Actinomyces* i *Streptomyces* izlučuju aminoglikozide, makrolide i tetracikline, dok vrste roda *Bacillus* proizvode polipeptidne antibiotike - polimiksine i bacitracin.

Postoji nekoliko podela antibakterijskih lekova: prema hemijskoj strukturi, mehanizmu delovanja i spektru antimikrobnog dejstva (Etebu i Ariekpar, 2016). Prema hemijskoj strukturi, oni se klasifikuju u nekoliko grupa: beta-laktamski antibiotici, aminoglikozidi, tetraciklini i

hloramfenikol, makrolidi, glikopeptidi, hinoloni i sulfa lekovi. U antimikrobne agense novije generacije ubrajaju se mutilini, lipopeptidi i oksazolidinoni (Fischbach i Walsh, 2009). Prema spektru delovanja, razlikuju se agensi uskog (deluju na tačno određene gram-pozitivne ili gram-negativne bakterije) i širokog spektra (deluju na različite gram-pozitivne ili gram-negativne bakterije). Prema krajnjem efektu na bakterije, antibakterijski agensi mogu delovati baktericidno (aminoglikozidi, beta-laktamski antibiotici, vankomicin, hinoloni, rifampicin) ili bakteriostatički (hloramfenikol, sulfonamidi, trimetoprim, tetraciklini).

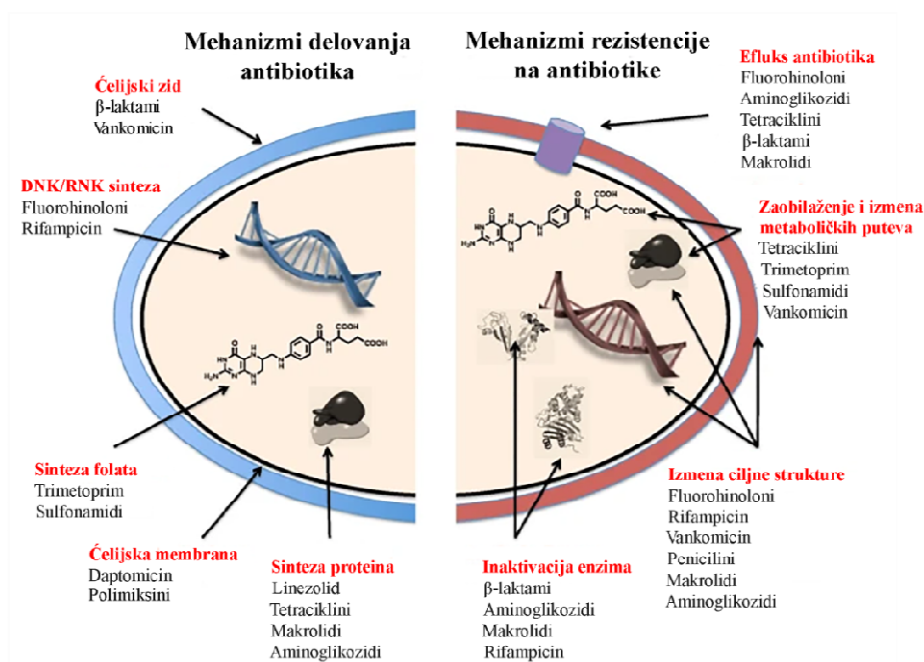
Antibiotici različitim mehanizmima deluju na raznovrsna ciljna mesta u ćeliji (Slika 1, levo). Antimikrobno delovanje mogu ostvariti tako što inhibiraju sintezu ćelijskog zida bakterija, funkciju citoplazmatične membrane, sintezu nukleinskih kiselina ili proteina, a takođe mogu uticati na specifične metaboličke procese u bakterijskim ćelijama (Kapoor i sar., 2017). Prisustvo ćelijskog zida kod većine bakterija omogućava selektivno antimikrobno delovanje β -laktamskih antibiotika i glikopeptida. β -laktami inhibiraju sintezu ćelijskog zida na taj način što blokiraju proces transpeptidacije. Oni se vezuju za enzime transpeptidaze i sprečavaju umrežavanje peptidnih lanaca peptidoglikana. Ova grupa antibiotika obuhvata peniciline, cefalosporine, karbapeneme i monobaktame koji deluju selektivno uglavnom na gram-pozitivne bakterije (Etebu i Ariekpar, 2016). Smanjena osetljivost gram-negativnih bakterija na delovanje β -laktama posledica je specifične građe ćelijskog zida, odnosno dodatnog lipopolisaharidnog sloja (označen i kao „spoljašnja membrana“). Sa druge strane, glikopeptidi inhibiraju sintezu ćelijskog zida vezivanjem za terminalni dipeptid (D-alanil-D-alanin) monomera peptidoglikana, što kao rezultat ima inhibiciju transpeptidaza i blokiranje procesa transpeptidacije (Džidić i sar., 2008). Vankomicin, glavni glikopeptidni antibiotik, inhibira rast uglavnom gram-pozitivnih bakterija, a koristi se i protiv meticilin-rezistentnih stafilokoka.

Grupe antibiotika koji deluju na nivou ćelijske membrane dovode do smrti bakterija na različite načine. Na primer, daptomicin izaziva depolarizaciju ćelijske membrane gram-pozitivnih bakterija, što dovodi do smrti ćelije. Polimiksini (kolistin) deluju kao deterdženti, koji se velikim afinitetom vezuju za lipide lipopolisaharidnog sloja ćelijskog zida gram-negativnih bakterija (spoljašnje membrane) i liziraju ga. Dalje prolaze kroz tanak sloj peptidoglikana do ćelijske membrane, povećavaju njenu propustljivost i dovode do smrti ćelije (Etebu i Ariekpar, 2016).

Antibiotici inhibitori sinteze proteina svoje antimikrobno delovanje ostvaruju vezivanjem za malu subjedinicu (30S) ili veliku subjedinicu ribozoma (50S). Inhibicija sinteze proteina vezivanjem za 30S subjedinicu jeste mehanizam karakterističan za aminoglikozide i tetracikline. Aminoglikozidi (streptomycin, gentamicin, amikacin) inhibiraju translaciju vezivanjem za ribozomalnu RNK (16S rRNK) u blizini A-mesta na maloj subjedinici. U tom slučaju dolazi do pogrešnog prevođenja informacije sa iRNK i ugradnje neodgovarajuće aminokiseline u polipeptidni lanac i prevremene terminacije translacije. Imajući u vidu da ulazak aminoglikozida u ćeliju zahteva prisustvo kiseonika i aktivni transport elektrona kroz elektron transportni lanac, oni svoje delovanje ostvaruju prema aerobnim bakterijama, a aktivnost prema anaerobnim bakterijama je slaba ili potpuno odsutna (Krause i sar., 2016). Tetraciklini (tetraciklin) se vezuju za konzervirane sekvence 16S rRNK male subjedinice, i sprečavaju vezivanje aminoacil-tRNK (AA-tRNK) za A-mesto na ribozomu (Yoneyama i Katsumata, 2006). U inhibitore 50S subjedinice ubrajaju se različite grupe antibiotika uključujući makrolide, oksazolidinone i hloramfenikol. Uopšteno govoreći, antibiotici koji inhibiraju 50S subjedinicu, deluju tako što fizički blokiraju translaciju, u fazi inicijacije, ili u fazi elongacije (Etebu i Ariekpar, 2016). Hloramfenikol inhibira peptidil transferazu (enzim koji katalizuje formiranje peptidnih veza) i sprečava dalje vezivanje aminokiseline u rastući polipeptidni lanac. Makrolidi (eritromicin, azitromicin) se vezuju za ribozomalnu RNK (23S rRNK) i inhibiraju sintezu proteina u ranim fazama (ometaju stvaranje inicijacionog kompleksa), ili deluju na translokaciju peptida. Makrolidi, linkozamidi i streptogramin B imaju sličan mehanizam dejstva (Kapoor i sar., 2017). Oksazolidinoni (linezolid) su hemioterapeutici koji inhibiraju sintezu proteina u različitim fazama. Oni se vezuju za 23S rRNK i inhibiraju formiranje 70S ribozoma, ili interaguju sa AA-tRNK.

U inhibitore sinteze nukleinskih kiselina ubrajaju se hinoloni, fluorohinoloni, rifampicin, sulfonamidi i trimetoprim. Hinoloni (nalidiksinska i pipemidinska kiselina) i fluorohinoloni (ciprofloksacin, ofloksacin) su hemioterapeutici koji inhibiraju topoizomerazu II (DNK giraza) uglavnom kod gram-negativnih bakterija, i topoizomerazu IV kod gram-pozitivnih bakterija. Što je veći afinitet vezivanja za pomenute enzime, to je i jači efekat ovih medikamenata. Aktivnost ovih enzima sprečava vezivanje RNK polimeraze i dovodi do inhibicije sinteze RNK. Sisarske ćelije poseduju enzim topoizomerazu II, koja ima veoma nizak afinitet za hinolonske antibiotike, pa samim tim ovi antibiotici imaju nisku toksičnost za sisarske ćelije (Kapoor i sar., 2017; Etebu i Arikekpar, 2016). Rifampicin se vezuje za β subjedinicu RNK polimeraze i na taj način sprečava sintezu RNK.

Sulfonamidi i trimetoprim su sintetički agensi koji inhibiraju metabolizam folne kiseline. Svaki od ovih lekova deluje u različitim fazama istog metaboličkog puta i ima bakteriostatički efekat. Međutim, njihova kombinacija (sulfametoksazol-trimetoprim) deluje sinergistički i kao rezultat ima baktericidni efekat. Sulfonamidi (sulfafurazol, sulfaguanidin, sulfazosulfapiridin) predstavljaju strukturne analoge *para*-amino-benzoeve kiseline (PABA), prirodnog supstrata u sintezi folne kiseline kod bakterija. Sulfonamidi imaju veći afinitet vezivanja za enzim dihidropteroat sintazu od PABA, i stoga inhibiraju njegovu funkciju i stvaraju nefunkcionalne analoge folne kiseline. Budući da je folna kiselina neophodna u sintezi nukleinskih kiselina (DNK i RNK), sulfonamidi na ovaj način inhibiraju sintezu DNK i RNK. Pored toga, folna kiselina remeti i metabolizam pojedinih aminokiselina, poput serina i metionina. Trimetoprim deluje u kasnijoj fazi sinteze folne kiseline i vrši inhibiciju enzima dihidrofolat reduktaze (Kapoor i sar., 2017; Etebu i Arikekpar, 2016; Dowling i sar., 2016).



Slika 1. Pregled mehanizama delovanja antibiotika i mehanizama rezistencije na antibiotike (preuzeto iz Etebu i Ukpong, 2016)

1.2. Mehanizmi rezistencije bakterija na antimikrobne agense

Neki mikroorganizmi prirodno nemaju ciljna mesta za delovanje antimikrobnih agenasa, pa se karakterišu urođenom rezistencijom. Međutim, najčešće rezistencija predstavlja stečenu osobinu prirodno osetljivih mikroorganizama da postanu otporni na delovanje antimikrobnog agenasa, koji

inače ostvaruje efekat na roditeljski soj. Glavni mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike su: enzimska inaktivacija antibiotika, izmena ciljnog mesta vezivanja antibiotika, izmena transporta antibiotika, kao i izmena metaboličkih puteva (Slika 1 desno, Dowling i sar., 2017).

Rezistencija na antibiotike može da nastane na više načina, što je karakteristika različitih grupa antibiotika, poput β -laktamskih antibiotika, hinolona, tetraciklina. Enzimska inaktivacija antibiotika je najčešći mehanizam rezistencije gram-negativnih bakterija na β -laktamske antibiotike. Skoro sve bakterije proizvode beta laktamaze (β -laktamaze), hidrolitičke enzime koji razgrađuju β -laktamski prsten i time inaktiviraju antibiotik. Poznato je preko 300 vrsta β -laktamaza, koje mogu biti strukturno i funkcionalno različite. Prema strukturnoj (Amblerovoj) klasifikaciji, β -laktamaze se dele na četiri klase A, B, C i D. Klase A, C i D su tzv. serin- β -beta laktamaze, koje u aktivnom mestu imaju aminokiselinu serin. Klasa B obuhvata tzv. metaloenzime, za čije delovanje su neophodni joni metala, najčešće cinka. Funkcionalna klasifikacija β -laktamaza je kompleksna i zasniva se na spektru delovanja enzima na odgovarajuće β -laktame i osetljivosti na inhibitore β -laktamaza (Dowling i sar., 2017; Kapoor i sar., 2017). Geni za sintezu β -laktamaza se mogu nalaziti na bakterijskom hromozomu ili na plazmidima, što je češća pojava. Prisustvo ovih gena na hromozomu *P. aeruginosa* omogućava konstitutivnu rezistenciju bakterije na određene β -laktame. Prisustvo gena za sintezu β -laktamaza na plazmidima ili nekim drugim mobilnim genetičkim elementima omogućava brzo širenje rezistencije na β -laktame, kako u bolničkim, tako i u vanbolničkim uslovima. Uz to, na plazmidima se obično nalaze i geni za rezistenciju na druge, različite grupe antibiotika, uključujući tetracikline, aminoglikozide, fluorohinolone i druge, stoga je multirezistencija bakterija uobičajena pojava (Wilke i sar., 2005).

U okviru β -laktamaza, posebno su značajne one proširenog spektra delovanja (eng. *Extended Spectrum Beta Lactamases*, ESBL). Ovo je veoma heterogena grupa enzima, međutim, najčešće se odnosi na β -laktamaze koje razlažu peniciline (penicilinaze), cefalosporine (cefalosporinaze) i monobaktame, dok na karbapeneme ne deluju. Bakterije koji proizvode ESBL enzime su uglavnom gram-negativne i one najčešće ispoljavaju multirezistenciju. Zbog toga, najveći problem u kliničkoj praksi predstavljaju sojevi iz familije Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella* i *Shigella*), *Pseudomonas aeruginosa* i druge gram-negativne bakterije. Sa druge strane, najznačajniji enzimi za rezistenciju bakterija na aminoglikozide su acetiltransferaze, nukleotidiltransferaze i fosfotransferaze, dok je produkcija hloramfenikol-acetiltransferaze najčešći mehanizam rezistencije bakterija na hloramfenikol (Dowling i sar., 2017).

Rezistencija koja nastaje kao posledica izmene ciljnog mesta delovanja antibiotika karakteristična je za β -laktame, aminoglikozide, tetracikline, hinolone, sulfonamide i trimetoprim. Izmjena transpeptidaza, tj. penicilin-vezujućih proteina (eng. *Penicillin Binding Proteins*, PBP), čest je mehanizam rezistencije u slučaju gram-pozitivnih bakterija (pogotovo kod gram-pozitivnih koka), za razliku od produkcije β -laktamaza koja je češća u slučaju gram-negativnih bakterija. Rezistencija na ampicilin karakteristična je za *Enterococcus faecium*, dok je rezistencija na meticilin i oksacilin karakteristična za *Staphylococcus aureus* (Kapoor i sar., 2017). Izmjena prekursora u sintezi ćelijskog zida, D-alanil-D-alanin u D-alanil-D-laktat, mehanizam je rezistencije gram-pozitivnih bakterija na glikopeptide. Bakterije *Enterococcus faecalis* i *E. faecium* ispoljavaju visoku rezistenciju na vankomicin. Mutacije u genima za sintezu DNK giraze (*gyrA* i *gyrB*) i topoizomeraze IV (*parC* i *parE*) dovode do razvoja rezistencije na hinolone i fluorohinolone. Konformacione promene ribozoma utiču na slabije vezivanje tetraciklina za ciljne strukture. Izmjena β -subjedinice RNK polimeraze, kao mesta delovanja rifampicina, dovodi do nesmetanog procesa transkripcije, a samim tim i razvoja rezistencije na rifampicin (Kapoor i sar., 2017). Izmjena bakterijskih enzima dihidropteroat sintaze i dihidrofolat reduktaze, enzima koji su uključeni u metabolički put sinteze folne kiseline, mehanizam je rezistencije bakterija na sulfonamide i trimetoprim. Usled prekomerne sinteze dihidropteroat sintaze, terapijske doze sulfonamida ne mogu potpuno da blokiraju ovaj metabolički put.

Promene u propustljivosti spoljašnjeg sloja ćelijskog zida gram-negativnih bakterija (eng. *outer membrane*) utiče na transport antibiotika. Smanjeni unos antibiotika u ćeliju ili aktivni efluks,

izbacivanje antibiotika iz ćelije, česti su mehanizmi rezistencije na β -laktame, makrolide, fluorohinolone i tetracikline. Mali hidrofilni molekuli poput β -laktama i fluorohinolona mogu da uđu u ćeliju jedino prolaskom kroz porine, proteine odgovorne za permeabilnost spoljašnje membrane. Stoga, mutacije u genima koji kodiraju porine, utiče na promene permeabilnosti. Smanjenje broja porinskih kanala dovodi do smanjenog ulaska β -laktama i fluorohinolona u ćeliju, i time ćelija stiče rezistenciju na ove klase antibiotika. Rezistencija kod *P. aeruginosa* na sve klase antibiotika posledica je veoma slabe propustljivosti spoljašnje membrane. Tetraciklini se normalno nagomilavaju u unutrašnjosti osetljive bakterije, međutim usled promene permeabilnosti, oni ne mogu ući i ispoljiti svoje dejstvo (Dowling i sar., 2017; Kapoor i sar., 2017). Membranski proteini, koji aktivno izbacuju antibiotik i održavaju njegovu nisku koncentraciju u ćeliji, nazivaju se efluks pumpe. Po ulasku antibiotika u ćeliju, proteini transporteri ga vezuju i odmah eliminišu, pre nego što dostigne odgovarajuću koncentraciju na mestu dejstva (Tenover, 2006). Za razliku od porina koji su prisutni u ćelijskom zidu, efluks pumpe se nalaze u ćelijskoj membrani bakterija. I gram-pozitivne i gram-negativne bakterije stvaraju proteine transportere, koji vezuju antibiotike skoro svih klasa, izuzev polimiksina. Efluks pumpe mogu biti specifične za određene antibiotike, međutim većina njih vrši efluks različitih grupa antibiotika, uključujući makrolide, tetracikline, fluorohinolone. Mutacije u genima koji kodiraju proteine efluks pumpe za transport različitih grupa antibiotika mogu povećati intenzitet eliminacije agenasa iz ćelije, što doprinosi razvoju multirezistencije (Kapoor i sar., 2017).

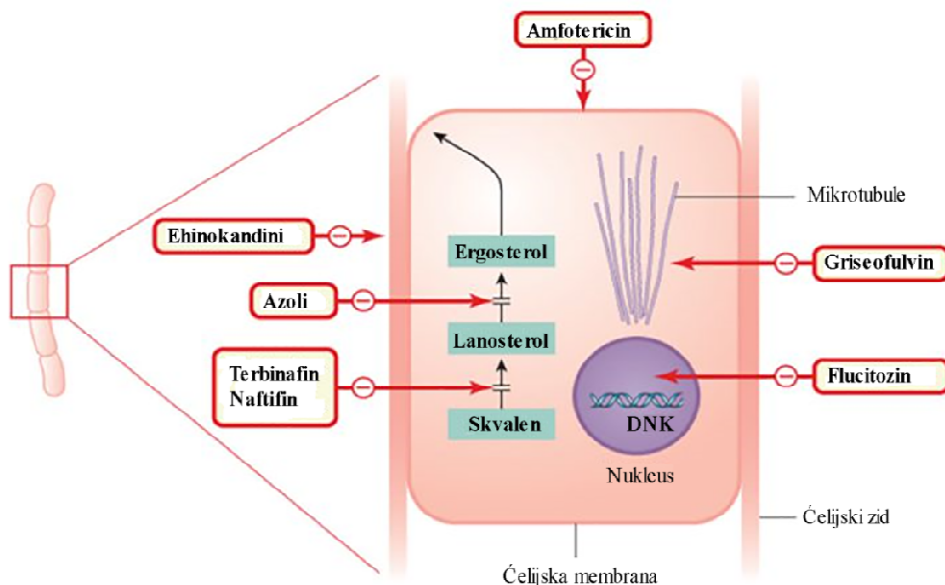
Bakterije mogu da razviju alternativni metabolički put i da izbegnu onaj na koji lek deluje. Na primer, bakterije ne moraju da koriste PABA za sintezu folata, već mogu uzimati gotovu folnu kiselinu iz okruženja, što pruža rezistenciju prema sulfonamidima (Dowling i sar., 2017).

1.3. Antifungalni agensi i mehanizmi njihovog delovanja

Slično delovanju antibakterijskih agenasa i antifungalni agensi deluju fungicidno ili fungistatički. Međutim, količina dostupnih lekova koja se primenjuje u terapiji gljivičnih infekcija je ograničena i značajno manja, u poređenju sa lekovima koji se koriste za lečenje bakterijskih infekcija. Za razliku od bakterija, prokariotskih mikroorganizama, gljive su eukariotski mikroorganizmi kod kojih se mnogi metabolički procesi odvijaju na sličan način kao u sisarskim ćelijama. Usled nedovoljne selektivnosti prema gljivama, brojni antifungalni agensi mogu biti toksični u sisarskim ćelijama, kao što je npr. amfotericin B. Zbog toga, delovanjem antifungalnih agenasa na specifične strukture gljiva, izbegla bi se mogućnost negativnog uticaja ovih lekova na ćelije domaćina. Antifungalni agensi deluju na nivou ćelijskog zida gljiva, ćelijske membrane, sinteze nukleinskih kiselina i sinteze proteina (Slika 2). Ehinokandini (kapsfungin), inhibiraju sintezu 1,3- β -D-glukana, polisaharida ćelijskog zida mikromiceta. To su antifungalni agensi koji se uglavnom koriste u lečenju kandidijaza. Polieni, derivati azola, alilamini i tiokarbamati deluju na ćelijsku membranu gljiva i utiču na njenu strukturu i funkciju. Mehanizam selektivnog delovanja poliena (amfotericin B, nistatin), zasniva se na sposobnosti da se vezuju za ergosterol, glavni sterol u ćelijskoj membrani gljiva. Na taj način se stvaraju pore u membrani, povećava se njena permeabilnost, što dovodi do smrti ćelije. Toksičnost amfotericina B u sisarskim ćelijama posledica je slabe sposobnosti ovog leka da razlikuje ergosterol u ćelijama gljiva od holesterola u sisarskim ćelijama (Carrillo-Munoz i sar., 2006). Derivati azola (imidazoli i triazoli) i alilamini, inhibiraju biosintezu ergosterola na različitim stupnjevima metaboličkog puta. Imidazoli i triazoli (klotrimazol, ketokonazol, flukonazol), inhibiraju sintezu lanosterola, prekursora ergosterola, dok alilamini (terbinafin, naftifin), inhibiraju enzim skvalen epoksidazu, koji je neophodan za sintezu ergosterola iz skvalena. Inhibicijom enzima skvalen epoksidaze dolazi do nagomilavanja skvalena, koji je toksičan za ćeliju gljiva (Carrillo-Munoz i sar., 2006; Odds i sar., 2003).

Među najranije otkrivene antifungalne agense ubraja se griseofulvin. Precizan mehanizam delovanja još uvek nije poznat, ali se pretpostavlja da griseofulvin inhibira polimerizaciju mikrotubula i ometa proces ćelijske deobe. Flucitozin (5-fluorocitozin) je antifungalni agens koji se u ćeliji gljiva konvertuje u 5-fluorouracil (5-FU). 5-FU predstavlja analog pirimidina i može se

pogrešno ugraditi u RNK umesto uracila, što dovodi do inhibicije sinteze proteina. Takođe, 5-FU inhibira sintezu DNK delujući na enzim timidilat sintazu, ključni enzim u biosintezi timidina (Odds i sar., 2003). Iako su nabrojani mehanizmi delovanja antimikrobnih agenasa brojni, lečenje bakterijskih i gljivičnih infekcija postaje sve komplikovanije zbog sposobnosti bakterija i gljiva da razviju rezistenciju na antimikrobne agense.



Slika 2. Pregled mehanizama delovanja antifungalnih agenasa (preuzeto iz Hani i sar., 2015)

1.4. Mehanizmi rezistencije gljiva na antifungalne agense

Poslednjih godina invazivne gljivične infekcije predstavljaju važan uzrok obolevanja i smrtnosti kod pacijenata sa oslabljenim imunitetom, zbog čega rezistencija na antifungalne lekove postaje sve veći problem. Generalno, nivo rezistencije na antifungalne lekove je i dalje relativno nizak, ali postoji mogućnost da antifungalna rezistencija postane ključna odrednica u daljem razvoju antifungalne terapije (Chakrabarti, 2011). Rezistencija na azolne lekove kod vrsta roda *Candida* i *Aspergillus* predstavlja jedan od najvećih kliničkih izazova, za kojom sledi rezistencija na ehinokandine. Poseban problem predstavlja multirezistencija kod nekih vrsta roda *Candida*, posebno *Candida glabrata*. Mehanizmi rezistencije gljiva na antifungalne lekove uključuju izmenjene interakcije lek-ciljno mesto, kao i promene u aktivnosti efluks pumpi (Perlin i sar., 2017). Rezistencija na azolne lekove je najviše izučavana i povezana je sa različitim procesima u ćeliji, dok mehanizmi rezistencije na poliene i ehinokandine nisu najbolje shvaćeni. Povećana aktivnost efluks pumpi dovodi do smanjenja koncentracije leka u ćeliji i predstavlja jedan od identifikovanih mehanizama rezistencije gljiva na azolne lekove, što vodi neohodnosti primene većih terapijskih doza (Akins, 2005). Pomenuti mehanizam je najčešće odgovoran za rezistenciju kod *C. albicans*. On je posredovan prekomernom ekspresijom gena koji kodiraju proteine efluks pumpe, *CDR1* i *CDR2* (eng. *Candida Drug Resistance*) i *MDR1* (eng. *Multi-Drug Resistance*). Dodatno, prekomerna ekspresija *ERG11* gena, koji je odgovoran za sintezu enzima uključenog u biosintezu ergosterola (lanosterol 14 α -demetilaze), takođe dovodi do razvoja rezistencije na azolne lekove. Zbog toga koncentracija azolnih lekova koja inhibira sav enzim kod nemutiranih roditeljskih sojeva sada više nije dovoljna. Pokazano je da oko 85 % kliničkih izolata *C. albicans*

ima povećanu ekspresiju efluks pumpi, 65 % ima mutiran *ERG11*, dok 35 % ima povećanu ekspresiju *ERG11* gena (White i sar., 2002).

1.5. Kancerogeneza i kancer pluća

Kancerogeneza predstavlja višestepeni proces koji se odvija kroz nekoliko faza, uključujući inicijaciju, promociju, progresiju, invaziju i pojavu metastaza. Kao posledica izlaganja ćelija delovanju kancerogena, nastaju oštećenja na molekulu DNK ili dolazi do promene ekspresije ključnih gena (epigenetičke izmene), čime započinje faza inicijacije. U najvažnije faktore rizika, koji dovode do nastanka i razvoja malignih bolesti, ubrajaju se duvanski dim, neadekvatna ishrana, razne infekcije i inflamatorni procesi u organizmu. Ako se oštećenja DNK ne poprave mehanizmima reparacije, nastaju mutacije (inicirana ćelija), a deobom iniciranih (mutiranih) ćelija, nastaju klonovi mutiranih ćelija. Promocija tumora podrazumeva selektivnu klonalnu ekspanziju iniciranih ćelija, što dovodi do nastanka prekancerskih lezija. Većina ovih lezija najčešće spontano regradiraju, međutim, u nekim slučajevima dolazi do daljeg razvoja i pojave neoplastičnih ćelija. Tokom faze progresije dolazi do daljeg nagomilavanja mutacija u ćelijama, a kao posledica akumuliranih mutacija dolazi do rasta tumora. U kasnim fazama kancerogeneze dolazi do invazije i diseminacije kancerskih ćelija, odnosno pojave metastaza (Dai i Mumper, 2010). Metastaze podrazumevanju odvajanje kancerskih ćelija od primarne tumorske mase, koje dalje putem krvotoka ili limfnih sudova migriraju u udaljena tkiva, gde stvaraju sekundarne lezije tkiva. Pojava metastaza je u stvari i glavni pokazatelj napredovanja bolesti i loše prognoze. Akumulacija mutacija u genima odgovornim za proces kancerogeneze, kao što su onkogeni i/ili tumor supresorski geni, dovodi do gubitka kontrole ćelijske deobe i inhibicije apoptoze.

Rak pluća predstavlja jedan od najčešćih malignih tumora, sa najvećom incidencijom obolevanja i umiranja u ljudskoj populaciji širom sveta. Kod muškaraca, karcinom pluća je i dalje na prvom mestu po obolevanju i smrtnosti, a kod žena četvrti maligni tumor po učestalosti i drugi po redu najčešći uzročnik smrti od maligniteta (Ferlay i sar., 2015). U faktore koji mogu poboljšati ishod lečenja ubrajaju se rana dijagnostika, dostupnost novih, efikasnijih hemioterapeutika, unapređenje hirurških tehnika, kao i prestanak pušenja duvana, koji se ujedno navodi i kao glavni faktor rizika za nastanak karcinoma pluća (Chang, 2011). Prema patohistološkim karakteristikama, tumori pluća se dele na mikrocelularne (sitnoćelijske) i nemikrocelularne (nesitnoćelijske, eng. *Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC). Mikrocelularni karcinom je najagresivniji, daje rane metastaze i ima osobine sistemske maligne bolesti. Heterogena grupa NSCLC obuhvata sledeće tipove kancera: skvamocelularne, adenokarcinome, krupnoćelijske, adenoskvamozne, sarkomatoidne, karcinoide, karcinome bronhijalnih žlezda i preinvazivne lezije. Oko 80 % svih dijagnostifikovanih kancera pluća spada u grupu NSCLC, a najčešći među njima su skvamocelularni karcinom i adenokarcinom (Travis i sar., 2004). Lečenje pacijenata sa rakom pluća može obuhvatati različite pristupe, počev od hirurške resekcije, preko zračenja do hemioterapije, što zavisi od stadijuma i vrste tumora. Sa otkrićem novih klasa antitumorskih agenasa poput taksana, gemcitabina i agenasa na bazi platine, pojavila se kombinovana hemioterapija, kao obećavajuća strategija u lečenju kancera pluća u svim stadijumima bolesti (Zhao i sar., 2005). Mutacija u genu za receptor epidermalnog faktora rasta (eng. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR), najčešća je mutacija koja je ustanovljena kod većine pacijenata obolelih od NSCLC (Chang, 2011).

1.6. Citostatici i mehanizmi njihovog delovanja

Antineoplastični lekovi (citostatici) se široko koriste u terapiji svih malignih bolesti, usled svoje citotoksične aktivnosti. Međutim, ovi lekovi nisu selektivni samo za kancerske, već mogu delovati i na zdrave ćelije, što za posledicu ima brojne neželjene efekte. Imajući u vidu slabu selektivnu toksičnost ovih agenasa, kao i sposobnost većine da se aktivno vezuje za DNK, RNK i proteine, moglo bi se očekivati i da su neki antineoplastični lekovi potencijalno kancerogeni, mutageni ili teratogeni za čoveka. Budući da proces kancerogeneze karakteriše nekontrolisana proliferacija ćelija, logično je da hemioterapija treba da ima za cilj sprečavanje replikacije DNK.

Najefikasniji antikancerski agensi su upravo oni koji inhibiraju sintezu DNK, ili direktno stvaraju oštećenja na molekulu DNK, što posredno takođe inhibira replikaciju (Slika 3). I dok većina antikancerskih agenasa deluju kao antimetaboliti ili alkilirajući agensi, drugi deluju kao inhibitori mitotičkog deobnog vretena (Connor i McDiarmid, 2006). Antimetaboliti predstavljaju najčešće korišćenu i najefikasniju grupu antikancerskih agenasa, koji inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina i deluju specifično u S fazi ćelijskog ciklusa.

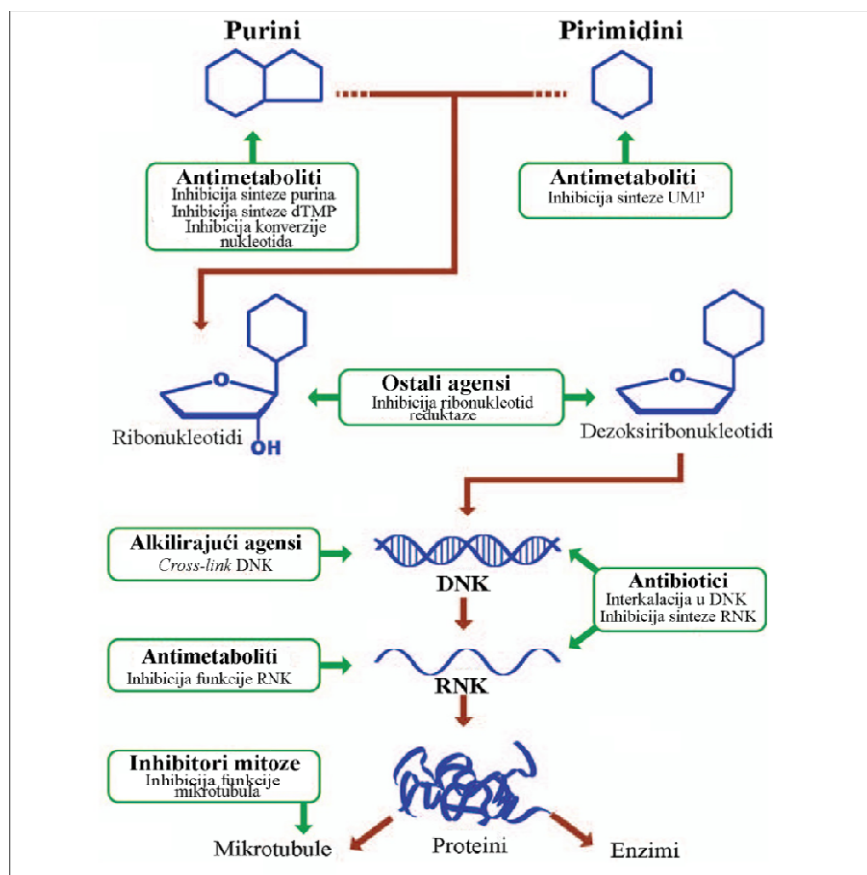
U najopštijem smislu, antimetaboliti su analozi metabolita koji imaju specifičnu ulogu u ćelijskom metabolizmu; zahvaljujući tome, oni remete metabolizam ćelije u koju su uneti (antimetaboliti mogu delovati citotoksično i na prokariotske i na eukariotske ćelije). Međutim, kada govorimo o antikancerskim agensima, termin se pre svega odnosi na jedinjenja koja predstavljaju analoge purinskih i pirimidinskih baza. Budući da folati imaju važnu ulogu u sintezi DNK i RNK, analozi folata se takođe smatraju antimetabolitima, a najpoznatiji među njima su aminopterin i metotreksat. Tiopurini čine osnovu za razvoj analoga purina, dok je prvi analog pirimidina 5-FU registrovan za lečenje karcinoma. Najpoznatiji analozi purina su merkaptopurin, fludarabin, pentostatin, kladribin, dok su najpoznatiji analozi pirimidina osim 5-FU, citarabin i gemcitabin (Peters, 2014).

Alkilirajući agensi su izuzetno reaktivni molekuli (hemijski mutageni), koji doniraju alkil grupe na odgovarajuća nukleofilna mesta molekula DNK, čime direktno narušavaju njegovu strukturu. Najčešće mesto alkilacije je N7 pozicija guanina, ali nije i jedino. Unakrsno povezivanje lanaca u DNK molekulu (eng. *crosslinking*), čime je sprečeno njihovo rasplitanje neophodno za procese replikacije ili transkripcije, takođe je posledica delovanja alkilirajućih agenasa. Najpoznatiji predstavnici su cisplatina, ciklofosamid, busulfan, karmustin, mitomicin C, dakarbazin, temozolomid (Damia i D'Incalci, 1998).

U inhibitore mitotičkog deobnog vretena spadaju biljni alkaloidi i njihovi polusintetički derivati, koji inhibiraju polimerizaciju proteina tubulina i formiranje niti deobnog vretena, što ometa normalno odvijanje ćelijske deobe. Ovi agensi deluju specifično u M fazi ćelijskog ciklusa. Zbog toga što „zamrzavaju“ proces mitoze u određenom trenutku (metafaza-anafaza), ovi antikancerski agensi poznati su i kao mitotički otrovi. Najpoznatiji među njima su vinka alkaloidi, vinblastin i vinkristin (izolovani iz *Catharanthus roseus*, poznatija kao *Vincea rosea*); podofilotoksin (*Podophyllum peltatum*) i paklitaksel ili taksan (izolovan iz *Taxus brevifolia*). Hemijskom modifikacijom podofilotoksina nastaje etopozid, dok se hemijskom modifikacijom paklitaksela dobija docetaksel (Longley i Johnston, 2005; Zhao i sar., 2005).

Antitumorski antibiotici su velika grupa agenasa sa različitim mehanizmima delovanja. Interkalirajući agensi se ugrađuju između susednih baza ili u male žljebove DNK i na taj način ometaju aktivnost polimeraza tokom procesa replikacije i transkripcije. Pored pomenutog primarnog načina delovanja, ova jedinjenja svoje citotoksično delovanje mogu ostvariti tako što inhibiraju enzime topoizomeraze I i II. Aktinomomicin D, bleomicin, daunorubicin, doksorubicin, elsamicin A, epirubicin su samo neki interkalirajući agensi koji se često koriste kao hemoterapeutici (Mišković i sar., 2013).

Na prvi pogled, imajući u vidu mnoštvo citostatika i raznovrsnost mehanizama njihovog delovanja, moglo bi se pomisliti da problem u lečenju malignih oboljenja ne postoji. Međutim, problemi su brojni, a glavni uzrok neuspešnog lečenja malignih bolesti jeste pojava rezistencije tumorskih ćelija na antikancerske agense, koje različitim mehanizmima sprečavaju ili smanjuju njihovo dejstvo.



Slika 3. Mehanizmi delovanja antikancerskih agenasa (preuzeto iz Connor i McDiarmid, 2006).

1.7. Mehanizmi rezistencije kancerskih ćelija na citostatike

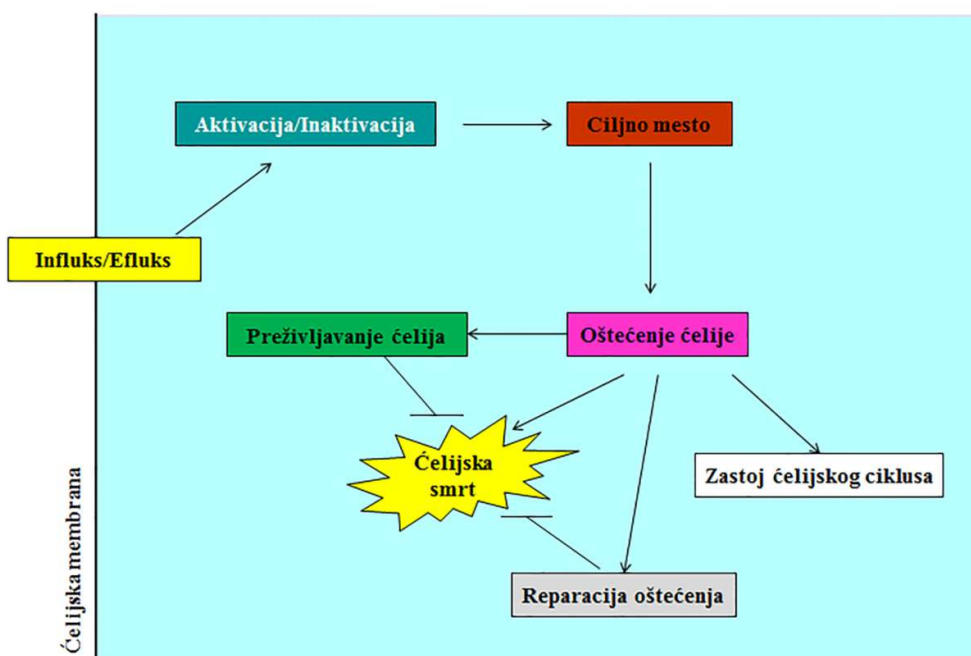
Rezistencija kancerskih ćelija na hemioterapeutike može nastati na dva načina: pre primene leka (urođena rezistencija) ili može nastati u toku hemioterapije (stečena rezistencija). Rezistencija kancerskih ćelija na veći broj strukturno i funkcionalno različitih hemioterapeutskih agenasa definiše se kao multirezistencija (eng. *Multidrug Resistance*, MDR). MDR predstavlja glavnu prepreku u lečenju kancera. Mehanizmi koji pojedinačno, ili udruženo doprinose pojavi MDR fenotipa obuhvataju smanjenu akumulaciju leka u ćelijama, inaktivaciju leka, promene u ciljnom mestu delovanja terapeutika, povećanu reparaciju DNK molekula, kao i izbegavanje apoptoze (Slika 4).

Smanjena akumulacija leka u ćeliji može nastati smanjenim ulaskom (influks) ali i pojačanim izbacivanjem (efluks) leka iz ćelije. Promene u strukturi ćelijske membrane mogu dovesti do smanjenog infliksa, međutim, smanjenje unutarćelijske akumulacije terapeutika češće je povezano sa njegovim povećanim efluksom iz ćelije. Aktivno izbacivanje hemioterapeutskih agenasa vrši se pomoću ABC transportera, a najznačajniji među njima su P-glikoprotein (P-gp) i proteini odgovorni za razvoj MDR. Prekomerna ekspresija ovih proteina predstavlja jedan od najznačajnijih mehanizama razvoja rezistencije na antitumorske lekove, kao i formiranja MDR fenotipa kancerskih ćelija. Na ovaj način, nastaje rezistencija na antracikline, taksane, agense na bazi platine, vinka alkaloida i inhibitore topoizomeraza (Chang, 2011).

Kao posledica delovanja mehanizama kojima se vrši detoksikacija leka, nastaje smanjena količina dostupnog leka za ćeliju. Pa tako, ključni korak u inaktivaciji agenasa na bazi platine (cisplatin, karboplatin i oksaliplatin) jeste njihovo vezivanje za redukovani glutation (GSH), što dovodi do stvaranja manje toksičnog i više rastvorljivog konjugata. Takav kompleks postaje supstrat za transmembranske proteine, koji vrše aktivno izbacivanje lekova iz ćelije. Promene u

okviru glutationskog detoksikacionog sistema dovode do pojave rezistencije na pomenute citostatike. Te promene podrazumevaju povišen nivo antioksidanta GSH u ćeliji, kao i povećanu ekspresiju enzima uključenih u sintezu GSH. Takođe, postoje antikancerski lekovi, poput 5-FU i irinotekana, koji zahtevaju aktivaciju u organizmu kako bi mogli ostvariti svoje dejstvo; rezistencija na ove lekove se može razviti usled nedovoljne aktivacije (Longley i Johnston, 2005).

Promena nivoa ekspresije ciljnog enzima, ili mutacije ciljnog mesta vezivanja hemioterapeutskog leka, mogu takođe u velikoj meri uticati na razvoj rezistencije. Modifikacijom ciljnog mesta na koji dati lek deluje nastaju nove varijante ciljnog proteina koji postaje rezistentan na određeni hemioterapeutik. Na primer, modifikacija topoizomeraza I i II dovodi do promene aktivnosti ovih enzima, što dalje vodi razvoju rezistencije kancerskih ćelija na delovanje doksorubicina, etopozida i irinotekana. Promena dinamike polimerizacije mikrotubula i ekspresija različitih izoformi tubulina posreduje u rezistenciji kancerskih ćelija na taksane i vinka alkaloida. Mutacije u β -tubulinu povećavaju rezistenciju ćelija na paklitaksel (Chang, 2011; Longley i Johnston, 2005).



Slika 4. Pregled mehanizama rezistencije kancerskih ćelija (preuzeto iz Longley i Johnston, 2005).

Sposobnost kancerskih ćelija da popravi oštećenja DNK dalje određuje osetljivost tumora na delovanje hemioterapeutskih lekova. S tim u vezi, brza popravka lezija nastala direktnim (cisplatin) ili indirektnim delovanjem leka (5-FU), vodi ka hemiorezistenciji kancerskih ćelija. Na primer, rezistencija kancerskih ćelija pluća, jajnika i želuca na agense na bazi platine nastaje kao posledica prekomerne ekspresije proteina uključenih u mehanizme reparacije isecanjem nukleotida (eng. *Nucleotide Excision Repair*, NER), ali i drugih. Dodatno, gubitak aktivnosti reparacije koja vrši ispravku pogrešno sparenih baza u molekulu DNK (eng. *Mismatch Repair*, MMR), dokazana je u rezistenciji kancerskih ćelija na cisplatinu. Takođe i povećana translezijska sinteza (sinteza DNK preko lezije) primećena je kod kancerskih ćelija otpornih na pomenuti agens (Longley i Johnston, 2005).

Poznato je da većina citostatika ostvaruje svoj citotoksični efekat pokretanjem programirane ćelijske smrti (apoptoze), što je poželjan događaj u antikancerskoj aktivnosti. Nakon oštećenja ćelije, može doći do privremenog zaustavljanja ćelijskog ciklusa kako bi se oštećenje popravilo, ili može doći do ćelijske smrti. Zbog toga, svaka promena u signalnim molekulima koji regulišu

zaustavljanje ćelijskog ciklusa ili proces apoptoze, može dovesti do razvoja rezistencije na agense koji imaju antimitotički i proapoptotski efekat. Budući da tumor supresorski gen p53 ima ključnu ulogu u regulaciji ovih procesa, mutacije u p53 genu i stvaranje nefunkcionalnog p53 proteina doprinosi stvaranju rezistentnog fenotipa, zbog nemogućnosti da ćelija uđe u apoptozu. Takođe, prekomerna ekspresija *bcl-2* familije gena (regulatori procesa apoptoze), kao i aktivacija nekih signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji procesa preživljavanja ćelije (PI3K/Akt signalni put), doprinose smanjenju citotoksičnog efekta većine terapeutika iz grupe taksana, antraciklina ili agenasa na bazi platine (Longley i Johnston, 2005; Chang, 2011; Zheng, 2017).

1.8. Biljke kao izvori biološki aktivnih materija

Kao što je već rečeno u uvodnim napomenama, upotreba prirodnih proizvoda u lečenju stara je koliko i ljudska civilizacija. Kao glavni izvor lekovitih materija navode se minerali, produkti mikroorganizama, biljaka i životinja. Čak i ako se u obzir uzme samo doprinos otkića penicilina na razvoj antibiotske terapije, važnost prirodnih proizvoda je očigledno nemejljiva. Što se tiče biološki aktivnih materija izolovanih iz biljaka, o značaju govori i činjenica da je 25 % svih lekova upravo biljnog porekla. Od ukupno 252 leka koji se koriste u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, 11 % je isključivo na biljnoj bazi, dok veliki broj preostalih sintetskih lekova sadrži aktivne supstance poreklom iz biljaka, ili one koje su njima inspirisane. Na primer, neki od važnih lekova biljnog porekla su digoksin, poreklom iz *Digitalis* spp., kinin i kinidin dobijeni iz *Cinchona* spp., biljni alkaloidi vinkristin i vinblastin poreklom iz *Catharanthus roseus*, atropin iz *Atropa belladonna*, dok su morfin i kodein izolovani iz biljke *Papaver somniferum* (Balunas i Kinghorn, 2005). Pregled različitih biljnih vrsta i njihovih aktivnih komponenti koje se koriste u lečenju raznih bolesti čoveka prikazali su Shakya (2016) i Yuan i sar. (2016) u svojim studijama. Procena je da oko 60 % antikancerskih i antimikrobnih lekova, koji se nalaze na tržištu ili su u procesu kliničkog ispitivanja, imaju biljno poreklo. Za veliku većinu još uvek nisu razvijeni postupci hemijske sinteze, ili bi ona bila ekonomski neisplativa, već se one i dalje izoluju iz samoniklih ili kultivisanih biljaka. Pored toga, prirodna jedinjenja kao što su muskarin, fizostigmin, kanabinoidi, johimbin, forskolin, kolhicin i drugi, imaju značajna biološka svojstva, te su predmet brojnih farmakoloških, fizioloških i biohemijskih studija, koje se i sprovode u cilju njihove upotrebe u proizvodnji različitih medikamenata (Rates, 2001).

Sa druge strane, poslednjih godina raste interesovanje za nekonvencionalnu, tzv. „alternativnu“ medicinu i upotrebu prirodnih proizvoda u lečenju. Razlozi za to su brojni: od činjenice da su terapije zvanične medicine ponekad neefikasne, a često praćene neželjenim efektima, preko zloupotrebe i nepravilne upotrebe sintetskih lekova, do toga da veliki procenat svetskog stanovništva nema zdravstvenu zaštitu, niti pristup konvencionalnom lečenju. Zbog toga, narodna medicina i ekološka svest čoveka ističu značaj prirodnih sirovina u lečenju i sugerišu da su prirodni proizvodi neškodljivi. Međutim, poznato je da nisu svi prirodni lekovi registrovani kao efikasni i bezbedni za upotrebu. U prilog tome govore brojna savremena istraživanja koja ukazuju na nedostatke u procesu razvoja i formulacije leka, kao i u procesu njegove proizvodnje i stavljanja u promet, kao i nepravilnosti pri samoj distribuciji i izdavanju lekova (Rates, 2001). Tek kada su svi navedeni procesi pod kontrolom, postiže se bezbedna primena prirodnih lekova u medicaciji.

Od ukupno 250.000 - 500.000 biljnih vrsta, samo mali procenat biljnih vrsta je istražen sa fitohemijskog i farmakološkog aspekta. U većini slučajeva, obavljen je samo osnovni hemijski i farmakološki skrining. Navedeni podaci ukazuju da je ovo područje veoma slabo istraženo, te da se karakteriše neverovatnim potencijalom za otkriće novih i efikasnih agenasa. Što se tiče lekova biljnog porekla, treba naglasiti da postoje izvesne razlike među njima. Te razlike se odnose na intenzitet njihovog farmakološkog delovanja. Naime, aktivni sastojci iz biljaka mogu biti slabijeg ili jaćeg delovanja, a u zavisnosti od primenjene doze mogu delovati i kao lek i kao otrov (Shakya, 2016). Na primer, biljke koje sadrže sastojke blagog dejstva, uglavnom se koriste u vidu čajnih mešavina ili raznih biljnih preparata. Uz to, lekovite biljke mogu biti izvori sirovina ili određenih frakcija jakog farmakološkog dejstva i kao takve ulaze u sastav raznih tinktura, tećnih preparata,

praškova, a mogu služiti i kao prekursori za dobijanje sintetičkih hemijskih agenasa - hemioterapeutika. Na kraju, iz biljaka se vrši ekstrakcija čistih aktivnih sastojaka koji imaju lekovito dejstvo (Rates, 2001).

1.8.1. Sekundarni metaboliti biljaka i mehanizmi njihovog delovanja

Sekundarni metaboliti biljaka predmet su sve većeg interesovanja naučne zajednice zbog njihove raznovrsne primene. Biljke koje se koriste u ishrani ili u tradicionalnoj medicini predstavljaju najveći izvor farmakološki aktivnih jedinjenja. Uloga aktivnih supstanci u održavanju ljudskog zdravlja je značajna, naročito kada se ima u vidu da ih ćelije čoveka ne mogu sintetisati. Biljke produkuju sekundarne metabolite koji uključuju alkaloidne, glikozide, polifenole, saponine, terpenoide i antrahinone, jedinjenja sa dobro poznatim biološkim aktivnostima (Shakya, 2016; Savoia, 2012; Kurek i sar., 2011). Na primer, pokazano je da alkaloidi imaju antispazmodičnu, analgetičku i diuretičku aktivnost; terpenoidi su poznati po antivirusnim, antibakterijskim, antikancerskim, anti-inflamatornim i antiparazitskim svojstvima. Takođe, glikozidi poseduju antibakterijsku i antifungalnu aktivnost; saponini imaju anti-inflamatornu i antivirusnu aktivnost, a doprinose i odbrambenim mehanizmima domaćina, dok biološke aktivnosti fenola uključuju antioksidativnu, antibakterijsku, antialergijsku i brojne druge aktivnosti (Shakya, 2016).

Jedan od važnih ciljeva u istraživanjima bioloških aktivnosti sekundarnih metabolita odnosi se i na mogućnosti pronalaska novih antimikrobnih agenasa, posebno ako se ima u vidu učestalost rezistencije mikroorganizama na dostupne konvencionalne antibiotike. Kao mogući izvori potencijalno novih antimikrobnih agenasa, navode se nedovoljno ispitani i neistraženi biljni izvori, poput različitih hemotipova biljaka (Savoia, 2012). Poželjno je da potencijalno novi antimikrobni agensi budu efikasni ne samo u suzbijanju raznih bakterijskih i gljivičnih infekcija, već i da deluju sinergistički sa konvencionalnim antimikrobnim agensima, da smanjuju ekspresiju faktora virulencije, da sprečavaju adheziju mikroorganizama i formiranje biofilma, ili da aktiviraju ćelije imunskog sistema koje učestvuju u borbi protiv infekcija (Budzyńska i sar., 2014). I zaista, brojni prirodni proizvodi koji su danas u upotrebi, ispunjavaju navedena očekivanja.

Sa druge strane, treba imati u vidu rastuću učestalost kancerskih oboljenja u savremenom svetu, kao i prethodno pomenute probleme sve češće rezistencije tumorskih ćelija na konvencionalne hemioterapeutike. Ako ove činjenice uzmemo u obzir, potraga za novim medikamentima biljnog porekla koji bi bili potentni antikancerski agensi, sa sposobnošću sinergističkog pojačavanja aktivnosti konvencionalnih citostatika, takođe se čini opravdanom.

1.8.1.1. Etarska ulja i mehanizmi njihovog delovanja na bakterije

Različite biljne vrste predstavljaju bogat izvor terpena, koji se dominantno nalaze u sastavu etarskih ulja, kao i fenola koji ulaze u sastav ekstrakata. Terpenska jedinjenja sadrže izoprenoidne jedinice; ukoliko su ugljovodoničnog sastava označavamo ih terpenima u užem smislu reči, a ako su to kiseonični derivati, koristimo termin terpenoidi. Prema broju izoprenoidnih jedinica (C_5H_8) koje terpeni/terpenoidi sadrže, označeni su kao hemiterpeni (C_5 , tj. poseduju jednu izoprenoidnu jedinicu), monoterpeni (C_{10} , dve izoprenoidne jedinice), seskviterpeni (C_{15} , tj. tri jedinice), diterpeni (C_{20}), triterpeni (C_{30}), tetraterpeni (C_{40}) i politerpeni ($C_{>40}$). Zabeležena je antimikrobna aktivnost nekih monoterpena, diterpena, seskviterpena, triterpena, kao i njihovih derivata. Pokazano je da seskviterpeni izolovani iz različitih biljaka imaju baktericidno dejstvo prema gram-pozitivnim bakterijama (Kurek i sar., 2011). Postavlja se pitanje zbog čega su etarska ulja zanimljivija za istraživanje bioloških aktivnosti od pojedinačnih terpena. Pre svega, ulja predstavljaju hemijski izuzetno složene prirodne proizvode, sa širokim spektrom antimikrobne aktivnosti prema velikom broju bakterija i gljiva. Drugo, ulja deluju istovremeno na više target mesta u ćeliji, stoga je i razvoj rezistencije mikroorganizama ređa pojava. Zbog lipofilne prirode i male molekulske mase, ulja i pojedinačna terpenska jedinjenja lako prolaze kroz ćelijsku membranu (u slučaju gram-negativnih bakterija i kroz spoljašnji lipopolisaharidni sloj) u ćeliju, gde mogu da ostvare različite efekte koji uglavnom zavise od njihovog hemijskog sastava (Hyldgaard i sar., 2012). Na primer, hidrofobni

konstituenti etarskih ulja, naročito monoterpeni, direktno deluju na fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane bakterija, povećavaju joj propustljivost i dovode do „curenja“ (eng. *leakage*) ćelijskog sadržaja, te na taj način ostvaruju antibakterijsku aktivnost. Takođe, ulja utiču na enzimsku aktivnost kod bakterija, ometaju ćelijsko disanje i vrše inhibiciju sinteze proteina.

Tokom poslednje decenije, ispitivana su brojna etarska ulja i njihova antimikrobna aktivnost i mehanizmi kojom se ona ostvaruje su dobro dokumentovani, čime se bavi studija Reichling i sar. (2009). Zbog svojih aromatičnih i bioloških svojstava, osim u lečenju raznih infekcija, značajna je uloga etarskih ulja i u prehrambenoj industriji, naročito u pripremi hrane i njenom očuvanju. Naime, ona inhibiraju rast mikroorganizama u različitim namirnicama, a takođe utiču na organoleptička svojstva hrane (Burt, 2004). Među brojnim ispitivanim uljima, utvrđeno je da ulja začinskih biljaka, poput majčine dušice, origana, nane, cimeta, žalfije i karanfilića poseduju najjaču aktivnost (Kalemba i Kunička, 2003).

1.8.1.2. Fenolna jedinjenja i mehanizmi njihovog delovanja na bakterije

Fenolna jedinjenja su takođe široko zastupljena u biljkama i predstavljaju potentne antimikrobni agense. Fenoli i polifenoli obuhvataju veliku grupu aromatičnih jedinjenja, u koju se ubrajaju flavonoidi (jedinjenja koja sadrže benzopiranski i benzenski prsten), zatim hinoni (jedinjenja sa dve karbonilne grupe), tanini koji predstavljaju polimere fenolnih jedinjenja, kumarini (fenolna jedinjenja sa benzopiranskom osnovom) i fenolne kiseline (Dai i Mumper, 2010; Saleem i sar., 2010).

Flavonoidi su najbrojnija grupa fenolnih jedinjenja sa ukupno 14 klasa. Mehanizam njihovog delovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da flavonoidi narušavaju ćelijski zid bakterija, formiraju komplekse sa ekstracelularnim i solubilnim proteinima i narušavaju strukturu ćelijske membrane (Savoia, 2012; Górnjak i sar., 2019). Dodatno, za određene flavonoide je nađeno da inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina ili na drugi način inhibiraju metabolizam bakterija (Cazarolli i sar., 2008). Iako postoje neusaglašena mišljenja o antimikrobnoj aktivnosti flavonoida, nesumnjivo je dokazan sinergizam između pojedinačnih komponenti, kao i sinergizam između pojedinačnih komponenti sa postojećim antimikrobnim lekovima (Cushnie i Lamb, 2011). Sve je više dokaza o antibakterijskom potencijalu pojedinih flavonoida, kao što su apigenin, galangin, hrizin, naringin i naringenin, epigalokatehin-galat i njegove derivate, luteolin i luteolin 7-*O*-glukozid, kvercetin, 3-*O*-metilkvercetin i razni glikozidi kvercetina, zajedno sa kemferolom i njegovim derivativima (Cazarolli i sar., 2008). Pored navedenih jedinjenja, potvrđena je antibakterijska aktivnost i nekih drugih jedinjenja iz grupa flavona, izoflavona, flavanona, flavonola, glikozida flavonola i halkona. Za neka jedinjenja kao što su kvercetin, epigalokatehin-galat kao i likohalkoni A i C pretpostavljaju se i mehanizmi delovanja (Savoia, 2012; Kurek i sar., 2011). Antibakterijska aktivnost flavonoida poput apigenina, galangina, genisteina i dazdeina konkretno je pokazana prema sojevima *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Cazarolli i sar., 2008).

Hinoni, a posebno antrahinoni su moćni antimikrobni agensi koji najverovatnije inhibiraju sintezu peptidoglikana, vrše inaktivaciju i inhibiraju sintezu nekih specifičnih enzima poput adhezina ili membranskih proteina, čime ostvaruju svoj baktericidni efekat. Sličan efekat ostvaruju i tanini, s tim da oni grade i komplekse sa proteinima i dovode do njihove denaturacije, što dodatno doprinosi njihovom antimikrobnom potencijalu (Savoia, 2012). Tanini, a naročito proantocijanidini, inhibiraju rast uropatogene *E. coli*, kao i *S. mutans* (Kurek i sar., 2011). Ova grupa fenola inhibira rast bakterija uzročnika kvarenja hrane, te su stoga našli primenu u procesima prerade hrane kako bi produžili njen rok trajanja. Što se tiče kumarina i fenolnih kiselina, antimikrobna svojstva ove dve grupe fenola su najmanje ispitana, tako da postoje samo oskudni podaci o ovoj temi (Borges i sar., 2005; Cechinel Filho i sar., 2009).

Na osnovu pretpostavljenih mehanizama dejstva različitih grupa fenola koja ulaze u sastav biljnih ekstrakata, jasno je da ekstrakti svoj antibakterijski potencijal ostvaruju na različite načine. Oni mogu delovati kao inhibitori efluks pumpi, pre svega kod gram-pozitivnih bakterija, što je veoma značajno u kliničkom lečenju, naročito kada se ima u vidu da je rezistencija ovih bakterija

često posledica pojačane aktivnosti efluks pumpi (Holler i sar., 2012). Međutim, poznati su i inhibitori efluks pumpi gram-negativnih bakterija. Tako novija istraživanja pokazuju da efluks pumpe AcrAB-TolC kod Enterobacteriaceae i MexAB-OprM kod *P. aeruginosa*, koje direktno utiču na pojavu multirezistencije gram-negativnih bakterija prema brojnim prirodnim proizvodima (Savoia, 2012), mogu biti inhibirane različitim biljnim ekstraktima Garvey i sar. (2010). Štaviše, za neke od aktivnih jedinjenja biljnih ekstrakata pokazano je da ostvaruju sinergizam sa postojećim antibioticima, kao što su hloramfenikol ili ciprofloksacin, čime pojačavaju njihovo delovanje na gram-negativne bakterije (Garvey i sar., 2010).

Kao što je već istaknuto, flavonoidi deluju na nivou ćelijske membrane i formiraju komplekse sa membranskim proteinima, stoga su njihov influks i zadržavanje u ćeliji bakterija neophodni za aktivnost. Zbog toga flavonoidi pokazuju najbolji efekat kada se kombinuju sa drugim antimikrobnim agensima, inhibitorima efluks pumpi (Savoia, 2012). Još jedan od pretpostavljenih mehanizama dejstva biljnih ekstrakata je interferencija sa signalnim putevima međućelijske komunikacije kod bakterija, tzv *quorum sensing* (QS) sistemom. Imajući u vidu da je virulentnost patogenih bakterija pod kontrolom ovog regulatornog sistema, narušavanje bakterijske komunikacije ukazuje na nove mogućnosti u terapiji bakterijskih infekcija. Pokazano je da brojni ekstrakti ili pojedinačna aktivna jedinjenja inhibiraju QS sistem kod *P. aeruginosa* (Adonizio i sar., 2008). Takođe, ekstrakti i/ili pojedinačne komponente izolovane iz ekstrakata inhibiraju proces formiranja biofilma. Naročito je značajna antibiofilm aktivnost prema klinički značajnim streptokokama, kao što je *S. mutans* (Savoia, 2012).

1.8.1.3. Sekundarni metaboliti i mehanizmi delovanja na gljive

Poznato je da gljivične infekcije kod imunokompromitovanih osoba predstavljaju veliki izazov u savremenom lečenju. Razvoj rezistencije na postojeće antifungalne lekove i njihova toksičnost predstavljaju ozbiljne nedostake u terapiji (Aboody i Mickymaray, 2020). Pokazano je da sekundarni metaboliti biljaka, poput terpena i fenola, različitim mehanizmima delovanja ostvaruju antifungalnu aktivnost (Tabela 1). Mehanizam delovanja terpena nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da zbog lipofilne prirode narušavaju strukturu ćelijske membrane gljiva, a takođe deluju i na mitohondrije, dok ciljna mesta delovanja fenola, uz već navedene za terpena jedinjenja, uključuju i ćelijski zid gljiva (Aboody i Mickymaray, 2020; Lagrouh i sar., 2017).

Antifungalna aktivnost različitih etarskih ulja i ekstrakata, kao i njihovih pojedinačnih konstituenata, bila je predmet brojnih istraživanja (Aboody i Mickymaray, 2020; Reichling i sar., 2009; Savoia, 2012). Kombinovana primena prirodnih proizvoda sa sintetskim antifungalnim lekovima prepoznata je kao efikasna strategija u borbi protiv invazivnih gljivičnih infekcija i rezistencije gljiva. Poznato je da svaki antimikrobni agens može imati različite mehanizme dejstva kojim ostvaruje fungicidni ili fungistatički efekat, a kombinacijom dva agensa postiže se delovanje na više različitih mesta u ćeliji. Na ovaj način se povećava efikasnost terapije, uz smanjenje mogućnosti razvoja rezistencije kao i smanjenje toksičnosti antimikrobnih agenasa. Pojedine studije su pokazale sinergističko dejstvo između prirodnih proizvoda i antimikotika. Na primer, bioaktivna jedinjenja povećavaju efikasnost fungicida, na taj način što deluju kao inhibitori efluks pumpi i inhibiraju morfogenezu rezistentnih sojeva *C. albicans* u patogenu hifoliku formu (Aboody i Mickymaray, 2020).

Tabela 1. Mehanizmi antifungalnog delovanja sekundarnih metabolita biljaka (prerađeno prema Lagrouh i sar., 2017)

Inhibicija sinteze ćelijskog zida	Inhibicija sinteze β -glukana i hitina, glavnih konstituenata ćelijskog zida gljiva, dovodi do dezintegracije ćelijskog zida
Narušavanje strukture ćelijske membrane	Inhibicija sinteze ergosterola dovodi do narušavanja integriteta ćelijske membrane i povećavanja njene permeabilnosti
Narušavanje funkcije mitohondrija	Inhibicija procesa transporta elektrona na membranama mitohondrija dovodi do smanjenja membranskog potencijala mitohondrija. Takođe, moguća je i inhibicija protonskih pumpi u respiratornom lancu. Oba procesa doprinose smanjenju proizvodnje ATP, što vodi ćelijskoj smrti.
Inhibicija ćelijske deobe	Inhibicija polimerizacije mikrotubula i sprečavanje formiranja deobnog vretena
Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina (RNK/DNK) ili proteina	Interferencija prirodnih agenasa sa RNK dovodi do potpune inhibicije transkripcije ili pogrešne sinteze RNK. Takođe, ometanje translacije se navodi kao jedan od mogućih mehanizama.
Inhibicija efluks pumpi	Inhibicija aktivnosti efluks pumpi smanjuje rezistenciju na sintetičke antifungalne agense.

1.8.1.4. Antikancerski efekat biljnih derivata

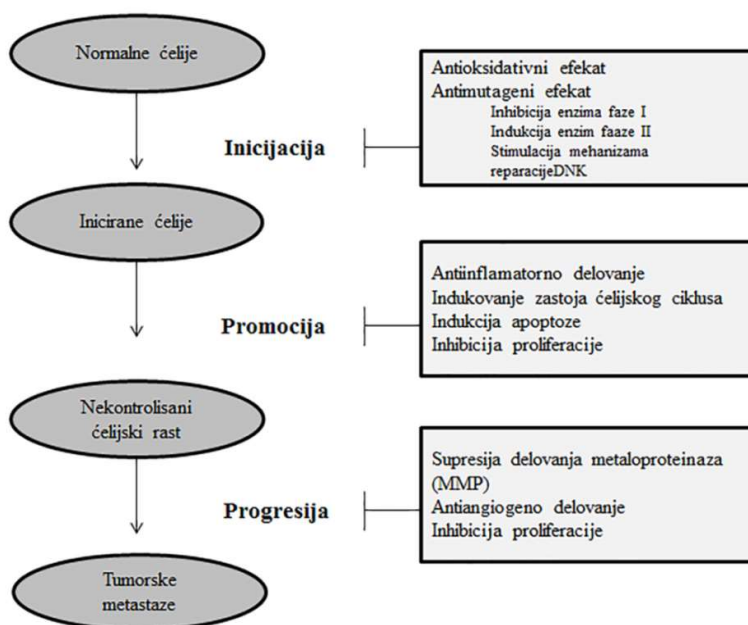
Budući da etarska ulja i ekstrakti imaju širok spektar bioloških aktivnosti, ovi prirodni proizvodi koriste se i kao antikancerski agensi. Dokazano je da brojna jedinjenja iz biljaka mogu da spreče različite stadijume kancerogeneze. Većina etarskih ulja smatra se bezbednim za upotrebu sa minimalnim rizikom od genotoksičnih efekata, što im daje veliku prednost u odnosu na neka druga jedinjenja. Čak šta više, određena ulja pokazuju vrlo jasan antimutageni potencijal, što bi moglo biti povezano sa njihovom hemopreventivnom aktivnošću. Pojedine studije ističu da prooksidativna aktivnost etarskih ulja i njihovih pojedinačnih konstituenata, kao i nekih polifenolnih jedinjenja, efikasno utiče na smanjenje veličine tumora i na brzinu proliferacije ćelija, procese apoptoze i/ili nekroze. U ovom slučaju, produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV), može biti kontrolisana i usmerena na ciljna tkiva, bez neželjenih efekata na normalne ćelije (Bakkali i sar., 2008; Gautam i sar., 2014; Halliwell, 2008). Brojni su izveštaji o antikancerskom delovanju etarskih ulja na karcinom pluća, debelog creva, prostate, dojke, jetre, mozga, kao i na leukemiju (Bakkali i sar., 2008; Bayala, 2014; Gautam i sar., 2014; Raut i Karuppayil, 2014). I komponente ulja, poput geraniola, karvakrola, 1,8-cineola, eugenola, d-limonena, mircena, timola, β -kariofilen oksida, perilil-alkohola, inhibiraju proliferaciju ćelija ili pokazuju citotoksični efekat (Bakkali i sar., 2008; Bayala, 2014; Gautam i sar., 2014). Pokazano je da etarska ulja i aktivne komponente indukuju apoptozu kancerskih ćelija na taj način što vrše modulaciju signalnih puteva, smanjuju nivo enzima i molekula antioksidativne zaštite poput glutationa, uz istovremeno povećanje produkcije RKV u ćelijama, zatim deluju na genetički materijal ili ometaju neke druge funkcije u ćeliji (Bakkali i sar., 2008; Lesgards i sar., 2014). Antikancerska aktivnost određenih ulja ili pojedinačnih konstituenata može biti posledica njihovog delovanja na različite proteine, kao na primer Akt protein koji reguliše aktivnost p53. Takođe, ulja mogu da deluju na transkripcione faktore poput NF- κ B i aktivator protein-1 (AP-1) koji regulišu brojne fiziološke procese kao što je diferencijacija ćelija, transformacija, proliferacija i apoptoza. Dalje, etarska ulja deluju na MAPK signalni put, kao i na signalne molekule poput JNK, ERK, kao i na p38 kinazu, a takođe zaustavljaju dalje napredovanje ćelijskog ciklusa i indukuju apoptozu. Pokazano je da ulja i aktivna jedinjenja inhibiraju proces angiogeneze i na taj način sprečavaju dalji rast tumora i njegovo širenje, odnosno pojavu metastaza (Gautam i sar., 2014).

Pored svoje primarne antioksidativne aktivnosti, biljni ekstrakti i njihovi pojedinačni sastojci pokazuju i antikancersko delovanje, o čemu svedoče brojne studije (Dai i Mumper, 2010; Pezzani i

sar., 2019; Seeram i sar. 2006; Zhang et al., 2008). Za ekstrakte bobičastog voća (borovnice, kupine, maline, brusnice i jagode) koji su bogati antocijanima, kemferolom, kvercetinom i estrima kumarinske i elaginske kiseline, pokazano je da inhibiraju *in vitro* rast kancerskih ćelija kolona (HT-29, HCT-116), dojke (MCF-7), prostate (LNCaP, DU-145) i ćelija karcinoma usne duplje (KB, CAL-27, Dai i Mumper, 2010). Slični su i izveštaji o antikancerskom potencijalu ekstrakata crnog i zelenog čaja, citrusa, masline, jabuka i mahunarki, kao i nekih pojedinačnih jedinjenja, dobijeni na nekoliko pomenutih ćelijskih linija, uključujući i adenokarcinom pluća (A549). Resveratrol, genistein, kurkumin i kvercetin su aktivna fenolna jedinjenja čiji je antikancerski potencijal najčešće ispitivan (Pezzani i sar., 2019). Takođe je pokazano da polifenolna jedinjenja iz grupe flavona (apigenin, bajkalin, luteolin i rutin), flavonona (hesperidin i naringenin), kao i neki lignani, inhibiraju rast različitih kancerskih ćelija uključujući ćelije kolona, prostate, grlića materice, pankreasa, jetre, dojke, kao i kancerske ćelije leukemije (Dai i Mumper, 2010).

Poznato je da oksidativno oštećenje ćelije predstavlja jedan od glavnih faktora koji doprinosi kancerogenezi i progresiji kancera. Zahvaljujući sposobnosti biljnih fenola da mobilizuju ćelijske mehanizme antioksidativne zaštite i da vrše heliranje jona metala, smatra se da ova jedinjenja mogu imati glavnu ulogu u hemoprevenciji. Pored antioksidativne aktivnosti koja je poželjna u normalnim ćelijama jer smanjuje rizik nastanka maligne transformacije, polifenoli mogu ostvariti i prooksidativni efekat u kancerskim ćelijama i time doprineti zaustavljanju ćelijskog ciklusa. Kao prooksidanti, oni izazivaju jednolančane i dvolančane prekide u molekulu DNK i na taj način inhibiraju rast kancerskih ćelija. Studije su pokazale da flavonoidna jedinjenja poput kvercetina, rutina, apigenina, galokatehina i epigalokatehin-galata, fenolnih kiselina poput galne, taninske i kafene, ili drugih polifenolnih jedinjenja, kao što su resveratrol i kurkumin, indukuju oksidativna oštećenja u molekulu DNK kod različitih kancerskih ćelija (Dai i Mumper, 2010).

Pored antioksidativnog i prooksidativnog efekta biljnih fenola, ova jedinjenja utiču na ćelijske funkcije koje se nalaze u osnovi razvoja tumora (Slika 5). U inicijalnoj fazi kancerogeneze, polifenoli inhibiraju aktivnost enzima koji utiču na biotransformaciju prokancerogena u kancerogene. Takođe, oni mogu stimulisati mehanizme reparacije DNK i na taj način ograničiti stvaranje mutiranih (iniciranih) ćelija. U fazi promocije kancerogeneze, polifenoli indukuju proces apoptoze i izazivaju zastoj ćelijskog ciklusa. Naime, kao posledica izmenjene regulacije ćelijskog ciklusa, u transformisanoj ćeliji postoji konstitutivni signal za proces mitoze, što dovodi do nekontrolisane proliferacije tumorskih ćelija. Fenolna jedinjenja mogu delovati na aktivnost ciklin zavisnih kinaza (eng. *Cyclin Dependent Kinase*, CDK), enzima koji regulišu ćelijski ciklus tako što indukuju zastoj u različitim fazama ciklusa i na taj način utiču na proliferaciju kancerskih ćelija i blokiraju je. Pokazano je da biljni fenoli inhibiraju aktivnost transkripcionog faktora NF- κ B koji je uključen u patogenezu mnogih oboljenja, uključujući inflamatorne, autoimune i neurodegenerativne bolesti, kao i pojavu kancera. Takođe, oni inhibiraju aktivnost COX-2 enzima što je od značaja jer je njegova prekomerna ekspresija karakteristična za tumor debelog creva, pluća, dojke i prostate. Na kraju, u fazi progresije kancera, pokazano je da biljni fenoli, poput polifenola zelenog čaja (epigalokatehin-galat i galokatehin-galat) i semenki grožđa (resveratrol), kao i druga aktivna fenolna jedinjenja (npr. tanini, antocijani, genistein i kurkumin), sprečavaju migraciju malignih ćelija i vrše supresiju invazija i metastaza, a takođe pokazuju i antiangiogeni efekat (Dai i Mumper, 2010).



Slika 5. Potencijalni mehanizmi antikancerskog delovanja biljnih fenola (preuzeto iz Dai i Mumper, 2010).

Imajući u vidu sve gore navedeno, veliku pažnju naučne i farmaceutske zajednice privlače biljke koje predstavljaju potencijalni izvor jedinjenja sa širokim spektrom antimikrobnog i antikancerskog delovanja, a među njima je i vrsta *J. communis*.

1.8.2. Rod *Juniperus*

Rod *Juniperus* pripada porodici čempresa (Cupressaceae), sa brojnim vrstama koje su široko rasprostranjene na severnoj hemisferi. Sa preko 70 vrsta i 40 varijeteta, predstavlja drugi po redu najraznovrsniji rod četinara (Butkiene i sar., 2015). Međutim, različiti autori prepoznaju različit broj vrsta i varijeteta u okviru ovog roda (Adams, 2014; Farjon, 2001). Problemi vezani za taksonomsku klasifikaciju i bližu determinaciju vrsta karakteristika su ovog roda. Stoga, postoji nekoliko klasifikacija, a prema jednoj od savremenijih, rod *Juniperus* obuhvata tri podroda: *Caryocedrus* (sadrži 1 vrstu), *Juniperus* (sadrži 10 vrsta) i *Sabina* (sadrži 56 vrsta) (Adams, 2014). Zbog varijabilnosti morfoloških karakteristika i razlika u hemijskom sastavu etarskih ulja, preciznija determinacija vrsta dugo nije bila moguća. Tek sa korišćenjem različitih molekularnih metoda uključujući PCR i metod nasumičnog umnožavanja polimorfne DNK (eng. *Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD) jasnija je diferencijacija podrodova, kao i nižih taksonomskih kategorija (Lesjak, 2011).

Juniperus communis L. je verovatno najviše analiziran i istovremeno najmanje razjašnjen takson. U prilog ovoj činjenici svedoči preko 60 različitih sinonima i veliki broj različitih klasifikacija u okviru iste vrste. Rajčević (2015) u svojoj studiji ističe da je verovatno najšire prihvaćena intraspecijska klasifikacija ona koja podrazumeva poddelu taksona na varijetete.

Juniperus communis je zimzelena, višegodišnja biljka koja može doživeti starost i preko 600 godina. U narodu je poznatija pod imenom obična kleka ili borovica. Ova vrsta je rasprostranjena širom severne hemisfere, pri čemu njen areal obuhvata različite temperaturne zone. Naime, prostire se od krajnjeg severa, pa sve do južnih delova Evrope, Azije i Severne Amerike. Zbog široke geografske distribucije, ova vrsta je izložena delovanju različitih ekoloških faktora. Zbog toga postoji značajna morfološka varijabilnost između varijeteta kao i razlika u hemijskom sastavu

sekundarnih metabolita kleke (Adams, 2014). Takođe, vrste *J. communis* najčešće rastu kao pojedinačne jedinke i to u borovim ili mešovitim šumama, međutim mogu formirati i čiste zajednice kleke. Najbolje rastu na osvetljenim površinama, ali rastu i u uslovima slabije osvetljenosti (Navasaitis, 2004). Kleka ima zelene i oštre listove (iglice), koji se zadržavaju na grani i do četiri godine. To je dvodoma biljka - drvo visine do 10 m (muške biljke) ili žbun visine 1-3 m (ženske biljke). Ženska biljka formira semeni zametak u proleće, međutim, šišarke sa semenima sazrevaju u kasnu jesen naredne godine. Zbog toga se na istom drvetu mogu naći i zrele i zelene šišarke. Latinski naziv kleke ima veze sa pomenutom osobinom: *juniora* - mlađa, *parere* - rađati. Ženske šišarke su bobičaste (bobice), izgrađene od sočnih sraslih ljuspi na kojima se nalazi po jedno seme, veličine zrna graška, okruglaste i mesnate (često pogrešno nazvane „plodom“, *juniperi fructus*). Nezrele bobice su zelene boje, dok su zrele tamno plave do plavocrne, najčešće prevučene voštanim slojem. Kleka raste veoma sporo. U periodu od pet do deset godina, biljka poraste između 20-50 cm u visinu (Ložienė i Venskutonis, 2016).

Intraspecijska varijabilnost je karakteristika ove vrste, stoga se razlikuju dve podvrste: *J. communis* subsp. *communis* i *J. communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak (sin. *J. communis* subsp. *nana*, *J. communis* var. *saxatilis* Pallas, *J. sibirica* Burgsd.). Biljke koje pripadaju *J. communis* subsp. *communis* su najčešće uspravni grmovi ili malo drveće sa dugim iglicama (dužine do 27 mm) i sitnijim bobicama (u prečniku 5-8 mm). Rastu uglavnom na različitim nadmorskim visinama umerenog pojasa severne hemisfere. U okviru *J. communis* subsp. *communis* opisano je nekoliko varijeteta: *J. communis* var. *communis*, zatim var. *depressa*, Pursh, var. *nipponica* (Maxim.) E.H. Wilson (sin. *J. rigida* var. *nipponica*) i var. *hemisphaerica* (J. Presl i C. Presl) Parl. Navedene jedinke rastu u Evropi i planinama vanevropskog Mediterana, većem delu Azije (uključujući Japan) i Severne Amerike, gde predstavljaju autohtone vrste. Sa druge strane, *J. communis* subsp. *alpina* su plegli razgranati grmovi, sa kraćim iglicama (dužine 3-8 mm) i krupnijim bobicama (u prečniku 7-12 mm). Staništa ovih biljaka su uglavnom u subarktičkom regionu, kao i na većim nadmorskim visinama umerenog pojasa severne hemisfere. U okviru podvrste *J. communis* subsp. *alpina*, takođe je opisano nekoliko varijeteta: var. *alpina*, var. *jackii* Rehder i var. *megistocarpa* Fernald i H. St. John, koje rastu na Grenlandu, u Evropi, Aziji, Severnoj Americi (zapadnim delovima SAD i istočnoj Kanadi) (Ložienė i Venskutonis, 2016).

U Srbiji, kleka najviše raste u brdovitim i planinskim predelima, pašnjacima, proređenim šumama i neobrađenim površinama. Najčešće se sreću *J. communis* L. var. *communis* (obična kleka) i *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. (klečica, klekuša) (Rajčević, 2015).

1.8.2.1. Biološke aktivnosti *J. communis*

Zbog brojnih lekovitih svojstava, čovek je kleku koristio još od davnina. Stari narodi su verovali u moć ove biljke pa su je upotrebljavali u različite svrhe. Zbog jakog mirisa, grančice kleke su palili da bi dezinfikovali prostorije, sušili meso ili su ih stavljali u košnice kako bi zaštitili pčele od bolesti. Bobice su koristili kao diuretik, abortivno sredstvo, zatim u lečenju dijabetesa, bubrežnih infekcija, kao i u lečenju crevnih infekcija izazvanih parazitima (Ložienė i Venskutonis, 2016). Danas su u upotrebi uglavnom samo bobice, iz kojih se dobija etarsko ulje (1-1,5%), a zvanična upotreba plodova i ulja kleke priznata je od strane Evropske farmakopeje. Etarska ulja imaju dobar antibakterijski, antifungalni, antivirusni, antioksidativni i anti-inflamatorni potencijal, pa su našli primenu u savremenoj medicini za lečenje prehlade, bakterijskih i gljivičnih infekcija (Cabral i sar., 2012; Carpenter i sar., 2012; Filipowicz i sar., 2003; Pepeljnjak i sar., 2005). Pored toga, literaturni podaci ukazuju i na citotoksični, antiproliferativni i antikancerski efekat različito pripremljenih ekstrakata i derivata kleke (Benzina i sar., 2015; Cabral i sar., 2012; Tsai i sar., 2018; Yaglioglu i Eser, 2017). Brojne biološke aktivnosti *J. communis* su pregledno prikazane u Tabeli 2.

J. communis je jedina četinarska biljka koja se koristi u kulinarstvu, pri čemu se u ishrani uglavnom koriste bobice, retko grančice (Ložienė i Venskutonis, 2016). Kleka je verovatno najpoznatija po tome što se koristi u aromatizaciji alkoholnih pića, pre svega džina. Džin je nastao u Holandiji, u 16. veku, gde se prvo koristio kao lek. Ime džin potiče od francuske reči *genièvre*, holandske *jenever* i italijanske *ginepro*, što znači - kleka. Osim džina, u Francuskoj i skandinavskim

zemljama, proizvodi se *Genevrette*, tradicionalno alkoholno piće poput piva na bazi kleke (Vichi i sar., 2005). U Poljskoj je poznato pivo *Kozicowe*, ali su se tamo bobice kleke povremeno koristile i u proizvodnji poljskih vina i likera (Łuczaj i Szymański, 2007). U Estoniji se proizvodi sirup koji je dostupan u prodavnicama zdrave hrane (Łuczaj i sar., 2012). U Sloveniji je poznat *Brinjevec*, u Slovačkoj *Borovička*, a u Srbiji *Klekovača*, tradicionalne vrste rakije na bazi kleke. Osim u proizvodnji alkoholnih pića, aromatične bobice kleke imaju široku primenu i u kulinarstvu, u pripremi jela od divljači i drugih vrsta mesa. Kao prilog jelima, kleka se dodaje u razne soseve, marinade ili nadeve. Koristi se kao začim u pripremi tradicionalnih jela Poljske, kiselog kupusa tzv. *bigos* i kobasica *kielbasa jalowcowa* (Łuczaj i Szymański, 2007).

Kleka se široko primenjuje i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Aromatična svojstva bobica zavise od količine i sastava etarskog ulja. Zanimljivo je to da je količina ulja u nezrelim bobicama veća (do 4,2 %) od količine ulja u zrelih (do 1,1 %, Butkienė i sar., 2006; Ložienė i Labokas, 2012). Bez obzira što je količina ulja različita, postoje dokazi da je kvalitativni sastav ulja nezrelih i zrelih bobica sa istog grma sličan (Ložienė i sar., 2010). Monoterpeni i seskviterpeni predstavljaju dve dominantne grupe terpenskih jedinjenja u sastavu ulja, međutim, često postoji razlika u njihovoj procentualnoj zastupljenosti (Butkienė i sar., 2009). Jaka i prepoznatljiva aroma ulja upravo potiče od terpena koja se nalaze u njegovom sastavu (Vaičiulytė i Ložienė, 2013). Iako je količina ulja u iglicama (do 0,9 %) značajno manja nego u bobicama, njihov hemijski sastav u pogledu dominantnih komponenti je veoma sličan (Butkienė i sar., 2006; Ložienė i Labokas, 2012). Takođe, hiralnost jedinjenja koja ulaze u sastav ulja kleke utiče na razlike u pogledu ukusa i mirisa kleke (Vaičiulytė i Ložienė, 2013). U vezi s tim, jedna od najznačajnijih komponenti u sastavu ulja kleke je α -pinen, prisutan u dve konformacione forme, a prisustvo jedne ili druge direktno utiče na autentičnost mirisa. Dok jedna forma sadrži mirisne note mente, druga daje karakterističnu aromu bora (Zawirska-Wojtasiak, 2006).

Tabela 2. Biološke aktivnosti *J. communis*

Biološka svojstva	Izvor
Antibakterijska aktivnost	Carpenter i sar., 2012; Fernandez i sar., 2016; Georgieva i sar., 2014; Glišić i sar., 2007; Gordien i sar., 2009; Lesjak, 2011; Martz i sar., 2009; Miceli i sar., 2020; Pepeljnjak i sar., 2005; Sati i Joshi, 2010; Taviano i sar., 2013; Tserennadmid i sar., 2011
Antifungalna aktivnost	Cabral i sar., 2012; Miceli i sar., 2020; Pepeljnjak i sar., 2005
Antioksidativna aktivnost	Elmastaş i sar., 2006; Gumral i sar., 2015; Höferl i sar., 2014; Lesjak, 2011; Miceli i sar., 2020; Šojić i sar., 2017; Taviano i sar., 2011; Wei i Shibamoto, 2007; Yaglioglu i sar., 2017
Anti-inflamatorna aktivnost	Akkol i sar., 2009; Han i Parker, 2017; Modnicki i sar., 2009
Citotoksična aktivnost	Cabral i sar., 2012; Lantto i sar., 2009
Antiproliferativna aktivnost	Fernandez i sar., 2016; Yaglioglu i Eser, 2017
Antikancerska aktivnost	Benzina i sar., 2015; Lantto i sar., 2016; Na i sar., 2001; Tsai i sar., 2018
Hepatoprotektivna aktivnost	Bais i sar., 2014
Neuroprotektivna aktivnost	Bais i sar., 2014; 2015
Analgetska aktivnost	Banerjee i sar., 2012

Imajući u vidu sve navedeno, u ovoj studiji ispitana su biološka svojstva vrste *Juniperus communis* L. Iako su ranija istraživanja pokazala da etarska ulja i ekstrakti biljaka iz roda *Juniperus*, uključujući i *J. communis*, imaju antioksidativna, antimikrobna i citotoksična svojstva, činjenica je da su literaturni podaci o ovoj temi i dalje fragmentarni, što se naročito odnosi na varijetete zastupljene u flori Srbije. Zbog toga je od posebnog značaja to što je velikim delom ovo

istraživanje obuhvatilo varijetet *saxatilis* Pall. (syn. *J. communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak, *J. sibirica* Burgsdorf, *J. nana* Willd, *J. intermedia* Schur.) koji raste na području Stare planine (Slika 6). Ispitivanje bioloških aktivnosti (antioksidativnih, antimikrobnih i citotoksičnih svojstava) do sada nedovoljno ispitane biljne vrste/varijeteta sa našeg područja, može biti od izuzetnog naučnog i praktičnog značaja.

S obzirom da je kleka začinska biljka, te da se koristi u prehrambenoj industriji, smatrali smo zanimljivim da se fokusiramo na ispitivanje njenog antimikrobnog potencijala prema kontaminantima hrane. Značaj ovakvog istraživanja leži u činjenici da je hrana bogata nutrijentima i izrazito podložna kvarenju. Poseban problem predstavlja kontaminacija hrane patogenim mikroorganizmima, zbog čega se mikrobiološko zagađenje smatra jednim od ključnih pitanja bezbednosti hrane (Bintsis, 2018).



Slika 6. *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall.
(preuzeto iz Rajčević, 2015; foto: dr Nemanja Rajčević)

1.9. Mikroorganizmi kontaminanti hrane

Kontaminanti životnih namirnica, patogeni ali i uzročnici njihovog kvarenja, mogu biti bakterije, gljive i virusi, a u okviru ove doktorske disertacije analiziran je antifungalni i antibakterijski potencijal kleke prema odabranim rodovima/vrstama gljiva i bakterija čiji se predstavnici često mogu naći na/u različitim prehrambenim proizvodima.

1.9.1. Gljive kao kontaminanti hrane

Vrste roda *Aspergillus* su saprofitne gljive kosmopolitski rasprostranjene, sa vrstama koje imaju veliki značaj u prehrambenoj industriji, pre svega zbog proizvodnje mikotoksina koji se smatraju veoma važnim kontaminantima različitih namirnica. Mikotoksini predstavljaju sekundarne metabolite gljiva koji se sintetišu u nepovoljnim uslovima rasta. Unošenje hrane kontaminirane mikotoksinima može dovesti do mikotoksikoza. Predstavnici nekih vrsta su biljni i/ili životinjski patogeni. Izazivači su bolesti aspergiloze kod čoveka i životinja, naročito ptica. Oslabljeni imunski sistem glavni je preduslov za razvoj sistemske infekcije kod ljudi. U najznačajnije predstavnike roda *Aspergillus* ubrajaju se *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus versicolor* (Bennett, 2010).

A. fumigatus je vrsta koja ima ključnu ulogu u recikliranju ugljenika i azota. Ima visok kapacitet sporulacije, što dovodi do sveprisutnosti konidija u različitim staništima. Ova gljiva ranije nije izazivala štetne efekte, međutim, sada predstavlja najrasprostranjenijeg patogena u vazduhu, koji uzrokuje teške invazivne infekcije, često fatalne kod imunokompromitovanih osoba. Uprkos dramatičnom porastu incidence invazivne aspergiloze, patogenost ove gljive još uvek nije u potpunosti jasna (Latgé, 2001). *A. ochraceus* proizvodi ohratoksin A, mikotoksin koji najčešće kontaminira različite namirnice, uključujući žitarice, začine, sušeno voće, kafu, ali se javlja i u pićima, kao što su mleko, vino i pivo. Pokazano je da ovaj mikotoksin ima nefrotoksično, imunotoksično, genotoksično i teratogeno svojstvo prema nekoliko životinjskih vrsta, te je svrstan u grupu potencijalnih kancerogena (Patiño i sar., 2005). *A. niger* predstavlja jednog od najvažnijih mikroorganizama koji je našao široku primenu u biotehnologiji. Limunska kiselina i ekstracelularni enzimi, poput pektinaze, proteaze i amiloglukozidaze, proizvodi su plesni *A. niger*. Pored toga, ova gljiva se koristi u biotransformaciji terpenoida, a takođe ubrzava i razgradnju otpada. U poređenju sa ostalim filamentoznim gljivama, *A. niger* ne izaziva ozbiljne infekcije; jedino su u tropskim krajevima zabeležene infekcije uva (otomikoze). Od brojnih sekundarnih metabolita koje ova gljiva proizvodi, značajan je ohratoksin A (Schuster i sar., 2002). *A. versicolor* je jedna od najvažnijih gljiva iz roda *Aspergillus*, koja izaziva kvarenje hrane. Najčešći je kontaminant žitarica, uljarica, orašastih plodova, mahunarki, ali je pronađena i u prerađevinama od mesa i mleka. *A. versicolor* je glavni producent sterigmatocina, potvrđenog karcinogena, koji se javlja u žitaricama i siru, a može izazvati i akutno trovanje hranom. Mikotoksin sterigmatocin predstavlja biohemijski prekursor aflatoksina, iako vrste *A. versicolor* ne proizvode aflatoksin (Engelhart i sar., 2002).

Vrste roda *Penicillium* su široko rasprostranjene oportunističke gljive, pretežno saprofitske. Predstavljaju najčešće uzročnike kvarenja voća i povrća, dok su sa druge strane brojne vrste korisne za čoveka. Na primer, vrste *Penicillium roqueforti* i *P. camembertii* značajne su u proizvodnji pojedinih vrsta sireva. Međutim, ovaj rod je posebno poznat po proizvodnji prvog otkrivenog antibiotika - penicilina, najvažnijeg jedinjenja do sada izolovanog iz gljiva. Otkriće penicilina iniciralo je dalje proučavanje metabolita gljiva, a kasnije i proizvodnju hemijski modifikovanih antibiotika. Prvootkriveni producent penicilina bila je vrsta *P. notatum*, međutim, kasnije je otkriveno da ovaj antibiotik u značajno većim količinama proizvode *P. chrysogenum*. Vrste ovog roda predstavljaju i dobre proizvođače ekstracelularnih enzima kao što su lipaze, proteaze, celulaze i ksilanaze (Li i Zong, 2010). Veliki potencijal za proizvodnju celulaze i ksilanaze ima *P. funiculosum*. To je biljni patogen, izazivač truleži ananasa. Funikulozin je antibiotik originalno izolovan iz ove gljive (Maeda i sar., 2013). *P. ochrochloron* se najčešće izoluje iz zemljišta ili sa voća poput jabuke; proizvode mikotoksin, penitrem A. Pokazano je da ova gljiva vrši detoksikaciju organskih boja poput malahit-zelenog, kao i preradu otpadnih voda poreklom iz tekstilne industrije (Shedbalkar i Jadhav, 2011). *P. verrucosum* var. *cyclopium* se često izoluje sa namirnicama, posebno sireva i žitarica. Vlažna sredina doprinosi razvoju ove gljive, pa se često može izolovati sa zrna kukuruza ili neke druge žitarice, neadekvatno skladištene. Mikotoksini ohratoksin A i citrin, izolovani iz vrste *P. verrucosum*, pripadaju grupi nefrotoksina i izazivaju oboljenja bubrega (Frisvad i sar., 2004).

Vrste roda *Trichoderma* su veoma raznovrsne kosmopolitski rasprostranjene filamentozne gljive. To su saprobi koji mogu biti izolovani iz najrazličitijih sredina, kao što su zemljište, kora drveta ili površina drugih gljiva. Vrste ovog roda su poznati biološki agensi korišćeni u kontroli različitih biljnih patogena. Vrste roda *Trichoderma* proizvode enzime koji razlažu ćelijski zid gljiva, što im omogućava parazitski način života, mikoparazitizam. *Trichoderma viride* ima antagonističko dejstvo prema brojnim fitopatogenim gljivama iz rodova *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Armillaria* i *Fusarium* (Sharma, 2011).

Rod *Candida* pripada familiji kvasnica, Saccharomycetaceae, sa preko 200 različitih vrsta, među kojima se *C. albicans* smatra najznačajnijim patogenom. To je polimorfna gljiva koja normalno ulazi u sastav mikrobioma čoveka i nekih životinja, gde pretežno kolonizuje njihov gastrointestinalni, respiratorni i urogenitalni trakt. Kod zdravih osoba, *C. albicans* može boraviti kao doživotni komensalni mikroorganizam na mukoznim membranama i koži, ne izazivajući

nikakve tegobe. Međutim, pod određenim okolnostima ova kvasnica može izazvati različite infekcije, kako površinske (oralne i vaginalne kandidijaze), tako i invazivne sistemske. Ovakva stanja su naročito opasna kod osoba sa oslabljenim imunskim sistemom (oboleli od HIV-a, malignih oboljenja ili pacijenti sa obavljenom transplantacijom) i karakteriše ih visoka stopa smrtnosti. Patogeni potencijal *C. albicans*, odnosno sposobnost da izazove bolest, omogućen je različitim faktorima virulencije. U faktore virulencije spadaju morfološki prelazak iz kvasolike u hifalnu formu, sekrecija hidrolitičkih enzima, ekspresija proteina neophodnih za proces adhezije i invazije na/u ćelije domaćina, sposobnost formiranja biofilma, fenotipska tranzicija (sposobnost spontane, reverzibilne promene morfologije kolonija), tigmotropizam (promena pravca rasta u zavisnosti od sredinskih stimulusa) i razne druge osobine koje joj obezbeđuju preživljavanje u promenljivim uslovima sredine (Mayer i sar., 2013). Kao odgovor na neadekvatnu i nekontrolisanu upotrebu azolnih lekova u lečenju kandidijaza, sve je češća pojava rezistentnih sojeva *C. albicans*, te stoga njeno efikasno suzbijanje trenutno predstavlja izazov za kliničku praksu.

1.9.2. Patogene bakterije prenosive hranom

Bakterije prenosive hranom mogu biti značajni humani patogeni, a pripadaju i gram-pozitivnim i gram-negativnim vrstama. Gram-pozitivne bakterije obuhvataju rodove *Staphylococcus*, *Enterococcus* i *Listeria*, dok grupi gram-negativnih bakterija pripadaju rodovi *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* i *Pseudomonas*. U najznačajnije patogene, izazivače bolesti prenosivih hranom, ubrajaju se *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri* i *Escherichia coli*.

1.9.2.1. Gram-pozitivne bakterije

Rod *Staphylococcus* obuhvata fakultativno anaerobne, katalaza pozitivne, nepokretne bakterije koje ne stvaraju endospore. Loptastog su oblika i formiraju grozdaste strukture, po čemu su i dobile ime stafilokoke (grč. *staphylon*-grozd; *coccus*-zrno). Predstavnici ovog roda mogu biti striktni ili oportunistički patogeni. Brzo razvijanje rezistencije prema svim antibioticima karakteristika je ovog roda. *Staphylococcus aureus*, zlatni stafilokok, je komensal koji se prirodno nalazi na površini kože čoveka, a može se naći i na mukoznim membranama nosa, ždrela ili digestivnog trakta. Međutim, u uslovima oslabljenog imuniteta dovodi do razvoja infekcija, te se zbog toga smatra oportunističkim patogenom. Veliki rizik od infekcije predstavlja upotreba biomaterijala i drugih medicinskih sredstava na koje se ova bakterija uspešno adherira. *S. aureus* najčešće izaziva kožne infekcije i infekcije respiratornog trakta, sa težim oblicima upale pluća kod hospitalizovanih bolesnika i male dece. Često je prisutan u prehrambenim proizvodima gde najverovatnije dospeva preko kontaminiranih ruku, pri čemu može izazvati trovanje hranom. *S. aureus* produkuje različite toksine, uključujući hemolizine α , β , γ i δ , enterotoksine A, B, C, D, E, ekfolijatin i stafilokokni toksin 1 sindroma toksičnog šoka (Otto, 2014; Rode i sar., 2007). Meticilin-rezistentni *S. aureus* (eng. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) je glavni uzročnik bolničkih infekcija. Njegovo suzbijanje postaje sve teže i komplikovanije, zbog razvoja rezistencije prema svim postojećim grupama antibiotika (Enright i sar., 2002).

Rodu *Enterococcus* pripadaju nepokretne, gram-pozitivne koke, koje ne stvaraju endospore. Ćelije mogu biti pojedinačne ili u formi kratkih lanaca. To su fakultativni anaerobi i karakteriše ih visoka tolerancija na stresne uslove sredine. Enterokoke su česti uzročnici bolničkih infekcija, pri čemu velike poteškoće u njihovom lečenju nastaju zbog česte pojave rezistentnih sojeva. Najznačajniji među njima su vankomicin-rezistentni sojevi (eng. *Vancomycin-Resistant Enterococci*, VRE). *E. faecalis*, fekalni enterokok, je oportunistički patogen, normalno prisutan u crevnoj flori životinja i čoveka. Uzročnik je različitih infekcija kod ljudi, uključujući bakteremije, septikemije, endokarditis, infekcije urinarnog trakta, infekcije rana, neonatalnu sepsu i meningitis (Kafil i sar., 2014). Iako se pojedini sojevi *E. faecalis* koriste u prehrambenoj industriji u proizvodnji sireva, značaj enterokoka u proizvodnji bezbedne hrane je diskutabilan. Naime, ove bakterije imaju sposobnost sinteze bakteriocina enterocina, koji snažno inhibira rast patogena,

uzročnika bolesti koje se prenose hranom. Međutim, s druge strane ove bakterije proizvode biogene amine i prenose gene rezistencije na antibiotike u toj istoj hrani (Lopes i sar., 2006). Zatim, izrazito virulentni sojevi *E. faecalis* proizvode toksin citolizin, koji lizira bakterijske ali i eukariotske ćelije (Van Tyne i sar., 2013). Uz to, prisustvo litičkih enzima *E. faecalis* želatinaze i hijaluronidaze, svojevrsnih faktora virulencije, povezuje se sa razvojem zapaljenskog oboljenja creva (eng. *inflammatory bowel disease*, Golińska i sar., 2013).

Rod *Listeria* obuhvata fakultativno anaerobne, pokretne, štapičaste bakterije koje ne formiraju endospore. Vrste ovog roda su izolovane iz najrazličitih staništa, poput zemljišta, vode, otpadnih voda, fecesa ljudi i životinja, ali i iz hrane. Trenutno je poznato šest vrsta, od kojih su dve potencijalno patogene. *L. monocytogenes* je patogena za životinje i čoveka, uzročnik je bolesti listerioze, a u organizam domaćina dospeva najčešće preko kontaminirane hrane. Listerioza ljudi nije tako česta, ali kada se dogodi zahteva bolničko lečenje i neretko se završava smrću, zbog čega se ova bakterija svrstava u najznačajnije patogene čoveka. Problem *L. monocytogenes* leži u činjenici da je ona veoma otporna prema različitim stresnim faktorima spoljašnje sredine, pa se često sreće u proizvodnim pogonima hrane. Stoga, produkcija zdravstveno bezbedne hrane zahteva stalnu kontrolu *L. monocytogenes* u svim fazama proizvodnje (Vazquez-Boland i sar., 2001). U najznačajnije faktore virulencije ubrajaju se površinski proteini (internalin A i B), hemolizini (β hemolizin i toksin listeriozin O), Act A protein, dve fosfolipaze, metaloproteaza i dr (Dhama i sar., 2015).

1.9.2.2. Gram-negativne bakterije

Rod *Escherichia* obuhvata fakultativno anaerobne, gram-negativne, štapičaste bakterije. Većina je pokretna, ne stvara endospore, dok neki sojevi poseduju kapsulu. Rod *Escherichia* pripada velikoj porodici Enterobacteriaceae, čije vrste dominantno naseljavaju crevo čoveka i životinja. *E. coli*, kao najznačajniji predstavnik, važan je član normalne crevne mikroflore čoveka i drugih sisara. Indikator je fekalnog zagađenja vode i potencijalnog prisustva patogena. Osim toga, *E. coli* je najčešće korišćena bakterija u tehnologiji rekombinantne DNK kao domaćin za kloniranje gena. Međutim, ova bakterija je mnogo više od najizuzetnijeg laboratorijskog mikroorganizma i bezopasnog intestinalnog stanovnika, naprotiv, *E. coli* može biti veoma patogena i često smrtonosna. Postoji nekoliko grupa patogenih sojeva (serotipova) *E. coli*, koje izazivaju različite infekcije kod ljudi. Najčešći su uzročnici crevnih infekcija, ali i nekih drugih, poput infekcija urinarnog trakta, respiratornih infekcija, perikarditisa, meningitisa ili sepse. Enterohemoragična *E. coli* predstavlja najznačajnijeg kontaminanta različitih životnih namirnica i izazivača bolesti prenosivih hranom. Produkcija enterotoksina (verotoksin) i postojanje antigena O (lipopolisaharidni antigen), H (flagelarni antigen) i K (kapsularni antigen), važni su faktori virulencije *E. coli* (Kaper i sar., 2004).

U rod *Shigella* takođe spadaju gram-negativni, fakultativno anaerobni štapići koji pripadaju porodici Enterobacteriaceae. Karakteriše ih velika genetička srodnost sa vrstama roda *Escherichia*. Pripadnici *Shigella* nisu pokretni, ali su svi patogeni za čoveka. Rod je podeljen na 4 vrste, a svaka vrsta na serotipove, zasnovane na biohemijskim razlikama i varijacijama njihovog O-antigena. *S. flexneri* ima 13 serotipova, a u organizam domaćina dospeva fekalno-oralnom kontaminacijom. Ona vrši invaziju epitela debelog creva, gde izaziva akutno zapaljenje sluzokože, karakteristično za šigelozu (bakterijska dizenterija). Neadekvatno lečenje šigeloze može prouzrokovati komplikacije poput septikemije, upale pluća, a kao jednu od najozbiljnijih komplikacija, hemolitički uremijski sindrom. U lošim higijenskim uslovima može doći do kontaminacije vode i hrane; stoga je važno da se redovnom higijenom, uz odgovarajuću pripremu i adekvatno skladištenje hrane, smanji stepen kontaminacije izazvane *S. flexneri*. U najznačajnije faktore virulencije ubraja se šiga-toksin, veoma sličan verotoksinu kod *E. coli* (Jennison i Verma, 2004).

Bakterije roda *Salmonella* pripadaju porodici enterobakterija. To su gram-negativni, nesporogeni štapići, koji su uglavnom pokretni i vrše produkciju enterotoksina. Rod *Salmonella* trenutno je podeljen na dve vrste, *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori*, sa brojnim podvrstama i serovarijetetima (serotipovima). *Salmonella* spp. spada u najznačajnije patogene bakterije, uzročnike bolesti prenosivih hranom. Kao posledica trovanja hranom, javljaju se salmoneloze, koje

se različito manifestuju, počev od akutnih enterokolitisa do tifusne groznice. Serotipovi *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium*, najčešći su uzročnici salmoneloze ljudi, mada je sve češća infekcija izazvana i drugim, manje poznatim serotipovima, što naglašava potrebu za njihovom kontrolom. Izvor *Salmonella* spp. za ljude uglavnom su životinje i proizvodi animalnog porekla (Sánchez-Vargas i sar., 2011).

Rod *Pseudomonas* obuhvata aerobne, štapićaste, asporogene, uglavnom pokretne, oportunističke patogene. Široko su rasprostranjene, najčešće u sredinama kao što su zemljište, voda, vazduh, ali i u svežoj hrani biljnog i životinjskog porekla. Neke vrste predstavljaju patogene za čoveka, a neke za biljke ili životinje. *P. aeruginosa* je jedan od najčešćih uzročnika bolničkih infekcija, kao što su infekcije urinarnog i respiratornog trakta, kože i mekih tkiva. Naročito veliki rizik od infekcije ovim patogenom imaju osobe sa oslabljenim imunskim sistemom ili oboleli od cistične fibroze. Karakteriše ga postojanje rezistencije na veliki broj antibiotika i velika otpornost na spoljašnje uslove sredine. *P. aeruginosa* je psihrotolerant, tako da i na niskim temperaturama izaziva kvarenje hrane. Produkuje različite vrste toksina, među kojima su najznačajniji egzotoksin A, fosfolipaze, proteaze, hemolizin i endotoksin (Lyczak i sar., 2000; Gram i sar., 2002).

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Razvoj rezistentnosti patogenih bakterija i ćelija kancera na dostupne lekove, usled neadekvatne i prekomerne primene ovih supstanci, predstavlja veliki problem današnjice i stimuliše potragu za novim biološki aktivnim supstancama i novim strategijama njihove primene. U skladu sa navedenim, za predmet ove doktorske disertacije odabrana je biljka *Juniperus communis*, a osnovni ciljevi istraživanja bili su:

- 1) Hemijska karakterizacija i određivanje antioksidativnog potencijala derivata biljke *Juniperus communis* L. i to njenih etarskih ulja i postdestilacionog ostatka, a dodatno i karakterizacija etarskog ulja biljke *Satureja montana*, korišćenog kao pozitivna kontrola u pojedinim fazama istraživanja;
- 2) Analiza antimikrobnog potencijala derivata *J. communis*, pojedinačno i u kombinaciji sa drugim odabranim antimikrobnim agensima, sa posebnim osvrtom na mogućnost primene u hrani, gde bi se koristili kao prirodni konzervansi;
- 3) Analiza citotoksičnog potencijala derivata *J. communis*, pojedinačno i u kombinaciji sa konvencionalnim citostaticima.

Za realizaciju glavnih ciljeva definisani su brojni konkretni zadaci koji uključuju:

- Pripremu biljnog materijala za testiranje:
 - sakupljanje kleke *J. communis* var. *saxatilis* i destilaciju etarskog ulja iz ženskih šišarica (oznaka ulja Jc-EU-P);
 - sakupljanje postdestilacionog ostatka (PDO), koji je preostao nakon destilacije etarskog ulja Jc-EU-P;
 - komercijalno pribavljanje etarskih ulja proizvedenih iz ženskih šišarica kleke (*J. communis*, oznaka ulja Jc-EU-K) i herbe čubra (*Satureja montana*, oznaka ulja Sm-EU);
- Hemijsku karakterizaciju biljnih derivata:
 - etarskih ulja Jc-EU-P, Jc-EU-K i Sm-EU, primenom GC-MS analize;
 - PDO, primenom LC-MS/MS analize kao i određivanjem ukupnih flavonoida;
- Određivanje antioksidativnog potencijala derivata *J. communis* (Jc-EU-P i PDO) primenom DPPH, TBA i FRAP testova;
- Ispitivanje antibakterijskog i antifungalnog efekta derivata *J. communis* (Jc-EU-P i PDO) prema odabranim sojevima bakterija i gljiva:
 - određivanje minimalnih inhibitornih i baktericidnih/fungicidnih koncentracija primenom mikrodilucione metode;
 - ispitivanje antimikrobnog efekta binarnih kombinacija sa odabranim konvencionalnim antibioticima i analiza tipa interakcije test supstanci primenom metode šahovske table;
 - procena selektivnosti utvrđenog antimikrobnog potencijala na osnovu poređenja efektivnosti agenasa prema testiranim mikroorganizmima i humanim ćelijskim linijama;
 - utvrđivanje efekta na adheziju enteropatogena na humane ćelije kolona u kulturi;
- Ispitivanje mogućnosti primene etarskog ulja *J. communis* (Jc-EU-K) u hrani, samog i u kombinaciji sa etarskim uljem *Satureja montana* (Sm-EU), odabranim kao model prirodnog konzervansa, kroz antimikrobne testove sprovedene *in vitro* i *in situ* na mesu:
 - određivanje minimalnih inhibitornih i baktericidnih koncentracija, analiza tipa interakcije test supstanci u kombinacijama i praćenje dinamike inhibicije rasta primenom mikrodilucionih metoda i testa vremenski zavisne inhibicije rasta u *in vitro* uslovima;
 - praćenje dinamike rasta kontaminenata na odabranom matriksu hrane *in situ* primenom testa vremenski zavisne inhibicije rasta;

- Ispitivanje citotoksičnog efekta derivata *J. communis* (Jc-EU-P i PDO) prema odabranim humanim ćelijskim linijama:
 - analiza dinamike preživljavanja ćelija u funkciji rastućih koncentracija test supstanci i određivanje „poluletalnih“ IC_{50} koncentracija primenom MTT testa;
 - procena selektivne toksičnosti poređenjem efektivnosti agenasa na kancerskim i normalnim ćelijama;
 - analiza tipa interakcije binarnih kombinacija derivata *J. communis* sa odabranim konvencionalnim citostaticima, primenom metode izoblograma i kvantifikacijom kombinatornih indeksa;
 - utvrđivanje potencijala test supstanci da indukuju apoptozu i zaustavljaju proliferaciju ćelija primenom citometrijske analize;
 - utvrđivanje nivoa genotoksičnosti derivata *J. communis* primenom alkalnog komet testa.

MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Biljni materijal

Biljni material (ženske šišarke kleke) je sakupljen u julu 2011. godine, na Staroj Planini, Srbija. Primerak biljnog materijala (*Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall.) je pripremljen, identifikovan od strane dr Nemanje Rajčevića i deponovan u Herbarijumu Instituta za botaniku i Botaničke bašte "Jevremovac" Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (BEOU Herbarium). U Tabeli 3. prikazani su podaci o biljnom materijalu korišćenom u ovom istraživanju.

Tabela 3. Osnovni podaci o ispitivanoj vrsti roda *Juniperus*

Broj vaučera	Vrsta	Lokalitet	Datum
16693	<i>Juniperus communis</i> L. var. <i>saxatilis</i> Pall.	Babin Zub, Stara Planina, Srbija UTM 34T FP 2 30	jul, 2011

Hidrodestilacijom biljnog materijala po Klevendžeru proizvedeno je etarsko ulje (oznaka ulja Jc-EU-P), pri čemu je ostvareni prinos iznosio 0,94 % suvog biljnog materijala, a specifična težina proizvedenog ulja bila je 900 mg/mL. Materijal preostao nakon destilacije je sakupljen i uparen, u cilju pripreme test supstance označene kao postdestilacioni ostatak (PDO).

3.1.2. Etarska ulja

U cilju istraživanja antibakterijskog efekta i potencijala primene etarskog ulja kleke u prehrambene svrhe, korišćeno je i komercijalno kupljeno, 100 % čisto etarsko ulje kleke: „Borovica bobice (*Juniperus communis*)“, zemlja porekla Hrvatska; proizvođač *Ayus GmbH* – Nemačka. Uz to, kao svojevrsna kontrola etarskog ulja koje se već koristi kao aditiv hrani, kao i za ispitivanje kombinacija etarskih ulja, korišćeno je i komercijalno nabavljeno ulje čubra (vrijesak, vrisak): „Primorski vrisak (*Satureja montana*)“, zemlja porekla Albanija, proizvođač *Pranarom International* – Belgija.

3.1.3. Biološki materijal

3.1.3.1. Mikroorganizmi

Odabrani sojevi bakterija i gljiva korišćeni u ovom radu prikazani su u Tabeli 4. ATCC (eng. *American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA*) sojevi bakterija i *C. albicans* deo su laboratorijske kolekcije Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, dok su svi sojevi gljiva deponovani u Laboratoriji za Mikologiju, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Univerziteta u Beogradu – Instituta za Biološka istraživanja "Siniša Stanković".

Za ispitivanje antibakterijskog potencijala *in situ* korišćena su tri divlja primoizolata *L. monocytogenes*. Sojevi su dobijeni sa Odeljenja za mikrobiološka i molekularno- biološka istraživanja, Instituta za higijenu i tehnologiju mesa (INMES), Beograd i deo su njihove laboratorijske kolekcije.

Tabela 4. Sojevi mikroorganizama

Bakterije	Izvor
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC kolekcija
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	ATCC kolekcija
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ATCC kolekcija
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	ATCC kolekcija
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	ATCC kolekcija
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	ATCC kolekcija
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	ATCC kolekcija
<i>Listeria monocytogenes</i> serotip 1/2a (LMB)	izolat sa trupa govečeta
<i>Listeria monocytogenes</i> serotip 1/2c (LMS)	izolat sa površine lososa
<i>Listeria monocytogenes</i> serotip 4b (LMT)	izolat iz tunela za odvodnjavanje klanice
Mikromicete	Izvor
<i>Aspergillus fumigatus</i>	klinički izolat
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 11730	ATCC kolekcija
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 12066	ATCC kolekcija
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	ATCC kolekcija
<i>Trichoderma viride</i> IAM 5061	IAM kolekcija
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 36839	ATCC kolekcija
<i>Penicillium ochrochloron</i> ATCC 9112	ATCC kolekcija
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	izolat iz hrane
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	ATCC kolekcija

3.1.3.2. Čelijske linije

Čelijske linije korišćene u ovom radu su prikazane u Tabeli 5. Čelijske linije ATCC kolekcije (eng. *American Type Culture Collection*; Manassas, VA, SAD) i ECACC kolekcije (eng. *The European Collection of Authenticated Cell Cultures*; Salisbury, UK) dobijene su sa Onkološkog Instituta Vojvodine (Sremska Kamenica), sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (Beograd) i sa Instituta za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu.

Tabela 5. Čelijske linije

Čelijske linije	Naziv	Izvor
MRC-5 (ECACC 84101801)	Fetalni fibroblasti pluća	Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica
A549 (ATCC CCL-185)	Humane epitelne ćelije adenokarcinoma pluća	Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd
HT-29 (ECACC 91072201)	Humane epitelne ćelije kolorektalnog adenokarcinoma	Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica
HCT116 (ATCC CCL-247)	Humane epitelne ćelije kolorektalnog adenokarcinoma	Institut za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

3.1.4. Rastvori i reagensi koršćeni u hemijskim testovima

DPPH reagens (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, CAS. No. 1898-66-4) Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland). Rastvaran je u metanolu (MeOH), u koncentraciji 67,2 $\mu\text{mol/L}$ (26,4 $\mu\text{g/mL}$). Rastvor DPPH reagensa je korišćen za ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (DPPH test).

TBA reagens (3,75 mg/mL TBA + 1,3 % (v/v) HClO_4 + 150 mg/mL TCA), korišćen u TBA testu
 TBA (CAS. No. 504-17-6), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland).....3,75 g
 TCA (CAS. No. 76-03-9) Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA).....50 g
 HClO_4 (CAS. No. 7601-90-3) Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)13 mL
 dH_2O^11000 mL

L- α -fosfatidilholin (10%)

L- α -fosfatidilholin (CAS No. 8002-43-5) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....1 g
 dH_2O10 mL

0,075 mol/L FeSO_4

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$0,2085 g
 dH_2O10 mL

0,34 mol/L askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina.....0,0615 g
 dH_2O100 mL

0,067 mol/L fosfatni pufer (pH 7,4)

KH_2PO_41,7506 g
 Na_2HPO_47,6851 g
 dH_2O1000 mL

0,1 mol/L EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina)

EDTA (CAS. No.6381-92-6) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....1,86 g
 dH_2O50 mL

10 mmol/L 2,4,5-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl, korišćen u FRAP testu

TPTZ (CAS. No. 3682-35-7) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....0,0156 g
 36 % HCL.....0,017 mL
 dH_2O5 mL

0,02 mol/L FeCl_3

$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$0,027 g
 dH_2O5 mL

Acetatni pufer (pH 3,6)

$\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$0,155 g
 CH_3COOH (glac.).....0,80 mL
 dH_2O50 mL

Askorbinska kiselina (200 $\mu\text{g/mL}$)

Askorbinska kiselina.....0,05 g
 dH_2O250 mL

¹ dH_2O – destilovana voda

0,75 mol/L AlCl₃

AlCl ₃ x 6H ₂ O.....	4,527 g
dH ₂ O.....	25 mL

1 mol/L CH₃COONa

CH ₃ COONa x 3H ₂ O.....	3,402 g
dH ₂ O.....	25 mL

3.1.5. Materijal za gajenje mikroorganizama

3.1.5.1. Hranljive podloge

LA agar (eng. *Luria Agar*)

Bacto trypton.....	10 g
Yeast extract.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	15 g
dH ₂ O.....	1000 mL

MHB brot (eng. *Mueller-Hinton Broth*)

MHB gotova podloga u prahu, Himedia (Mumbai, India).....	21 g
dH ₂ O.....	1000 mL

MHA agar (eng. *Mueller Hinton Agar*)

MHB sa dodatkom 15 g agara na 1000 mL dH₂O.

BHI brot (eng. *Brain Heart Infusion Broth*)

BHI gotova podloga u prahu, LAB M (Lancashire, UK).....	37 g
dH ₂ O.....	1000 mL

BHA agar (eng. *Brain Heart Infusion Agar*)

BHI sa dodatkom 15 g agara na 1000 mL dH₂O.

LDAB agar (eng. *Listeria mono Diferential Agar Base*)

LDAB gotova podloga u prahu, Himedia (Mumbai, India).....	36 g
dH ₂ O.....	460 mL
FD212, FD213, FD214 suplementi*	

*Suplementi su pripremani prema uputstvu proizvođača i dodati nakon autoklaviranja u prohladen medijum do 45-50 °C.

MRS agar (eng. *de Man, Rogosa and Sharpe Agar*)

MRS gotova podloga u prahu LAB M (Lancashire, UK).....	55 g
dH ₂ O.....	1000 mL

EMB agar (eng. *Eosin Methylene Blue Agar*)

EMB gotova podloga u prahu Merck (Darmstadt, Germany).....	36 g
dH ₂ O.....	1000 mL

HAL 6

HAL 6 gotova podloga u prahu LAB M (Lancashire, UK).....	48,6 g
dH ₂ O.....	1000 mL

MB bujon (eng. *Malt Broth*)

ekstrakt slada.....50 g
 dH₂O.....1000 mL

MA agar (eng. *Malt Agar*)

MB sa dodatkom 15 g agara na 1000 mL dH₂O.

TSB bujon (eng. *Tryptic Soy Broth*)

TSB gotova podloga u prahu Merck (Darmstadt, Germany).....30 g
 dH₂O.....1000 mL

TSA agar (eng. *Tryptic Soy Agar*)

TSA gotova podloga u prahu Merck (Darmstadt, Germany).....40 g
 dH₂O.....1000 mL
 TSA sa dodatkom 15 g agara na 1000 mL dH₂O.

SS agar (eng. *Salmonella Shigella Agar*)

SS agar gotova podloga u prahu TC Media (Munster, Germany).....57 g
 dH₂O.....1000 mL

Sve hranljive podloge (osim SS agara), su sterisane u autoklavu 20 min pri temperaturi od 121 °C i pritisku 101,3 kPa.

3.1.5.2. Rastvori i reagensi

0,1 % peptonska voda

gotova podloga u prahu Himedia (Mumbai, India).....1 g
 dH₂O.....1000 mL

DMSO (dimetil-sulfoksid, CAS. No. 67-68-5), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), korišćen je kao rastvarač za etarska ulja u svim testovima (osim u DPPH testu i GC-MS analizi), kao i za rastvaranje konvencionalnih antimikrobnih agenasa (vidi Tabelu 6).

MeOH (metanol, CAS. No. 67-56-1) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), korišćen je kao rastvarač u DPPH testu, FRAP testu, za određivanje ukupnih flavonoida, kao i za rastvaranje konvencionalnih antimikrobnih agenasa (vidi Tabelu 6).

Resazurin (natrijumove soli resazurina, eng. *Resazurin Sodium Salt*, CAS No. 62758-13-8), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); rastvaran u dH₂O u koncentraciji 0,675 mg/mL. Rastvor resazurina je korišćen kao indikator rasta/metaboličke aktivnosti bakterija u mikrodilucionom testu.

3.1.5.3. Antimikrobni agensi

Antimikrobni agensi korišćeni u eksperimentalnom radu prikazani su u Tabeli 6. Svi navedeni agensi nabavljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Početni stokovi antibiotika/antimikotika pravljani su u odgovarajućim koncentracijama, i to u dH₂O, 5 % DMSO ili MeOH (tačna specifikacija rastvarača i koncentracije početnog stoka dati su u Tabeli 6). Sterilizacija antimikrobnih agenasa vršena je filtriranjem (filter 0,20 µm).

Tabela 6. Antimikrobni agensi

Naziv	Stok	Rastvarač
Streptomycin (str, CAS No. 3810-74-0)	20 mg/mL	dH ₂ O
Ampicilin (amp, CAS No. 69-52-3)	25 mg/mL	dH ₂ O
Azitromicin (azm, CAS No. 117772-70-0)	20 mg/mL	DMSO
Rifampicin (rif, CAS No. 13292-46-1)	100 mg/mL	MeOH
Bifonazol (bfz, CAS No.60628-96-8)	50 mg/mL	DMSO
Ketokonazol (kkz, CAS No.65277-42-1)	25 mg/mL	MeOH
Nistatin (nst, CAS No. 1400-61-9)	50 mg/mL	DMSO

3.1.5.4. Dodatni materijal za ispitivanje antibakterijskog potencijala *in situ***Uzorci mesa**

Sveži odresci junećeg mesa, nabavljeni u maloprodajnom objektu Univerexport DOO, Srbija, bili su pripremljeni za eksperimente na sledeći način:

- Isečeni na komade približne veličine 2,5 x 2,5 x 1 cm (širina, dužina, debljina), za senzornu analizu test supstanci;
- Isečeni na komade težine \approx 8 g, za praćenje antibakterijskog potencijala test supstanci.

Negativna kontrola, NaCl: 8,5 g/L rastvor kuhinjske soli

NaCl (tj. kuhinjska so).....1,7 g
sterilna dH₂O.....200 mL

Vinske marinade

Za pripremu marinada korišćeno je crveno vino, kao i začini koji se uobičajeno koriste u pripremi hrane od junećeg mesa. Marinade su pripremane od sledećih sastojaka, nabavljenih u maloprodajnom objektu Univerexport DOO, Srbija:

- crveno vino Crnogorski Merlot (proizvođač *Plantaže*, Crna Gora, sa 13,5 % alkohola)
- mleveni crni biber (proizvođač *Kotanyi*, Austrija)
- beli luk u prahu (proizvođač *Kotanyi*, Austrija)

Osnovna marinada (VM): (vino + 8,5 g/L NaCl + 8 g/L bibera + 7,5 g/L belog luka)

NaCl.....1,7 g
mleveni crni biber.....1,6 g
beli luk u prahu.....1,5 g
vino.....200 mL

Marinade sa dodatkom etarskih ulja:**VM+J0,125**

Jc-EU-K 0,125% (v/v).....0,25 mL
VM.....200 mL

VM+J0,25*

Jc-EU-K 0,25% (v/v).....0,5 mL
VM.....200 mL

VM+J0,5

Jc-EU-K 0,5% (v/v).....1 mL
VM.....200 mL

VM+S0,0625

Sm-EU 0,0625% (v/v).....	0,125 mL
VM.....	200 mL

VM+S0,125*

Sm-EU 0,125% (v/v).....	0,25 mL
VM.....	200 mL

VM+S0,25

Sm-EU 0,25% (v/v).....	0,5 mL
VM.....	200 mL

VM+J0,125+S0,0625

Jc-EU-K 0,125% (v/v).....	0,25 mL
Sm-EU 0,0625% (v/v).....	0,125 mL
VM.....	200 mL

VM+J0,25+S0,125*

Jc-EU-K 0,25% (v/v).....	0,5 mL
Sm-EU 0,125% (v/v).....	0,25 mL
VM.....	200 mL

VM+J0,5+S0,25

Jc-EU-K 0,5% (v/v).....	1 mL
Sm-EU 0,25% (v/v).....	0,5 mL
VM.....	200 mL

Sve marinade korišćene su za ispitivanje organoleptičkih svojstava, dok su označene marinade (*) dodatno korišćene i u ispitivanjima antibakterijskog potencijala.

3.1.6. Materijal za gajenje sisarskih ćelija**3.1.6.1. Hranljive podloge**

Za gajenje ćelija korišćen je DMEM medijum (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sa D-glukozom finalne koncentracije 4,5 % i L-glutaminom finalne koncentracije 2mmol/L. Medijumi i rastvori korišćeni za kultivaciju ćelija nabavljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Podloge se čuvaju na 4 °C. Medijum je pre upotrebe inkubiran oko 30 min na 37 °C.

Radni medijum

DMEM medijum (sa L-glutaminom)*.....	44 mL
FBS (eng. <i>Fetal Bovine Serum</i>).....	5 mL
penicilin (100 U/mL) + streptomycin (100 µg/mL) 100x.....	0,5 mL
MEM NEAA (eng. <i>Minimal Essential Medium with Non-Essential Amino Acids</i>) 1%.....	0,5 mL
*L-glutamin 200 mM (ako je medijum bez glutamina).....	0,5 mL

Medijum za zamrzavanje ćelija

DMEM medijum.....	5,5 mL
DMSO.....	1 mL
FBS (35%).....	3,5 mL

Neophodno je medijum za zamrzavanje praviti svež: na dan zamrzavanja ili dan ranije.

3.1.6.2. Rastvori i reagensi

10xPBS (eng. *Phosphate Buffered Saline*)

1xPBS PAA The Cell Culture Company (Austrija).....	100 mL
dH ₂ O.....	900 mL

0,1 % tripsin

Trypsin (CAS. No.9002-07-7) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....	0,7 g
EDTA.....	0,07 g
NaCl.....	5,6 g
KCl.....	0,28 g
Glukozomonohidrat.....	0,63 g
NaHCO ₃	0,588 g
1xPBS.....	700 mL

0,4 % Tripian plavo (eng. *Trypan Blue*)

Trypan Blue (CAS. No.200-786-7) TCI Europe (Boerenveldseweg, Belgium).....	0,4 g
dH ₂ O.....	100 mL

Rastvor za lizu (pH 10)

NaCl Himedia (Mumbai, Indija).....	146,6 g
EDTA Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....	37,2 g
Tris Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....	1,21 g
dH ₂ O.....	1000 mL

Vrednost pH rastvora se podešava sa 10 mol/L NaOH. Nakod toga dodaje se 1 % Triton X-100 i snažno se promućka.

Rastvor za denaturaciju i elektroforezu (pH 13)

10 mol/L NaOH.....	30 mL
0,2 mol/L EDTA.....	5 mL
dH ₂ O.....	965 mL

0,2 mol/L EDTA

EDTA Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....	37,2 g
dH ₂ O.....	500 mL

Rastvor za neutralizaciju (pH 7,5)

Tris Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....	48,44 g
dH ₂ O.....	1000 mL

Vrednost pH rastvora se podešava sa HCl.

Rastvori za lizu, elektroforezu i neutralizaciju se pripremaju na dan eksperimenta. Nakon podešavanja pH, svi rastvori se čuvaju u frižideru (+4 °C).

1 % NMP (eng. *Normal Melting Point*) **agaroza**²

NMP Eurobio (Francuska).....	1 g
dH ₂ O.....	99 mL

1 % NMP (eng. *Normal Melting Point*) **agaroza**³

NMP Eurobio (Francuska).....	1 g
1xPBS PAA The Cell Culture Company (Austrija).....	99 mL

² 1% NMP agaroza se nanosi kao prvi sloj na pločicama

³ 1% NMP agaroza se nanosi kao drugi sloj, na levu i desnu stranu pločice

1 % LMP (eng. *Low Melting Point*)

LMP Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).....1 g
1xPBS PAA The Cell Culture Company (Austrija).....99 mL

10 mol/L NaOH

NaOH Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).....200 g
dH₂O.....500 mL

Rastvor etidijum-bromida

Pripreman je stok rastvora etidijum-bromida (CAS. No. 1239-45-8) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), koncentracije 10 mg/mL u dH₂O. Za vizuelizaciju kometa rastvor je razblažen do finalne koncentracije 2 µg/mL.

Rastvor MTT

(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) (MTT, CAS. No. 298-93-1) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), rastvoren je u dH₂O (5mg/mL) i profiltriran (filter 0,20 µm). Rastvor se čuvao u zamrzivaču, a koristio se za ispitivanje metaboličke aktivnosti ćelija gajenih u kulturi, kako bi se procenila njihova vijabilnost.

Annexin V-FITC kit

Anneksin V-fluorescein-izotiocijanat (Annexin V-FITC) kit za detekciju apoptoze BD Biosciences, Pharmingen (San Diego, CA, USA), korišćen je u ispitivanju tipa ćelijske smrti koji indukuju test supstance.

Rastvor PI

Propidijum-jodid (PI, CAS. No. 25535-16-4) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), fluorescentna boja, rastvorena u 1xPBS (400 µg/mL). Rastvor PI se čuvao u frižideru (zaštićen od svetlosti), a korišćen je u protočnoj citometriji za analizu distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa i analizu tipa ćelijske smrti.

Rastvor RNaza A

Ribonukleaza A (RNaza A, CAS. No. 9001-99-4) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), enzim, rastvoren u 1xPBS (1 mg/mL). Rastvor RNaza A se čuvao u zamrzivaču, a koristio se u protočnoj citometriji za analizu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

3.1.6.3. Citostatici

Primarni stokovi citostatika 5-fluorouracila (5-FU, CAS No. 51-21-8) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) i doksorubicina (DOX, CAS. No. 25316-40-9) „Actavis, S.C. Sindan-Pharma S.R.L“, Romania, pravljani su u koncentraciji 1 mg/mL u dH₂O. Citostatici su rastvarani neposredno na dan eksperimenta.

3.2. METODE

3.2.1. Hemijske analize i detekcija antioksidativne aktivnosti

3.2.1.1. Priprema etarskog ulja i postdestilacionog ostatka *J. communis* var. *saxatilis*

Etarsko ulje i PDO ženskih šišarki *J. communis* var. *saxatilis* pripremljena su na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Etarsko ulje iz šišarki dobijeno je procesom hidrodestilacije u aparaturi po *Clevenger-u*, uz *n*-heksan kao prihvatni rastvarač. Ukratko, 300 g osušenog i usitnjenog biljnog

materijala je odmereno, preliveno sa 1200 mL dH₂O i destilovano tokom 4 h. Dobijeno ulje sušeno je pomoću anhidrovanog Na₂SO₄ u toku 24 h. Nakon ceđenja, *n*-heksan je uparen na rotacionom vakuum-uparivaču. Ovako pripremljeno etarsko ulje (Jc-EU-P) je za potrebe daljih istraživanja rastvoreno u različitim rastvaračima: za GC-MS analizu (gasna hromatografija sa masenospektrometrijskom detekcijom), ono je rastvoreno u heksanu (1:2000), za ispitivanje antioksidantne aktivnosti u 80 % MeOH, dok je u biološkim testovima (testovi određivanja antimikrobnog potencijala, citotoksičnosti i genotoksičnosti) rastvarač bio DMSO.

U postupku pripreme PDO, vodeni rastvor koji je zaostao nakon destilacije je uparen na vakuum-uparivaču do suva, na temperaturi do 45 °C da bi se izbegla degradacija termolabilnih prirodnih proizvoda. Suvi ostatak je rastvoren u toploj dH₂O u koncentraciji 0,1 g/mL, a zatim je ispran petroletrom (frakcija 40–60 °C) u cilju uklanjanja nepolarnih komponenti. Na kraju je ovaj rastvor uparen na rotacionom vakuum-uparivaču do suva. Nakon sušenja u eksikatoru tokom 48 h, izmerena je masa suvog ostatka i izračunat prinos. Suvi ostatak je zatim rastvaran u nekoliko različitih rastvarača: u smeši 0,05 % mravlje kiseline i metanola (odnos 7:3) za određivanje kvantitativnog sastava primenom LC-MS/MS tehnike (tečna hromatografija sa tandemskom masenospektrometrijskom detekcijom); u 80 % MeOH za ispitivanje antioksidativnog potencijala (DPPH i FRAP testovi); u dH₂O za sve ostale eseje: antioksidantne aktivnosti (TBA esej) i biološke testove (testovi određivanja antimikrobnog potencijala, citotoksičnosti i genotoksičnosti).

3.2.1.2. GC-MS analiza etarskih ulja

GC-MS analiza etarskog ulja urađena je po protokolu Lesjak i sar. (2013). Izolovano i u heksanu rastvoreno etarsko ulje *J. communis* var. *saxatilis* (Jc-EU-P) analizirano je na *Agilent Technologies* 6890N gasnom hromatografu sa 5975B masenim spektrometrom. Injektovano je po 1 µL uzorka u *split/splitless* inlet, na temperaturi 250 °C, u *split* modu (*split* odnos 1:100). Kao gas nosač korišćen je helijum čistoće 99,999 %, u režimu konstantnog protoka od 1 mL/min. Komponente ulja su razdvojene na HP-5ms (*Agilent Technologies*) kapilarnoj koloni dimenzija 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, uz podešeni temperaturni program: startna temperatura 50 °C, uz povećanje temperature dinamikom 8 °C/min do 120 °C, 15 °C/min do 230 °C, 20 °C/min do 270 °C (ukupno trajanje analize 16,9 min). Razdvojene komponente su analizirane na masenom spektrometru (temperatura transfer linije 280 °C, temperatura jonskog izvora 230 °C, energija elektrona 70 eV, temperatura kvadrupola 150 °C) u *skan* modu, u *m/z* opsegu 35–400. U cilju bolje korelacije masenih spektara sa spektralnim bibliotekama, instrument je tjuniran korišćenjem *Standard spectra tune-a*.

Podaci su obrađeni pomoću *Agilent Technologies* MSD ChemStation softvera (revizija E01.01.335) u kombinaciji sa AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, ver. 2.64) i NIST MS Search softverom (ver. 2.0d). AMDIS je korišćen za ekstrakciju čistih masenih spektara iz preklopljenih pikova, dok je NIST MS Search obezbedio algoritam za pretragu biblioteka komplementarnih PBM (eng. *Probability Best Match*) algoritmu ChemStation softvera. Za identifikaciju masenih spektara korišćene su spektralne biblioteke Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th Edition (338000 spektara, 289000 jedinjenja) i NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05 (190825 spektara, 163198 jedinjenja). Identitet jedinjenja potvrđen je poređenjem linearnih retencionih indeksa (LRI) sa literaturnim podacima (Adams, 2009). Kao standard za određivanje LRI korišćeno je dizel ulje, za koje je analizom utvrđeno da sadrži smešu svih *n*-alkana u opsegu C₈–C₂₈ (odgovara retencionom indeksu 800–2800), (Tabela 8.1; Slika 8.1). Relativni udeli jedinjenja određeni su metodom normalizacije, na osnovu površine pikova u TIC (eng. *Total Ion Chromatogram*).

Pored analize etarskog ulja koje je destilovano iz šiškarki biljke, vršena je i hemijska analiza komercijalno nabavljenih ulja *J. communis* (Jc-EU-K) i *Satureja montana* (Sm-EU) i to u laboratoriji Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. Uzorak svakog ulja za analizu je pripremljen rastvaranjem 1 µl ulja u 10 µl 75 %-tnog etanola. Hemijska analiza je određena gasnom hromatografijom uz korišćenje dva tipa detektora. GC-FID analiza je urađena na *Agilent Technologies* 7890A gasnom hromatografu, koji je opremljen *split-splitless* injektorom povezanim

sa HP-5 kolonom (30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 mL/min), uz podešene temperature injektora na 250 °C i detektora na 280 °C. Temperatura kolone programirana je da se linearno menja od 40–260 °C (4 °C/min). Procentualna zastupljenost jedinjenja u etarskom ulju je preračunata na osnovu površine GC-FID pikova, bez korekcionih faktora. Za GC-MS analizu korišćen je HP G 1800C Series II GCD analitički sistem sa HP-5MS kolonom (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) uz helijum kao noseći gas (1 mL/min), uz isti temperaturni režim kao za GC-FID. Razdvojene komponente su analizirane na masenom spektrometru, a temperatura transfer linije iznosila je 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u m/z opsegu 40–400. Za analize oba ulja, uzorci su rastvoreni u etanolu (1 μ L), i injektovani u split režimu (1:30). Pojedinačne komponente su determinisane maseno-spektrometrijski i primenom KI, kao i primenom različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), uz poređenje sa eksperimentalno određenim indeksima (AMDIS) i podacima raspoloživim u literaturi (Adams, 2009).

3.2.1.3. Kvantitativna analiza odabranih fenolnih jedinjenja LC-MS/MS metodom

Sadržaj hinske kiseline i 44 odabrana fenolna jedinjenja u sastavu PDO određen je primenom LC-MS/MS metode (Orčić i sar., 2014). Za analizu je korišćen Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution tečni hromatograf, kuplovan sa G6410A QqQ tandemskim masenim detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI). Hromatografsko razdvajanje analita vršeno je primenom Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4,6 mm x 50 mm x 1,8 μ m (Agilent Technologies) reverzno-fazne kolone pri temperaturi od 45 °C. Instrument je kontrolisan i rezultati obrađivani MassHunter ver. B.03.01. softverom (Agilent Technologies, USA). Binarna mobilna faza sastojala se od faze A (0,05% mravlje kiseline) i faze B (MeOH), a protok je iznosio 1 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 min 30 % B, 6 min 70 % B, 9 min 100 % B, 12 min 100 % B, sa post-vremenom od 3 min. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μ L. ESI parametri bili su: temperatura gasa za sušenje (N_2) 350 °C, protok 9 L/min, pritisak gasa za raspršivanje 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet. Jedinjenja su praćena u dinamičkom SRM (eng. *Selective Reactions Monitoring*) modu. Ispitivani standardi rastvoreni su u smeši 0,05 % mravlje kiseline i MeOH (odnos 7:3) do finalne koncentracije 0,2 mg/mL. Napravljen je osnovni miks standarda, tako da koncentracija svake komponente bude 100 μ g/mL. Sadržaj odabranih fenolnih jedinjenja u PDO određen je na osnovu standardne kalibracione krive koja je konstruisana kao funkcija logaritma površine pika u zavisnosti od logaritma koncentracije standarda, $\log A = f(\log C)$ komponenti snimljenih iz serije razblaženja miksa standarda koncentracije od 0,0061 do 25,0 μ g/mL.

3.2.1.4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Princip metode se zasniva na osobini flavonoida da grade komplekse sa jonima metala, od kojih je posebno značajan kompleks sa aluminijumom, pri čemu se joni Al^{3+} vezuju za ukupne flavonoide, pa se sumarna apsorbanacija lako određuje. Građenjem metalokompleksa boja rastvora prelazi iz žute u žuto-zelenu, čiji intenzitet se meri spektrofotometrijski. Metoda je prilagođena za izvođenje u mikrotitar pločama, prema protokolu Lesjak i sar. (2011). Pripremljena su razblaženja PDO u 80 % MeOH u opsegu 1–4 mg/mL, dok su finalne koncentracije u reakcionoj smeši bile u opsegu 100–400 μ g/mL. Takođe, za konstruisanje kalibracione krive napravljena su serijska razblaženja kvercetina u opsegu 0,216–12,29 μ g/mL. U bunariće je dodato 90 μ L MeOH, po 6 μ L $AlCl_3$ (0,75 mol/L) i CH_3COONa (1 mol/L), 170 μ L dH_2O i 30 μ L PDO odgovarajuće koncentracije. U korekcije je umesto $AlCl_3$ dodata dH_2O . Ploča je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije merena je apsorbanca na 415 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific). Svi uzorci su testirani u triplikatu. Sa kalibracione krive je očitana koncentracija kvercetina koja odgovara apsorbancijama svake koncentracije nakon oduzimanja apsorbancije korekcije. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta kvercetina po 1 g suvog ekstrakta (mg ekv.kvercetina/g SE) i predstavljeni kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija.

3.2.1.5. Određivanje antioksidativnog potencijala

Za testiranje antioksidativnog potencijala Jc-EU-P i PDO korišćeni su sledeći testovi: DPPH test (za određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala), TBA test (za određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije) i FRAP test (za određivanje redukcionog kapaciteta).

3.2.1.5.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (DPPH test)

Antioksidativni potencijal test supstanci ispitan je DPPH testom prilagođenim za izvođenje u mikrotitar pločama, prema protokolu Orčić i sar. (2011). Princip testa zasniva se na ispitivanju sposobnosti jedinjenja koja ulaze u sastav etarskog ulja i PDO da doniraju vodonikov atom i time neutrališu DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal. To se vizuelno može pratiti kao promena boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog DPPH radikala u redukovanu, žuto obojenu formu DPPH-H. Ukratko, serijom dvostrukih razblaženja napravljen je opseg početnih koncentracija iz kojih se uzimanjem po 10 μL uzorka dobija željena finalna koncentracija test supstanci u reakcionoj smeši (230–1500 $\mu\text{g/mL}$ za ulje i 0,52–66,67 $\mu\text{g/mL}$ za PDO). U ploču je dodato 190 μL MeOH, 10 μL rastvora odgovarajuće koncentracije ulja/PDO i 100 μL rastvora DPPH reagensa pripremljenog u MeOH (67,2 $\mu\text{mol/L}$). Negativna kontrola je umesto ulja/PDO sadržala 10 μL MeOH, a korekcija umesto DPPH reagensa 100 μL MeOH. Kao pozitivna kontrola korišćen je sintetski antioksidans – butilhidroksitoluen (BHT). Svi uzorci i kontrole su rađeni u triplikatu. Nakon 60 min inkubacije na sobnoj temperaturi, očitane su apsorbancije na 515 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific). Za svaku koncentraciju određen je stepen neutralizacije DPPH radikala RSC_{DPPH} [%], prema sledećoj formuli:

$$RSC_{DPPH} [\%] = (1 - (A_{uzorak} - A_{korekcija})/A_{kontrola}) \times 100$$

gde je:

A_{uzorak} - srednja vrednost apsorbancije za datu koncentraciju

$A_{korekcija}$ - apsorbancija korekcije za datu koncentraciju

$A_{kontrola}$ - srednja vrednost apsorbancije kontrole

Konstruisane su krive zavisnosti RSC_{DPPH} od koncentracije ulja/PDO u finalnoj reakcionoj smeši pomoću Origin 8.0 softvera (OriginLab, USA) i očitana je IC_{50} vrednost kao koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do neutralizacije 50 % DPPH radikala. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija ($\mu\text{g/mL}$, $\mu\text{L/mL}$).

3.2.1.5.2. Određivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije (TBA test)

Za ispitivanje stepena lipidne peroksidacije (LP) korišćen je TBA test izveden prema protokolu Mitić-Čulafić i sar. (2009). Metoda se zasniva na merenju intenziteta obojenosti kompleksa nastalog reakcijom malonildialdehida (MDA), krajnjeg produkta LP, i tiobarbiturne kiseline (TBA). U testu su korišćeni komercijalno pripremljeni lipozomi (L- α -fosfatidilholin) kao model biološke membrane, dok su radikalske reakcije LP inicirane Fe^{2+} /askorbatom. Za potrebe našeg istraživanja testiran je opseg radnih koncentracija: 14–1800 $\mu\text{g/mL}$ za etarsko ulje, odnosno 5–640 $\mu\text{g/mL}$ za PDO. Bilo je potrebno napraviti veće stokove, iz kojih se uzimanjem 10 μL uzorka dobijala željena koncentracija. Na 2900 μL fosfatnog pufera (0,067 mol/L, pH 7,4) dodato je 60 μL suspenzije lipozoma (pripremljene u vodi u odnosu 1:10, lipozom:voda), 20 μL ulja/PDO odgovarajuće koncentracije, 20 μL FeSO_4 (0,075 mol/L) i 20 μL askorbinske kiseline (0,34 mol/L). U kontrolu je umesto test supstance dodat rastvarač (DMSO ili dH_2O) a u korekcije umesto lipozoma fosfatni pufer. Nakon inkubacije od 60 min na 37 $^{\circ}\text{C}$ u sve je dodato 0,2 mL EDTA (0,1 mol/L) i 2 mL TBA reagensa. Reakcione smeše su zagrevane 15 min na 100 $^{\circ}\text{C}$, ohlađene i centrifugirane na 3700 rpm tokom 10 min, a količina MDA je određena merenjem apsorbance nastalog produkta na 532 nm (UV-630 pc Double Beam Spectrophotometer, MRC Scientific instruments, Holon, Israel). Kao pozitivna kontrola korišćen je standardni antioksidans BHT. Svi

uzorci i kontrole rađeni su u triplikatu. Za svaku koncentraciju ulja/PDO određen je stepen inhibicije lipidne peroksidacije I [%] prema sledećoj formuli:

$$I [\%] = (1 - (A_{\text{uzorak}} - A_{\text{korekcija}})/A_{\text{kontrola}}) \times 100$$

gde je:

A_{uzorak} - srednja vrednost apsorbancije za datu koncentraciju

$A_{\text{korekcija}}$ - apsorbancija korekcije za datu koncentraciju

A_{kontrola} - srednja vrednost apsorbancije kontrole

Konstruisane su krive zavisnosti I od koncentracije ulja/PDO u finalnoj reakcionoj smeši pomoću Origin 8.0 softvera (OriginLab, USA), a zatim pomoću jednačine linearne regresije izračunate IC_{50} vrednosti, tj. koncentracije koje su dovodile do 50 % inhibicije LP. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri određene IC_{50} vrednosti \pm standardna devijacija (mg/mL, μ L/mL).

3.2.1.5.3. Određivanje redukcionog kapaciteta (FRAP test)

Određivanje redukcionog kapaciteta PDO izveden je prema protokolu Orčić i sar. (2011). Redukcioni kapacitet se određuje nespecifičnom redukcijom Fe^{3+} -TPTZ kompleksa (TPTZ = 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin) do intenzivno plavog Fe^{2+} -TPTZ, čiji je apsorpcioni maksimum na 593 nm. Pripremljene su početne koncentracije u 80 % MeOH (0,25–1 mg/mL), dok su finalne koncentracije testirane u opsegu 8–32 μ g/mL. U mikrotitar ploče je dodato 300 μ L sveže pripremljenog FRAP reagensa (dobijenog mešanjem 0,3 mol/LpH 3,6 acetatnog pufera, 10 mmol/L rastvora TPTZ u 40 mmol/L HCl, i 20 mmol/L vodenog rastvora $FeCl_3$) i 10 μ L PDO odgovarajuće koncentracije. U korekcije je umesto FRAP reagensa dodata dH_2O . Sve koncentracije su urađene u triplikatu. Za konstruisanje kalibracione krive napravljena je serija razblaženja askorbinske kiseline u opsegu 0,083–9,065 μ g/mL. Svi uzorci su inkubirani 6 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, apsorbancija je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 593 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific). Sa kalibracione krive su očitane koncentracije askorbinske kiseline koje odgovaraju apsorbancijama svake testirane koncentracije PDO određenim nakon oduzimanja apsorbancije korekcije. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata askorbinske kiseline po 1 g suvog ekstrakta (mg ekv. askorbinske kis./g SE) i predstavljeni kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija.

3.2.2. Detekcija antimikrobnog potencijala

3.2.2.1. Gajenje mikroorganizama

Bakterijski sojevi su čuvani u staklenim vaflicama, zasejani u duboki agar (čvrst medijum za stokiranje) ili u glicerolu na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (u ependorfici 0,42 mL 87 % glicerola i 0,58 mL prekoćne kulture bakterija). Za potrebe ovih istraživanja, čiste kulture bakterija i *C. albicans* su održavane u vidu išaranih ploča, koje su presejavane periodično, u pravilnim vremenskim intervalima na oko mesec dana. Taj postupak je obuhvatao zasejavanje pojedinačnih kolonija sa odgovarajućih išaranih ploča u 2 mL hranljivog medijuma u duplikatu. Zasejane kulture, zajedno sa kontrolom sterilnosti (odgovarajući medijum, pH 7) inkubirane su u odgovarajućim uslovima. U Tabeli 7. dat je pregled korištenih medijuma za svaki soj, odgovarajući uslovi gajenja, kao i test supstance koje su na svakom od sojeva primenjene.

Tabela 7. Korišćeni medijumi i uslovi gajenja bakterija i kvasnice

Test organizam		Korišćeni medijum			
Mikroorganizmi	Oznaka soja/poreklo	Tečni	Čvrsti	Gajenje	Test supstance
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	MHB	MHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-P, PDO, Str, Amp, Azm i Rif
MRSA	ATCC 43300	MHB	MHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-P, PDO, Str, Amp, Azm i Rif
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	BHI	BHA	48 h na 37 °C	Jc-EU-P, PDO, Str, Amp, Azm i Rif
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	MHB	MHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-P, PDO, Str, Amp, Azm i Rif
<i>S. flexneri</i>	ATCC 9199	MHB	MHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-P, PDO, Str, Amp, Azm i Rif
<i>S. enteritidis</i>	ATCC 13076	MHB	MHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-P, PDO, Str, Amp, Azm i Rif
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 15442	MHB	MHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-P, PDO, Str, Amp, Azm i Rif
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19111	BHI	BHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-P, Jc-EU-K, Sm-EU, PDO, Str, Amp, Azm i Rif
<i>L. monocytogenes</i>	LMB/izolat sa trupa govečeta	BHI	BHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-K, Sm-EU
<i>L. monocytogenes</i>	LMS/izolat sa površine lososa	BHI	BHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-K, Sm-EU
<i>L. monocytogenes</i>	LMT/izolat iz tunela za odvodnjavanje klanice	BHI	BHA	24 h na 37 °C	Jc-EU-K, Sm-EU
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	TSB	TSA	48 h na 30 °C	Jc-EU-P, PDO, Bif, Nst, Kkz

Mikromicete (rodovi *Aspegillus*, *Trichoderma* i *Penicillium*) su gajene na MA podlozi, u periodu od 21 dan, na sobnoj temperaturi. Inokulum je pripremljen spiranjem spora sa površine medijuma kultura koje su bile stare sedam dana i to sterilnim fiziološkim rastvorom (0,85 % NaCl) koji je sadržao 0,1 % Tween 20 (vol/vol). Suspenzija spora svakog test organizma je dovedena do finalne koncentracije od $1,0 \times 10^5$ spora/mL, upotrebom hemocitometra tamnog polja (Reichert, Warner-Lambert Technologies). Tako pripremljen inokulum je čuvan na -20 °C do upotrebe. Radi provere validnosti inokuluma, kao i odsustva kontaminacije, vršena je inokulacija na čvrstu podlogu MA.

3.2.2.2. Priprema inokuluma mikroorganizama za mikrodilucione eseje

Za potrebe mikrodilucionih testova (MIK test, *Checkerboard* test) pojedinačne kolonije bakterija/*C. albicans* su zasejane u 30 mL odgovarajućeg medijuma (videti Tabelu 7) i inkubirane uz aeraciju (37 °C i 185 rpm). Bakterije/kvasnica se gaje dok suspenzija ne dostigne ciljni OD₆₀₀, koji na osnovu kalibracionih kriva daje odgovarajući broj ćelija (Tabela 8, preuzeto iz Kolarević i sar., 2016). Rast bakterija je praćen merenjem optičke gustine (OD₆₀₀) pomoću spektrofotometra (UV-630 *pc Double Beam Spectrophotometer*, MRC *Scientific instruments*, Holon, Israel). Nakon dostizanja odgovarajuće brojnosti, kulture bakterija/*C. albicans* su centrifugirane 10 min na 4000 rpm, a zatim resuspendovane u istom volumenu 0,01M MgSO₄. Dobijena suspenzija ćelija je zatim razblažena do finalne koncentracije 10⁶ CFU/mL.

Tabela 8. Vrednosti OD₆₀₀ koje odgovaraju broju bakterija/*C. albicans* (ekspozicijalna faza)

Sojevi bakterija	OD ₆₀₀	CFU/mL
<i>S. aureus</i> 25923	0,3	2,3 x 10 ⁸
MRSA 43300	0,3	2,3 x 10 ⁸
<i>E. faecalis</i> 29212	0,2	2,5 x 10 ⁸
<i>E. coli</i> 8739	0,3	1,2 x 10 ⁸
<i>S. flexneri</i> 9199	0,2	2,6 x 10 ⁸
<i>S. enteritidis</i> 13076	0,3	1,5 x 10 ⁸
<i>P. aeruginosa</i> 15442	0,4	1,7 x 10 ⁸
<i>L. monocytogenes</i> 19111	0,1	1,3 x 10 ⁸
<i>C. albicans</i> 10231	0,4	1,5 x 10 ⁷

Kulture ostalih mikromiceta za mikrodilucione eseje su pripremane spiranjem spora sa površine kultura izraslih na hranljivim medijumima primenom sterilnog fiziološkog rastvora (0,85 % NaCl) sa dodatkom 0,1 % Tween 20 (v/v). Korišćenjem hemocitometra tamnog polja određena je koncentracija spora (konidija) u suspenziji. Spore su brojane na površini od 1 mm², a zatim je broj spora u suspenzijama, prema uputstvu proizvođača određen prema formuli:

$$\text{Broj spora /mL} = n \times \text{razblaženje} \times 10^4$$

Gde je n – broj spora na površini od 1 mm²

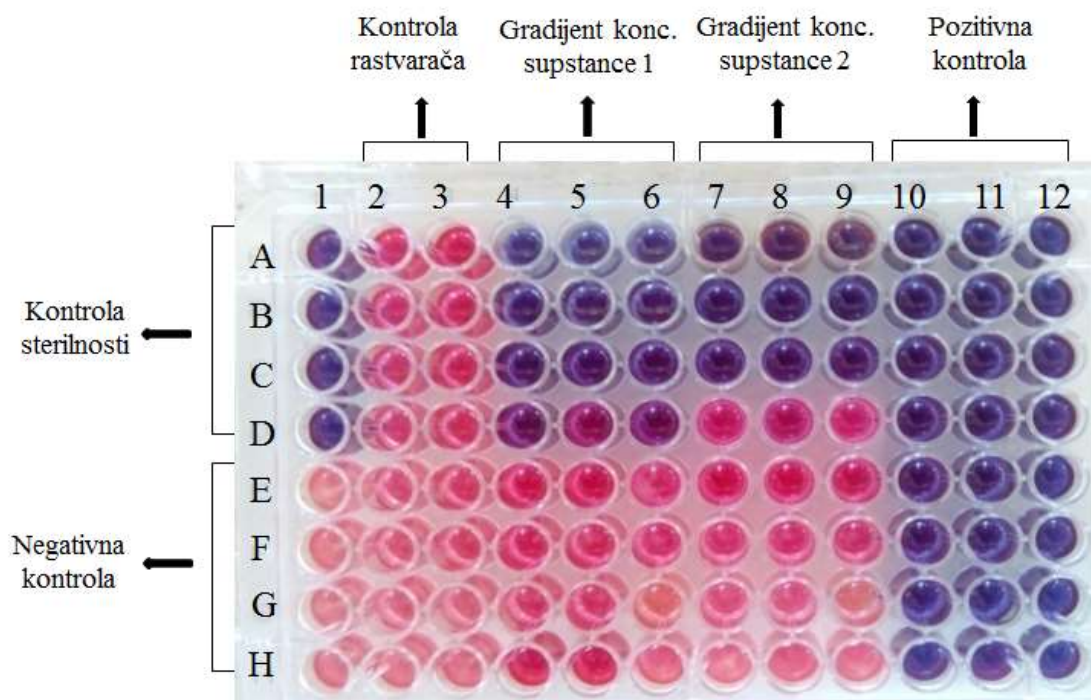
Na osnovu podatka o brojnosti spora, računat je volumen suspenzije koji je potrebno dodati u bunariće, kako bi njihova finalna koncentracija bila 10⁵ spora/mL.

3.2.2.3. MIK test

Za testiranje aktivnosti prema bakterijama/kvasnici *C. albicans*, u mikrotitarskim pločama ravnog dna sa 96 bunarića (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka) pravljen su serije dvostrukih razblaženja test supstanci u odgovarajućem medijumu, ukupnog volumena 200 µL (Nikolić i sar., 2019). Gradijent svake test supstance je pripreman u vertikalnim kolonama mikrotitarske ploče, tako što se u prvi bunarić dodaje 160 µL odgovarajućeg medijuma i 40 µL supstance a u ostale bunariće od B-G po 100 µL medijuma. Iz prvog bunara se 100 µL prebacuje u drugi, iz drugog u treći i tako do poslednjeg bunara (H), iz koga se izbacuje 100 µL volumena. Nakon svakog prebacivanja, sadržaj u bunaru se meša nastavkom, a nastavak se menja pre sledećeg prebacivanja. Nakon napravljenog gradijenta koncentracije ispitivane test supstance u svaki bunar se dodaje po 80 µL MHB i 20 µL suspenzije mikroorganizama (finalna koncentracija 10⁵ CFU/mL).

Osim test supstanci biljnog porekla (etarska ulja i PDO, testiran je i efekat antibiotika str, amp, azm i rif), koji su korišćeni kao pozitivne kontrole, a čiji su gradijenti koncentracija takođe pripremani duž kolona ploče. U slučaju *C. albicans*, kao pozitivna kontrola korišćen je nst. U svakoj ploči, pored kolona sa ispitivanim test supstancama i pozitivnim kontrolama, nalazi se blank (kontrola sterilnosti, 4 bunarića), negativna kontrola (kontrola rasta mikroorganizama, 4 bunarića), kao i kontrola rastvarača (DMSO za ulja, azm i nst, MeOH za rif). Nakon pripreme gradijenata i dodavanja inokuluma mikroorganizama, na kraju je dodato i 22 µL vodenog rastvora resazurina u sve bunariće (finalna koncentracija 0,067 mg/mL). Ploče su zamotane parafilmom i inkubirane na odgovarajući način (Tabela 7). Nakon inkubacije, rast je praćen vizuelno, na osnovu promene boje indikatora. Naime, promena boje iz ljubičaste u ružičastu ukazivala je na pojavu rasta u bunarima, a odsustvo na inhibiciju rasta (Slika 7). Pri tome, najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta mikroorganizama označavana je za minimalnu inhibitornu koncentraciju (eng. *Minimum Inhibitory Concentration*, MIK). U daljem postupku, vrednosti minimalnih baktericidnih/fungicidnih

koncentracija (eng. *Minimum Bactericidal/Fungicidal Concentration*, MBK/MFK) određivane su presejavanjem sadržaja iz bunarića u kojima nije došlo do promene boje indikatora (nije bilo rasta), sterilnom ezom, na odgovarajuće čvrste podloge, koje su zatim inkubirane u odgovarajućim uslovima (Tabela 7). Nakon inkubacije posmatran je izostanak ili prisustvo rasta na podlozi: najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta označavana je kao MBK/MFK.



Slika 7. Mikrotitar ploča: MIK test

Primenom ovog testa ispitan je efekat Jc-EU-P, PDO i antibiotika na odabranim sojevima bakterija i kvasnici *C. albicans*, a svaka test supstanca je ispitivana u opsegu sledećih koncentracija: ulje je testirano u opsegu koncentracija 0,39 - 50 mg/mL, PDO u opsegu 0,195 - 25 mg/mL, a antibiotici u opsegu koncentracija 100 - 0,78 µg/mL. Pored toga, ispitan je i efekat komercijalno nabavljenih ulja Jc-EU-K i Sm-EU, ali samo prema sojevima *L. monocytogenes* – referentnom i primoizolatima iz hrane/objekata za njenu preradu, i to u opsegu koncentracija 4 - 0,03 % (1 % Jc-EU-K odgovara koncentraciji 9,2 mg/mL, a Sm-EU odgovara 8,6 mg/mL). Podaci o mikroorganizmima koji su testirani, podlogama koje su korišćene za inkubaciju mikrotitarskih ploča i medijuma korišćenih za određivanje MBK vrednosti, uslovima inkubacije (dužini i temperaturi gajenja), kao i test-supstancama koje su primenjene na svaki pojedinačni test organizam, su zbirno predstavljeni u Tabeli 7.

Mikrodiluciona metoda, sa odgovarajućim modifikacijama, bila je primenjena i za testiranje antifungalnog potencijala test supstanci prema ostalim mikromicetama. Modifikacije, u odnosu na gore opisani protokol su sledeće:

- Gradijenti koncentracija test supstanci su pripremani u odgovarajućem medijumu, koji smo koristili za gajenje mikromiceta, a to je bio MB.
- Testiran je efekat Jc-EU-P i PDO, u opsegu koncentracija 0,39 - 50 mg/mL, odnosno 0,007 - 0,9 mg/mL. Kao pozitivne kontrole korišćeni su konvencionalni fungicidi bif i kkz, testirani u seriji dvostrukih razblaženja u koncentracionom opsegu 0,004 – 0,512 mg/mL.
- Testiran je i gradijent koncentracija korišćenih rastvarača i to DMSO za ulje i bif, MeOH za kkz.

- Zasejane mikrotitarske ploče su inkubirane 72 h na 28 °C, a nakon toga je rast proveravan binokularnom lupom. Najmanja koncentracija na kojoj je rast odsustvovao proglašavana je za MIK.
- Za određivanje MFK izvršeno je reinokulisanje po 2 µL iz svih bunarića u kojima nije bilo rasta u 100 µL odgovarajućeg tečnog medijuma (MB), pripremljenog u novoj mikrotitarskoj ploči. Nakon inkubacije (72 h na 28 °C) praćena je pojava rasta, i najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta označena je kao MFK.

Svi testovi su urađeni u triplikatu, u tri individualna eksperimenta.

3.2.2.4. Checkerboard test

Metoda šahovske table (eng. *Checkerboard assay*) primenjena je za određivanje MIK vrednosti binarnih kombinacija i utvrđivanje tipa interakcije test supstanci u njima. To je varijanta mikrodilucione metode koja se izvodi u pločama sa 96 bunarića, ali se prave gradijenti koncentracija obe supstance: jedne po vertikali (duž kolona), a druge po horizontali (duž redova ploče). Princip pripreme serije dvostrukih razblaženja duž kolone je isti kao i u MIK testu, dok se gradijent druge, čije se koncentracije menjaju duž redova, priprema u ependorficama. Po pravilu, testiraju se kombinacije agenasa koje su pripremljene u opsegu koncentracija 1/64xMIK – 2xMIK. Shema punjenja mikrotitarske ploče je prikazana na Slici 8.

Nakon pripreme različitih kombinacija test supstanci u medijumu ukupnog volumena 180 µL, po 20 µL suspenzije mikroorganizama (10^6 CFU/mL) je dodato u svaki bunarić (osim u blank), kako bi se dobila finalna koncentracija inokuluma 10^5 CFU/mL. Nakon toga, ukupan volumen u svakom bunariću bio je 200 µL. Na kraju je u svaki dodato 22 µL resazurina, a ploče su zamotane parafilmom i inkubirane na odgovarajući način (uslovi gajenja su opisani u poglavlju 3.2.2.1).

Nakon inkubacije rezultati su vizuelno očitani: za svaku koncentraciju jedne test supstance određena je najmanja koncentracija druge koja ne dovodi do promene boje i ona je označena kao MIK vrednost kombinacije. Tako dobijene MIK vrednosti kombinacija, zajedno sa MIK vrednostima pojedinačnih supstanci, korišćene su za određivanje indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (FIC indeksa, FIC_i) i analizu tipa interakcije između antimikrobnih agenasa (Mulyaningsih i sar., 2010). FIC indeks (FIC_i) za svaku kombinaciju antimikrobnih agenasa računat je prema sledećim formulama:

$$FIC \text{ antimikrobnog agensa } A = \frac{MIK \text{ agensa } A \text{ u kombinaciji}}{MIK \text{ samog agensa } A}$$

$$FIC \text{ antimikrobnog agensa } B = \frac{MIK \text{ agensa } B \text{ u kombinaciji}}{MIK \text{ samog agensa } B}$$

$$FIC_i = FIC \text{ agensa } A + FIC \text{ agensa } B$$

Dobijene vrednosti FIC_i su interpretirane na sledeći način:

- Sinergistički efekat agenasa $FIC_i \leq 0,5$;
- Aditivan efekat agenasa $0,5 < FIC_i \leq 1,0$;
- Indiferentan efekat agenasa $1,0 < FIC_i \leq 4,0$;
- Antagonistički efekat agenasa $FIC_i > 4,0$;

Antibiotik (A) ↓			Etarsko ulje ili PDO (oznaka E) →								
Blank	Gradijent A (max=2xMIK)	Gradijent ulja/PDO (max=2xMIK)	E=2xMIK A=2xMIK	E=1x MIK	E=1/2x MIK	E=1/4x MIK	E=1/8x MIK	E=1/16x MIK	E=1/32x MIK	E=1/64x MIK	DMSO* gradijent
			A=1x MIK								
			A=1/2x MIK								
			A=1/4x MIK								
Kontrola			A=1/8x MIK								
			A=1/16x MIK								
			A=1/32x MIK								
			A=1/64x MIK								

Slika 8. Shema *Checkerboard* testa za ispitivanje sinergizma

Metoda šahovske table je primenjena za ispitivanje efekta kombinacija biljnih derivata (Jc-EU-P, Jc-EU-K, PDO) sa odabranim agensima, i to: derivati *J. communis* var. *saxatilis* Jc-EU-P i PDO su kombinovani sa antibioticima (str, amp, azm) i konvencionalnim antimikotikom bif, dok je komercijalno nabavljeno ulje kleke Jc-EU-K kombinovano sa uljem satureje *Sm*-EU. Metoda je primenjena na sojevima koji su odabrani na osnovu prethodno dobijenih rezultata MIK testa (sojevi koji su bili najosetljiviji na testirane agense). Za ispitivanje kombinacija sa konvencionalnim antibioticima/antimikoticima odabrani su referentni sojevi *L. monocytogenes* i *C. albicans*, dok je kombinacija komercijalno nabavljenih ulja (Jc-EU-K i *Sm*-EU) testirana prema odabranim sojevima *L. monocytogenes* (referentnom ATCC 19111, i primoizolatima LMB, LMS i LMT).

Zbog problema rastvorljivosti test supstanci i posledične visoke koncentracije rastvarača koja bi bila postignuta u bunarićima, opseg testiranih koncentracija nije uvek bio kao gore naveden, već je bilo neophodno najviše testirane koncentracije u pojedinim slučajevima smanjiti. Tako su sva ulja testirana u opsegu 1/64 x MIC - 2 x MIC, dok je PDO u kombinacijama testiranim na bakterijama bio 1/32 x MIC - 4 x MIC, odnosno 1/64 x MIC - 1 x MIC u slučaju *C. albicans*.

3.2.2.5. Ispitivanje vremenski zavisne inhibicije rasta test supstancama *in vitro*

Primenom *Time-kill* testa praćena je dinamika preživljavanja bakterijskih sojeva u prisustvu odabranih test supstanci i njihovih kombinacija. Promena brojnosti bakterija tokom perioda inkubacije praćena je u četiri suda paralelno: čist medijum (negativna kontrola), medijum sa dodatkom jedne ili druge test supstance, kao i sa njihovom kombinacijom. Medijumi su bili inokulisani indikatorskim sojevima u finalnoj koncentraciji od 5 log CFU/mL, odnosno 10⁵ CFU/mL, a zatim inkubirani 32 h na 37 °C. Uzorkovanje je vršeno periodično na svaka 4h (osim tokom noći), tj. u intervalima 0, 4, 8, 12, 24, 28 i 32 h. Pravljeni su odgovarajuća razblaženja u 1xPBS, a zatim utrljana na odgovarajući medijum, u cilju određivanja brojnosti u svakoj vremenskoj tački uzorkovanja i zatim konstrukcije kriva inhibicije rasta (grafičkog prikaza dinamike odumiranja populacija u funkciji vremena, u prisustvu i odsustvu test supstanci). Nakon inkubacije, prebrojane su kolonije i određena srednja vrednost. Broj bakterija je izračunat za svaki uzorak (CFU/mL), a zatim je taj broj izražen prirodnim log sa osnovom 10 sa odgovarajućom standardnom devijacijom (srednja vrednost ± standardna devijacija). Vrednosti log₁₀ CFU/mL određene u različitim vremenima uzorkovanja iskorišćene su za procenu tipa interakcije test supstanci, tj. potvrdu sinergizma utvrđenog prethodnim testom (metodom šahovske table). Naime, interakcija se smatrala sinergističkom i efikasnom ukoliko je nakon 24 h inkubacije početni broj

bakterija u prisustvu kombinacije agenasa bio manji za minimum $2 \log_{10}$ od broja dobijenog pojedinačnom primenom efikasnijeg agensa (Mulyaningsih i sar., 2010).

Dodatno, u *Time kill* testu određen je tzv. dinamički MIK, ili MIK vrednost kriva rasta, (cMIK, eng. *curve MIK*), po modelu objašnjenom u Foerster i sar. (2016), ali uz određene modifikacije. Prvo su određene stope rasta za svaku eksperimentalnu varijantu (u odsustvu test supstance, kao i u prisustvu rastućih koncentracija svake pojedinačno dodate test supstance). Stopa rasta (konstanta brzine rasta, n) praćena je u prisustvu različitih koncentracija svake test supstance tokom 12 h inkubacije, kako bi se izbegla mogućnost ulaska bakterija u stacionarnu fazu rasta. Konstanta brzine rasta računata je prema jednačini koja opisuje logaritamski rast bakterijske populacije:

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{t * \log 2}$$

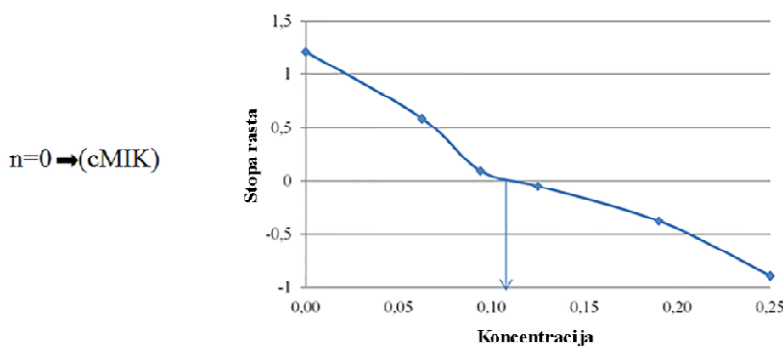
Gde je:

t = određeno vreme inkubacije

N_0 = broj ćelija na početku određenog vremenskog intervala

N_t = broj ćelija na kraju određenog vremenskog intervala

Kada su konstruisane krive zavisnosti stopi rasta bakterija u funkciji primenjenih koncentracija test supstance, sa grafika je očitana cMIK, koja predstavlja onu dozu/koncentraciju, pri kojoj je $n=0$, tj. nema promene brojnosti populacije (nema rasta populacije: $n>0$, niti odumiranja populacije: $n<0$), tj. to je minimalna koncentracija koja inhibira rast populacije (Slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz određivanja cMIK

Time-kill test primenjen je za ispitivanje inhibitornog potencijala etarskih ulja Jc-EU-K i Sm-EU i to na odabranim bakterijskim sojevima (*L. monocytogenes* ATCC 19111 soja i LMB izolata). Imajući ovo u vidu, tečni medijum korišćen za inkubaciju bio je BHI (finalna zapremina kulture čiji je rast praćen u funkciji vremena iznosila je 30 mL), a za određivanje broja CFU/mL vršeno je zasejavanje na selektivnu podlogu za *L. monocytogenes* (LDAB), a zatim su bakterije inkubirane 24 h na 37 °C.

Ulja su primenjena u različitim koncentracijama, pojedinačno ili u kombinaciji. Opseg testiranih koncentracija određen je na osnovu rezultata prethodno primenjenog *Checkerboard* testa. Naime, testirani su: kombinacija ulja koja je sadržala Jc-EU-K i Sm-EU koja je u metodi šahovske table određena kao inhibitorna, kao i svako od ulja pojedinačno, primenjeno u istim koncentracijama. Pored ovih inhibitornih koncentracija/kombinacija, ispitan je i efekat kombinacija sub-inhibitornih koncentracija (odnos test supstanci je bio isti kao i u inhibitornoj kombinaciji, ali su koncentracije bile manje od navedenih). Svi *in vitro Time-kill* testovi su urađeni u duplikatu, u tri individualna eksperimenta.

3.2.2.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti prirodnih proizvoda *in situ*

U eksperimentima *in situ*, ispitan je antimikrobni efekat test supstanci u odabranom modelu hrane, tj. na junećem mesu (Vasilijević i sar., 2019). Za testiranje su odabrani agensi Jc-EU-K i Sm-EU, a ispitan je njihov pojedinačni i kombinovani antibakterijski efekat prema bakterijama - kontaminantima hrane. Praćen je efekat na rast inokulisane *L. monocytogenes* i to referentnog soja (ATCC 19111) posebno, a posebno LMB izolata. Paralelno sa tim, praćen je i efekat na rast ukupnog broja aerobnih heterotrofnih mezofilnih bakterija (AHMB), bakterija familije Enterobacteriaceae (ENT), kao i bakterija mlečne kiseline (BMK), koje su bile prisutne na uzorcima mesa (deo prirodne mikroflore).

3.2.2.6.1. Priprema mesa i inokulacija bakterijama *L. monocytogenes*

Sveže juneće meso, nabavljeno u lokalnom marketu, je u frižideru preneseno do laboratorije, gde je pripremljeno na odgovarajući način. Priprema mesa za eksperiment podrazumevala je čišćenje od masnog i vezivnog tkiva i tranžiranje na komadiće težine ~ 8g, za šta su korišćene sterilne makaze. Komadići su dalje vagani i odlagani na unapred obeležena mesta na sterilnoj Petri šolji. Neophodno je bilo zabeležiti masu svakog komadića zbog pravilne inokulacije. Priprema prekonoćne kulture *L. monocytogenes* vršena je zasejavanjem pojedinačne kolonije u epruvetu sa BHI medijumom, koja je inkubirana 24 h na 37 °C. Prekonoćna kultura je razblažena 20x i gajena do određene optičke gustine (OD₆₀₀ 0,1 odgovara broju ćelija 1,3x10⁸ CFU/mL, tj. eksponencijalnoj fazi rasta). Bakterije su centrifugirane dva puta (10min/4000 rpm) i resuspendovane u 1xPBS, a broj bakterija je podešen na ~1x10⁷ CFU/mL, što je potvrđeno zasejavanjem razblaženja 10⁻⁴ na selektivnu podlogu za *L. monocytogenes* (LDAB). Inokulacija je vršena sa odgovarajućim zapreminama, kako bi broj dodatih bakterija bio ~1x10⁵ CFU/g⁴. Po inokulaciji, komadići mesa su ostavljani u laminaru 15 min, na sobnoj temperaturi, kako bi se inokulisane bakterije adsorbovale za površinu mesa.

3.2.2.6.2. Mariniranje

Vinske marinade (VM) zajedno sa negativnom kontrolom (8,5 g/L rastvor kuhinjske soli, NaCl) pripremljene su u obeleženim sterilnim erlenmajerima 2 h pre upotrebe. Marinade su bile odložene u laminar do upotrebe, sa povremenim laganim mućkanjem, kako bi se so rastvorila i bila omogućena hidratacija čvrstih komponenti (začina). U svaku VM ubačeni su komadići mesa, (po jedan za svaki dan uzorkovanja – ukupno devet), uz periodično mešanje sterilnim štapićem čime se postiže bolji raspored čvrstih komponenti po površini mesa. Proces mariniranja izvršen je tokom 24 h na 4 °C. Po isteku vremena svi uzorci su izvađeni, a zatim sušeni u otvorenim Petri šoljama sa obe strane (u sterilnim uslovima, tj. u laminaru). Uzorci su zatim čuvani ("inkubirani") tokom 15 dana, takođe u frižideru na 4 °C.

3.2.2.6.3. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka analiza obuhvatila je periodično uzorkovanje i određivanje broja bakterija *L. monocytogenes* i bakterija iz grupa AHMB, ENT i BMK. Uzorci su analizirani dan pre mariniranja (dan -1), kako bi se utvrdio sastav prirodne mikroflore pre inokulacije listerijom), odmah nakon procesa mariniranja (dan nulti, 0), nakon 24 h (dan prvi, 1) a zatim na svaka dva dana do kraja perioda skladištenja na 4 °C (dan petnaesti).

Svakog dana uzorkovanja, bilo je neophodno da se meso još jednom izvaga i homogenizuje sa odgovarajućom zapreminom 0,1% peptonske vode (prebacivanje bakterija u tečnu fazu). Naime, dodavan je volumen tečnosti 9x veći od težine komadića mesa, te je na ovaj način broj bakterija bio razblažen 1:10 (razblaženje 10⁻¹). Uz intenzivno mućkanje od dva minuta u sterilnim erlenmajerima, bakterije su prebačene u tečnu fazu, a zatim su napravljene serije decimalnih razblaženja. Zasejavanje je vršeno na odgovarajuće podloge u triplikatu: LDAB za *L.*

⁴ Primer za inokulaciju: 8 g težak komadić - 8 x 10⁵ ćelija = 80 μL bakterijske suspenzije. Inokulaciju vršiti sa 2 x 40 μL, nanetih na obe šire površine komadića; inokulum nanositi automatskom pipetom i utrljati vrhom nastavka. Ostaviti da se osuši.

monocytogenes, LA za ukupan broj AHMB, EMB za ENT i MRS podloga za BMK. Petri šolje su inkubirane 48 h na 37 °C u anaerobnim (za BMK) i aerobnim uslovima (za sve ostale ispitivane grupe). Anaerobni uslovi su bili obezbeđeni uz pomoć aerokulta (20 x 13,5 x 9,5cm) i uz dodavanje rastvora (525 µL 50 % H₃PO₄ + 0,34 g NaHCO₃) kako bismo postigli određeni stepen anaerobije (mikroaerofilni uslovi). Dodatno, na početku eksperimenta (dan - 1, tj. pre inokulacije mesa), određivan je i broj *E. coli* i *Salmonella* spp. kako bi se utvrdilo da li je broj bakterija u skladu sa Pravilnikom o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl.glasnik RS 72/2010). Za *E. coli*, zasejavanje je vršeno na EMB, uz inkubaciju na 44 °C tokom 24 h, dok je određivanje *Salmonella* spp vršeno na SS agru uz inkubaciju na 37 °C tokom 24 h.

3.2.2.6.4. Senzorna analiza prirodnih proizvoda u odabranom matriksu hrane

S obzirom da je analiziran antibakterijski efekat u hrani, bilo je potrebno ispitati i senzorička svojstva, sa ciljem da se odrede senzorno najprihvatljivije varijante mariniranja. Za senzornu analizu korišćen je test skale intenziteta mirisa i ukusa (Giménez i sar., 2012). Ova analiza podrazumevala je merenje razlika intenziteta mirisa i ukusa između uzoraka mariniranih u osnovnoj marinadi (VM, kontrola) i uzoraka mariniranih sa dodatkom ulja: pojedinačno sa Jc-EU-K (VM + J) ili Sm-EU (VM + S), kao i u kombinaciji oba ulja (VM + JS). Testirane su marinade sa dodatkom Jc-EU-K koncentracija 0,125 %, 0,25 % i 0,5 % (VM+J0,125; VM+J0,25 i VM+J0,5), odnosno sa dodatkom Sm-EU koncentracija 0,0625 %, 0,125 % i 0,25 % (VM+S0,0625; VM+S0,125 i VM+S0,25). Ispitane su i marinade sa kombinacijama ulja kleke i čubra, pripremljenim u odnosu koncentracija 2:1, što je izabrano u skladu sa postavkom i rezultatima eksperimenata antibakterijskog efekta ispitanog *in vitro* (vidi poglavlje 3.2.2.4. Ispitivanje vremenski zavisne inhibicije rasta test supstancama – *in vitro* Time-kill test). Odgovarajuće oznake marinada sa kombinacijom ulja bile su (VM+J0,125+S0,0625; VM+J0,25+S0,125; VM+J0,5+S0,25).

Postupak pre analize obuhvatao je sečenje mesa na komadiće približne veličine 2,5 x 2,5 x 1 cm (širina, dužina, debljina), mariniranje mesa tokom 24 h (uslovi mariniranja opisani u poglavlju 3.2.2.5.2. Mariniranje) i pečenje na stonom roštilju (*Philips* HD4417). Uzorci su bili nasumično obeleženi odabranim trocifrenim brojevima. Grupi od osam ocenjivača dodeljeni su uzorci u slučajnom redosledu, (ukupno deset), svaki u duplikatu. Senzorna analiza obavljena je pomoću ocenjivačkog lista, koji je uključivao ocene mirisa i ukusa, kao i ocene defekta ukusa i defekta mirisa. Na listiću za osobine mirisa i ukusa bila je data skala sa ocenama od 1 do 9, pri čemu je ocena 9 označavala maksimalan intenzitet, dok je ocena 1 označavala najslabiji intenzitet⁵. Pri tome je intenzitetima ukusa i mirisa kontrole (meso marinirano u čistoj vinskoj marinadi VM, bez dodatka ulja) data arbitrarna ocena 5. Uzorci koji su bili ocenjeni između 3 i 7 bili su senzorno prihvatljivi i uporedivi sa kontrolnim. Dodatno, defekti ukusa i mirisa, ukoliko ih je bilo, bili su ocenjeni pomoću skale intenziteta sa ocenama od 5 do 9 (5- kontrola; 9- najintenzivniji defekt)⁶. Između svakog ocenjivanja, ispitanici su koristili tost hleb i vodu kako bi neutralisali ukus prethodnog uzorka. Celokupan eksperiment senzorne analize vršen je dva nezavisna puta.

⁵ (1- najslabiji intenzitet; 2- dosta slabiji intenzitet; 3- slab intenzitet; 4- nešto slabiji intenzitet; 5- intenzitet kontrole; 6- nešto jači intenzitet; 7- jak intenzitet; 8- veoma jak intenzitet; 9- najjači intenzitet)

⁶ (5- kontrola; 6- slab defekt; 7- umeren defekt; 8- intenzivan defekt; 9- najintenzivniji defekt)

3.2.3. Metode koje obuhvataju gajenje humanih ćelija u kulturi

3.2.3.1. Odmrzavanje zamrznutih ćelija i njihovo gajenje

Rad sa ćelijama u kulturi obuhvata pripremu ćelijskih suspenzija, krioprezervaciju, odmrzavanje zamrznutih ćelija i njihovo gajenje u hranljivom medijumu za kultivaciju. Procedure za njihovo održavanje su izvedene prema standardnim protokolima koje je opisao Freshney (2005) u laboratorijskom priručniku za ćelijske kulture.

Zamrznute ćelijske suspenzije su čuvane u metalnom kontejneru u gasovitoj fazi tečnog azota na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Radni stokovi su čuvani i na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, u periodu od nekoliko meseci, zbog progresivnog opadanja vijabilnosti ćelija. Ćelije su čuvane u medijumu za zamrzavanje koji sadrži krioprotektivni agens DMSO. Prema planu eksperimenata, ćelijske suspenzije su odmrzavane i dalje gajene. U procesu odmrzavanja, vajlica (1 mL) sa zamrznutom kulturom je otopljena, prebačena u 4 mL medijuma obogaćenog sa 10 % FBS, a zatim centrifugirana 10 min na 1000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant koji sadrži medijum za zamrzavanje i DMSO je uklonjen, a talog resuspendovan u 5 mL kompletnog medijuma za gajenje. Homogena suspenzija je gajena u odgovarajućoj količini hranljivog medijuma u polietilenskim sudovima površine 25-75 cm² (flaskovima) do pojave monosloja. To podrazumeva gajenje ćelijskih kultura do 80 % konfluentnosti, odnosno dok ćelije ne prekriju skoro čitavu površinu za rast u flasku (eksponencijalna faza rasta). Ćelije su gajene u inkubatoru na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u atmosferi sa 5 % CO₂.

Ćelijske kulture su svakodnevno posmatrane na invertnom mikroskopu, radi praćenja opšteg izgleda kulture tokom rasta, morfoloških karakteristika ćelija i u cilju provere kontaminacije mikroorganizmima. Kako su ćelije gajene u optimanoj količini medijuma (dovoljna količina hranljivih materija do formiranja monosloja), pratila se i njegova promena boje i eventualna zamućenost. Žuta boja medijuma je pokazatelj utrošenosti hranljivih materija i promene pH, te je stoga neophodna zamena svežim, dok sumnja na kontaminaciju u slučaju zamućenosti podrazumeva uklanjanje ćelijskih kultura iz procesa dalje kultivacije.

3.2.3.2. Tripsinizacija ćelijskih kultura

Nakon formiranja konfluentnog monosloja, ćelijske kulture su tripsinizirane i dobijene su suspenzije pojedinačnih ćelija korišćene dalje za eksperimente. Preostali manji deo se dalje iznova zasejavao u nove flaskove (pasažiranje) u cilju održavanja ćelijskih kultura. Sa svakim novim presejavanjem broj pasaže ćelijske kulture se povećava, što je od značaja, s obzirom da je za svaku ćelijsku liniju definisan broj pasaža dozvoljen za rad sa njima. Iz flaska sa monoslojem, prvo je odstranjen medijum, a zatim je površina sa ćelijama isprana sa 1xPBS i to laganim pokretima, tzv. „kupanje ćelija“ u trajanju oko 1 min. Nakon ispiranja, rastvor je uklonjen, a sa njim su eliminisani metabolički produkti ćelija i serumski proteini. Dodata je odgovarajuća količina tripsina u zavisnosti od veličine flaska, a zatim se ćelije još jednom ispiraju. Proces se prekida uočavanjem na svetlosti da je sloj počeo da se odlepljuje, a rastvor tripsina da se muti. Višak tripsina je uklonjen, ali je ostavljeno oko 200-300 μL, koliko da pokrije dno flaska. Ravnomernim, ali snažnim pokretima lupkano je po flasku kako bi se ćelije odlepilo, a zatim je pod mlazom dodat svež medijum. Dodatak svežeg medijuma razblažuje tripsin, čime se njegova aktivnost gubi i sprečava oštećivanje ćelija. Ćelije su dobro resuspendovane pomoću pipete i pipetora, u cilju dobijanja suspenzija pojedinačnih ćelija. Njihova koncentracija u suspenziji određivana je brojanjem pomoću hemocitometra.

3.2.3.3. Određivanje broja ćelija bojenjem tripan plavim

Za određivanje broja ćelija korišćen je hemocitometar - Bürker komora, a za procenu njihove vijabilnosti boja tripan-plavo (eng. *Tripan-blue*). Ova boja difunduje kroz oštećenu ćelijsku membranu mrtvih ćelija, koje se pod svetlosnim mikroskopom uočavaju kao obojene. Kod živih ćelija integritet ćelijske membrane je očuvan, što onemogućava prodor boje, pa se one uočavaju kao neobojene. Ukratko, pomešano je 10 μl suspenzije ćelija i 20 μl 0,4 % vodenog rastvora tripan-plavog i ostavljeno par minuta da boja deluje. Nakon toga komora je napunjena ovako tretiranom

ćelijskom suspenzijom, prekrivena pokrovnim staklom i ćelije (žive i mrtve) su prebrojane pod svetlosnim mikroskopom. Brojanje je neophodno završiti za 3 - 5 min, jer duži kontakt sa bojom smanjuje vijabilnost ćelija.

Broj ćelija po mililitru suspenzije računat je prema obrascu:

$$\text{Broj ćelija /mL} = n \times R \times 10^4,$$

gde je n – broj ćelija u svih 16 kvadratića (4 vidna polja x 4); 10^4 – faktor povećanja koji uvodimo jer u polje sa 16 kvadratića staje $0,1 \text{ mm}^3$, odnosno 10^{-4} mL ćelijske suspenzije; R - faktor razblaženja ćelijske suspenzije bojom (na primer R = 3, jer su, ćelije i boja pomešani u odnosu 1: 2).

Ovim postupkom određen je broj živih (nebojene), broj mrtvih ćelija (plavo obojene) i ukupan broj ćelija u suspenziji. Naravno, svi dalji proračuni, izvođeni u cilju zasejavanja odgovarajućeg broja ćelija za eksperimente, ili zamrzavanja odgovarajućeg broja ćelija, uključivali su samo žive ćelije.

3.2.3.4. Krioprezervacija ćelija

Krioprezervacija podrazumeva postupak kojim se ćelije zamrzavaju i dalje čuvaju. Ćelije se gaje do 80 % konfluentnosti, a zatim se tripsinizuju prema opisanoj proceduri, i resuspenduju u 10 mL medijuma za gajenje (medijum + 10 % FBS). Suspenzija ćelija se dalje centrifugira 10 min na 1000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant se odbacuje, a talog sa ćelijama se resuspenduje u 10 mL medijuma za zamrzavanje. Sadržaj se zatim podeli u odgovarajuće kriotube, po 2 mL u svaku. Postupak zamrzavanja ćelija obuhvata prvo hlađenje u frižideru na $4 \text{ }^\circ\text{C}$, zatim skladištenje par sati na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ i na kraju zamrzavanje na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, a narednog dana kriotube sa ćelijama prebacuju se u tečni azot. Broj ćelija koji se preporučuje za zamrzavanje po kriotubi iznosi 5×10^6 .

3.2.3.5. Ispitivanje citotoksične aktivnosti biljnih derivata *in vitro*

Citotoksični efekat biljnih derivata pojedinačno i u kombinaciji sa odabranim citostaticima, ispitan je primenom MTT testa u mikrotitatar pločama korišćenjem 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida (MTT), kao indikatora ćelijske vijabilnosti (Mosmann, 1983). MTT su žute tetrazolijumske soli koje se aktivnošću mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze redukuju u ljubičasto obojeni formazan, što omogućuje procenu metaboličke aktivnosti, a posredno i vijabilnosti ćelija.

Ćelije su zasejane u bunariće (2×10^4 ćel/bunaru) i inkubirane 24 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u prisustvu 5 % CO_2 do formiranja monosloja. Nakon inkubacije medijum je uklonjen, ćelije su pažljivo isprane pomoću 1xPBS, a zatim je svež medijum sa rastućim koncentracijama test supstanci, pojedinačnih ili u kombinaciji, dodat u odgovarajuće bunariće. Nakon toga, ploče su dodatno inkubirane 24 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u prisustvu 5 % CO_2 . Svaka koncentracija urađena je u osam replika, u tri nezavisno ponovljena eksperimenta. U ploči su bile postavljene i odgovarajuće kontrole: kontrola ćelijskog rasta (ćelije sa hranljivim medijumom), kontrola rastvarača (odgovarajuća koncentracija DMSO u hranljivom medijumu) i kontrola sterilnosti. Sterilni medijum je korišćen kao blank za merenje optičke gustine, pri očitavanju rezultata. Nakon tretmana, medijum je uklonjen, a ćelije su pažljivo isprane. U sve bunare, osim blanka, dodato je 20 μL rastvora MTT u 180 μL medijuma (finalna koncentracija 0,5 mg/mL). Ploče su inkubirane tokom 3 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u prisustvu 5 % CO_2 .

Nakon inkubacije, medijum je uklonjen i dodat je DMSO (200 μL), kako bi se kristali formazana rastvorili. Optička gustina je izmerena na 570 nm pomoću ELISA čitača. Na ovaj način, očitani intenzitet ljubičaste boje direktno je bio proporcionalan broju vijabilnih ćelija. Citotoksičnost je procenjena na osnovu procenta preživljavanja ćelija u prisustvu test supstanci, koji je izračunat prema sledećoj formuli:

$$P [\%] = \frac{OD_{570} \text{ test supstanca}}{OD_{570} \text{ kontrola rastvarača}} \times 100$$

Rezultati citotoksičnosti su izraženi preko IC_{50} vrednosti, koncentracije koja smanjuje preživljavanje ćelija za 50 %. Ova vrednost predstavljala je osnovni polazni parametar u daljem eksperimentalnom dizajnu.

Primenom MTT testa ispitan je efekat Jc-EU-P i PDO prema odabranim ćelijskim linijama i to: A549 (adenokarcinom pluća), HT-29 i HCT116 (ćelije kolorektalnog adenokarcinoma) i MRC-5 (normalni fibroblasti pluća), dok su kao pozitivne kontrole korišćeni citostatici DOX (u slučaju MRC-5 i A549) i 5-FU (kod HT-29 i HCT116). Određena je selektivna toksičnost prema kancerskim ćelijama izražena preko selektivnog indeksa (SI_K). SI_K predstavlja odnos IC_{50} vrednosti određenih za zdrave i kancerske ćelije.

$$SI_K = IC_{50} \text{ zdrave ćelije} / IC_{50} \text{ kancerske ćelije}$$

Vrednosti SI_K se interpretiraju na sledeći način:

$SI_K \geq 2$ – selektivna toksičnost jedinjenja;

$SI_K \geq 3$ – visoka selektivna toksičnost jedinjenja (Badisa i sar., 2009; Bézivin i sar., 2003; Demirgan i sar., 2016).

3.2.3.6. Ispitivanje citotoksičnog efekta dva agensa u kombinaciji

MTT test bio je primenjen ne samo za analizu efekta pojedinačnih supstanci, već i njihovih binarnih kombinacija. Naime, isti protokol je bio primenjen, ali su ćelije tretirane kombinacijom dva agensa. Pri tome je koncentracija jednog agensa (derivata biljke, tj. Jc-EU-P ili PDO) varirala u opsegu koncentracija 7,81-62,5 $\mu\text{g/mL}$ za etarsko ulje, odnosno 78-625 $\mu\text{g/mL}$ za PDO, dok je koncentracija konvencionalnog agensa (DOX) bila fiksna, a njena vrednost je za normalne MRC-5 ćelije bila sub-inhibitorna i iznosila 0,312 ili 0,625 $\mu\text{g/mL}$. Slično, u kombinaciji derivata, koncentracija PDO je varirala u opsegu 313-1250 $\mu\text{g/mL}$ dok je koncentracija drugog derivata (Jc-EU-P) bila fiksna i iznosila 15,62 ili 31,25 $\mu\text{g/mL}$. MTT test binarnih kombinacija bio je primenjen na A549 i MRC-5 ćelijama.

3.2.3.6.1. Analiza tipa interakcije test supstanci u binarnim kombinacijama

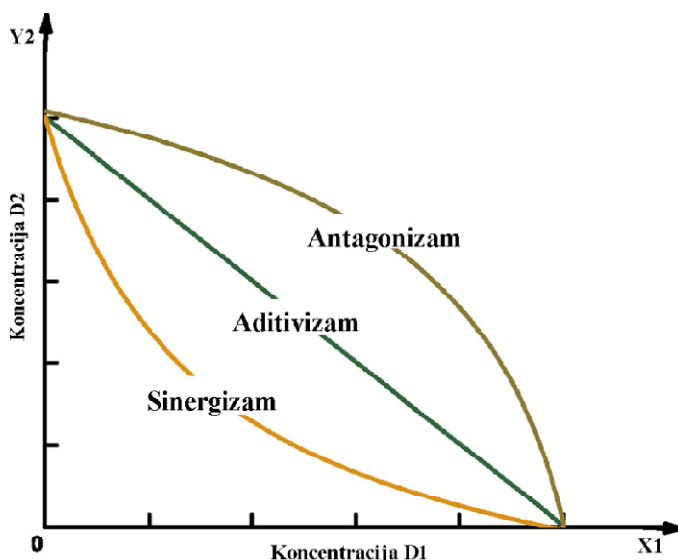
Priroda interakcije dva agenasa u kombinaciji procenjena je pomoću izoblograma i računanjem kombinatornog indeksa (CI) (Zhao i sar., 2004). Analiza pomoću izoblograma predstavlja grafički prikaz efekta dve supstance (D_1 i D_2) u koordinatnom sistemu. Na x i y osi unete su tačke ($x_1, 0$; $0, y_2$) koje odgovaraju koncentracijama koje je svaki agens ostvario pojedinačno (x osa prikazuje vrednosti koncentracija jedne supstance (D_1), a y osa prikazuje koncentracije druge supstance (D_2). Tačke nanete na ose predstavljaju IC_{50} vrednosti svake od supstanci primenjene pojedinačno, a linija koja spaja te dve tačke zove se linija aditivnosti. Koncentracije dve supstance u kombinaciji koje su postigle isti efekat, tj 50 % smrtnosti (IC_{50} vrednost kombinacija dve supstance (D_1D_2)) nalaze se u istom koordinatnom sistemu. Aditivni efekat, sinergizam ili antagonizam su ostvareni kada se tačke (D_1D_2) nalaze na, ispod ili iznad linije aditivnosti (Slika 10).

CI analiza vršena je računanjem numeričke vrednosti CI, za dva agensa primenjena u kombinaciji, a izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$CI = \frac{D1}{Dx1} + \frac{D2}{Dx2}$$

Gde su:

D_1 i D_2 - koncentracije agenasa u kombinaciji potrebne da ostvare 50 % preživljavanja; Dx_1 i Dx_2 - koncentracije oba agensa koji pojedinačno ostvaruju isti efekat (IC_{50} vrednosti pojedinačnih agenasa).



Slika 10. Izobologram analiza (preuzeto iz Li i sar., 2016)

U zavisnosti od vrednosti CI indeksa, interakcija dva agensa primenjena u kombinaciji može se smatrati aditivnim efektom ($CI=1$), sinergizmom ($CI<1$) ili antagonizmom ($CI>1$). Pored kvalitativne informacije o tipu interakcije, CI indeks daje i kvantitativnu informaciju o intenzitetu ostvarenog tipa interakcije. Naime, ukoliko je vrednost bliska vrednosti 1, interakcija je slaba, a što se vrednost više razlikuje od ove granične vrednosti, to je interakcija intenzivnija (ukoliko je vrednost manja, utoliko je sinergizam veći).

Izobologam i CI analize prikazane su za IC_{50} vrednosti koje su supstance ostvarile pojedinačno ili u kombinaciji, a na osnovu rezultata MTT testa.

3.2.3.7. Citometrijska analiza ćelija u kulturi

Parametri ćelijske smrti analizirani su metodom protočne citometrije na aparatu FACS Calibur (*Fluorescence Activated Sorting Cells* - FACS Calibur). Svaka analiza obuhvatala je 10 000 događaja tj. ćelija po pojedinačnom uzorku. Za obradu podataka korišćen je specijalizovani *Cell Quest* kompjuterski softver.

3.2.3.7.1. Priprema suspenzije ćelija

Ćelijske suspenzije pripremljene su prema već opisanom protokolu za gajenje i tripsinizaciju ćelija, uz male modifikacije. Ćelije su zasejane u flaskove sa medijumom, ukupno četiri (od kojih je jedan kontrolni) i inkubirane do formiranja monosloja. Broj ćelija je bio podešen na 3×10^5 ćelija/mL kako bi nakon 24 h inkubacije dostigao 1×10^6 ćelija/mL. Nakon toga medijum je uklonjen, ćelije su isprane sa 1xPBS, dodat im je medijum sa test supstancama, pa su dodatno inkubirane tokom 24 h na 37°C i 5 % CO_2 . Nakon 24 h tretmana (48 h od zasejavanja) ćelije su tripsinizovane i centrifugirane 10 min na 1800 rpm. Supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u 1xPBS (1mL). Ćelije su dalje pripremljene prema dole opisanim protokolima za ispitivanje tipa ćelijske smrti i distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Na ovaj način tretirane su ćelije A549 test supstancama Jc-EU-P ($69,4 \mu\text{g/mL}$) i PDO ($0,3 \text{ mg/mL}$). Izbor ćelijskih linija i testiranih koncentracija izvršen je na osnovu rezultata MTT testa.

3.2.3.7.2. Određivanje tipa ćelijske smrti

Da bi se utvrdio tip ćelijske smrti u kulturi nakon odgovarajućih tretmana, ćelije su bojene sa aneksin V-fluorescein izotiocijanatom (aneksin V-FITC) i propidijum jodidom (PI), a zatim analizirane na protočnom citometru. Aneksin V (kalcijum zavisni fosfolipid-vezujući protein) ima veliki afinitet da se veže za fosfatidilserin, koji se premešta sa unutrašnje na spoljašnju stranu

ćelijske membrane ćelija u apoptozi. Obeležen je fluorescentnom bojom FITC koji nakon pobuđivanja emituje zelenu fluorescencu (fluorescentni signal označen kao FL1). PI ne može da prođe kroz očuvanu ćelijsku membranu, ali u nekrozi dolazi do njenog oštećenja i boja može da uđe u ćeliju i reaguje sa DNK. Fluorescentna boja PI umeće se između nukleotidnih baza dvolančane DNK i nakon pobuđivanja laserskom svetlošću protočnog citometra emituje crvenu fluorescencu (fluorescentni signal označen kao FL2), koja je proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji. Dvostrukim diferencijalnim bojenjem moguće je razlikovati populacije ćelija koje se na dijagramu (eng. *dot plot*) prikazuju u kvadratnoj raspodeli kao: normalne (aneksin⁻/PI⁻), rano apoptotične (aneksin⁺/PI⁻), kasno apoptotične i nekrotične ćelije (aneksin⁺/PI⁺) i ćelijski debri. Ćelijski debri predstavlja veoma kratke fragmente DNK poreklom od dezintegrisanih ćelija koji su obojeni sa PI, ali su oni odvojeni od ćelija u kasnoj apoptozi/nekrozi, usled različite veličine.

Ukratko, za ispitivanje apoptoze, 100 μ L ćelijske suspenzije (1×10^6 ćelija/mL) je prebačeno u odgovarajuće epruvete i dodato je 1 mL 1xPBS. Sadržaj je centrifugiran 10 min na 1800 rpm, i resuspendovan u 100 μ L pufera za vezivanje. U sve epruvete (osim kontrolne) dodato je po 5 μ L anexin V-FITC i PI (20 μ g/mL). Ćelije su blago promućkane, i nakon inkubacije (15 min na 25 °C, u mraku), u svaku epruvetu je dodato 400 μ L pufera za vezivanje, a sadržaj analiziran na protočnom citometru. Rezultati su izraženi kao % odgovarajućih ćelijskih populacija u ukupnom broju analiziranih ćelija.

3.2.3.7.3. Citometrijska analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Kvantitativno merenje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa i analiza DNK sadržaja određena je nakon fiksiranja ćelija i bojenja PI prema protokolu Krishan (1975). Princip ove metode zasniva se na osobini PI da interkalira u DNK molekul i emituje crvenu fluorescencu (FL2), koja je proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji. Ova metoda omogućava razlikovanje faza ćelijskog ciklusa (G_0/G_1 faza rasta ćelija, S faza replikacije DNK, G_2/M faza ćelijske deobe), a može se koristiti i za određivanje broja ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK, odnosno fragmentisanom DNK u sub- G_1 fazi, kao parametrom kasne apoptoze.

Ukratko, preostali sadržaj suspenzije ćelija je centrifugiran i resuspendovan u 400 μ L ohlađenog rastvora 1xPBS. Ćelije su fiksirane hladnim apsolutnim etanolom (400 μ L) koji je prethodno ohlađen na -20 °C, kako bi boja mogla da difunduje u ćeliju, a potom su inkubirane minimum 30 min na ledu. Nakon inkubacije, ćelije su dva puta isprane, zatim je dodata odgovarajuća količina RnaseA (1 mg/mL) i PI (400 μ g/mL). Na kraju, uzorci su vorteksovani i inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Ovako obojene ćelije dalje su analizirane. Na histogramu distribucije intenziteta FL2 fluorescence, formiranje sub- G_1 pika pri analizi toka ćelijskog ciklusa potiče od populacije ćelija sa fragmentisanim DNK molekulima. Rezultati su izraženi kao % ćelija u različitim fazama ciklusa (sub- G_1 , G_0/G_1 , S i G_2/M) u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

3.2.3.8. Ispitivanje genotoksičnog potencijala primenom komet testa

3.2.3.8.1. Pripremanje suspenzije ćelija

Ćelijske suspenzije su pripremljene i zasejane u ploče sa 12 bunara u koncentraciji 3×10^5 ćelija/bunaru (3×10^5 ćelija/mL). Ploče su inkubirane na 37 °C u atmosferi obogaćenoj sa 5 % CO_2 . Nakon 24 h inkubacije (formiranja monosloja), medijum je uklonjen, ćelije su isprane i tretirane rastućim koncentracijama test supstanci (paralelno je rađena negativna kontrola i kontrola rastvarača - DMSO). Tretman test supstancama trajao je 24 h. Nakon tretmana, medijum je uklonjen, ćelije su isprane i tripsinizirane; ćelijska suspenzija je centrifugirana tokom 10 min na 1000 rpm, a zatim i resuspendovana u 60 μ L medijuma (2 x 30 μ L). Tako dobijene suspenzije pojedinačnih ćelija dalje su korišćene za komet test.

Za testiranje genotoksičnosti odabrane su netoksične koncentracije Jc-EU-P i PDO (sa preživljavanjem ćelija većim od 80 % u MTT testu citotoksičnosti), a testirane ćelijske linije su bile A549 i MRC-5. Kao pozitivna kontrola korišćen je citostatik DOX.

3.2.3.8.2. Komet test – elektroforeza pojedinačnih ćelija

Za detekciju jednolančanih i dvolančanih prekida kao i alkalno labilnih mesta na molekulu DNK, primenjena je alkalna verzija komet testa (Singh i sar., 1988). Čitava procedura se obavlja u mraku ili pod žutim svetlom. Dobro oprane (odmašćenje) mikroskopske pločice potopljene su u 1 % rastvor agaroze normalne tačke topljenja (eng. *Normal Melting Point*, NMP), donja strana pločica je obrisana, a naneti NMP je osušen preko noći na sobnoj temperaturi. Dodatno, na dan izvođenja testa, na levu i desnu stranu pločice naneto je još po 80 μ L 1 % NMP agaroze koja je brzo prekrivana pokrovnim staklima, čime se postiže njen bolji raspored. Pločice su ostavljene 5 min na 4 °C kako bi se i ovaj sloj agaroze stegao, a nakon toga su pokrovna stakla uklanjana. Po 30 μ L pripremljene suspenzije ćelija se zatim mešalo sa 70 μ L rastopljene agaroze, niske tačke topljenja (eng. *Low Melting Point*, LMP). Uzorci su pripremani u duplikatu, i na svaku pločicu su brzo nanošena dva uzorka istog tipa (2 x 80 μ L). Uzorci su pokriveni pokrovnim staklima i pločice još jednom ostavljene 5 min na 4 °C. Nakon toga pokrovna stakla su pažljivo skinuta, a gelovi su bili spremni za lizu. Počev od ovog koraka, svi sledeći (denaturacija, elektroforeza i neutralizacija) su rađeni u mraku. Pločice su smeštene u kadicu i prelivene svežim i dobro ohlađenim rastvorom za lizu. Liza je trajala tokom minimum 1 h na 4 °C. U ovom koraku dolazi do uklanjanja svih ćelijskih membrana, tako da se oslobađa sadržaj nukleusa, tzv. „nukleoid“. Nakon lize, pločice su poredane u kadicu za elektroforezu i prelivene hladnim rastvorom za denaturaciju i elektroforezu, visokog pH. Dalje su inkubirane 20 min na 4 °C, u cilju denaturacije DNK. U sledećoj fazi, u istom rastvoru izvršen je proces elektroforeze (0,75 V/cm, 300 mA) u trajanju od 20 min. Nakon denaturacije i elektroforeze, pločice su pažljivo vađene, blago posušene (papirnom vatom), prebačene u čiste kadice, a zatim prelivene hladnim rastvorom za neutralizaciju, u kome su ostajale u trajanju od 15 min na sobnoj temperaturi. Pločice su do analize čuvane u vlažnoj kadici na 4 °C. Za vizualizaciju kometa, neposredno pred mikroskopiranje naneto je 20 μ L rastvora fluorescentne boje etidijumbromida (5 μ g/mL), koja interkalira u DNK, na gelove, koji su zatim prekriveni pokrovnim staklima. Pločice su posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom sa ekscitacionim filterom 510 – 560 nm, emisionim filterom 590 nm, uz korišćenje uveličanja 400x (*Leica*, DMLS, Nemačka). Na svakom gelu analizirano je po 25 nasumično odabranih kometa (ukupno 50 nukleoida po pločici). Za kvantifikaciju DNK oštećenja korišćen je kompjuterski softver *Comet IV Computer Software* (Perceptive Instruments, UK). Nivo DNK oštećenja se izražava preko tri najčešće korišćena parametra u komet testu: intenzitet repa komete (eng. *Tail Intensity*, TI), momenat repa komete (eng. *Olive Tail Moment*) i dužina repa komete (eng. *Tail Length*). Nivo oštećenja DNK u ovom radu praćen je preko parametra TI (%).

3.2.4. Metode za ispitivanje interakcije mikroroganzama i humanih ćelija gajenih u kulturi i uporednu analizu antimikrobnog i citotoksičnog potencijala

3.2.4.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti biljnih derivata *in vitro* - test adhezivnosti

Ispitivanje sposobnosti adhezije mikroorganizama na ćelije u kulturi, izvedeno je u skladu sa protokolom koji su opisali Todoriki i sar. (2001) uz određene modifikacije. U ploče sa 12 bunara dodate su suspenzije odabranih sisarskih ćelija u DMEM medijumu, 3×10^5 ćelija/bunaru. Medijum je bio obogaćen sa 10 % FBS i sadržao je koktel antibiotika koji se standardno koristi u procedurama gajenja sisarskih ćelija, a ćelije su u njemu gajene na 37 °C u atmosferi sa 5 % CO₂ sve do dostizanja 80-90 % konfluentnosti. Nakon toga, ćelijski monosloj je dobro ispran sa 1xPBS i preinkubiran 30 min u čistom medijumu, čime su uklonjeni ostaci antibiotika i seruma. Ovako pripremljene ćelije su bile spremne za inokulaciju odabranim sojevima. Suspenzija mikroorganizama je bila pripremljena kao što je prethodno opisano u Poglavlju 3.2.2.2.1, uz male modifikacije. Nakon centrifugiranja (4000 rpm/10min) eksponencijalne kulture mikroorganizama istaložene ćelije su resuspendovane u 1 mL čistog DMEM medijuma (kontrola), medijuma sa dodatkom DMSO (kontrola rastvarača) kao i medijuma sa različitim rastućim koncentracijama test

supstanci (primenjene su sub-inhibitorne doze, koje nisu toksične za korišćene mikroorganizme). Ovako dobijene suspenzije su korišćene za ispitivanje adhezivnog potencijala.

Primenjene su dve varijante testa – (1) ćelije mikroorganizama su najpre tretirane test supstancom i to 3 h na 37 °C, a zatim su dodate u bunare ploča sa razvijenim monoslojem sisarskih ćelija (varijanta označena kao pre-tretman mikroorganizama); i (2) suspenzija mikroorganizama je odmah po dodavanju test supstance prelivena na monosloj sisarskih ćelija (varijanta označena kao ko-tretman mikroorganizama i sisarskih ćelija). Izbor varijante protokola zavisio je od indeksa selektivnosti SI_M ; naime, u slučaju selektivnosti agensa prema odabranim patogenima supstanca je primenjena u ko-tretmanu mikroorganizama i sisarskih ćelija, dok je u slučaju neselektivnog efekta primenjena u pre-tretmanu mikroorganizama, kako bi se sprečilo ispoljavanje letalnog efekta test supstance na sisarskim ćelijama.

Bez obzira na varijantu testa, mikroorganizmima (pretretiranim ili ne) je inokulisan monosloj sisarskih ćelija, a ploče su zatim dodatno inkubirane 60 min na 37 °C, kako bi mikroorganizmi mogli da se adheriraju na površinu sisarskih ćelija. Nakon toga, medijum je uklonjen, monosloj je ispran dva puta sa 1xPBS da bi se uklonile neadherirane ćelije. Zatim je pripremana suspenzija adheriranih mikroorganizama i to tripsinizacijom monosloja sisarskih ćelija, kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.2. Na ovaj način adherirane ćelije su prebačene u tečnu fazu i pripremljena je njihova suspenzija. Ukupan broj adheriranih (CFU/mL_{Adh}) ćelija mikroorganizama određen je indirektnom metodom, zasejavanjem odgovarajućih razblaženja na odgovarajuće podloge i prebrojavanjem kolonija. Uz to, indirektna metoda je korišćena i za određivanje brojnosti starter kulture mikroorganizama (CFU/mL_{Int.No}), Efekat na proces adhezije procenjen je poređenjem adhezivnih svojstava mikroorganizama u medijumu sa i bez test supstanci.

Za potrebe istraživanja biološke aktivnosti test supstanci na proces adhezije, procenat adheriranih ćelija (% Ad) je računat prema jednačini:

$$Ad [\%] = \frac{CFU/mL_{Adh}}{CFU/mL_{Int.No}} \times 100$$

Gde je:

Adh – broj adheriranih ćelija sa/bez test supstance(CFU/mL);

Int.No – ukupan broj ćelija (eng. *initial number*, CFU/mL).

Procenat inhibicije adhezije (% I) računat prema jednačini:

$$\% I = \left(1 - \frac{Ad(\%)t}{Ad(\%)c}\right) \times 100$$

Gde je:

Nt Ad(%)t - procenat adheriranih ćelija nakon tretmana test supstancom;

Nc Ad(%)c – procenat adheriranih ćelija u netretiranoj kontroli

Test adhezivnosti je primenjen na *C. albicans* i *L. monocytogenes*. Kao model epitela kolona korišćene su sisarske ćelije HT-29 i dodatno HCT116 u slučaju *L. monocytogenes*. Odabrana koncentracija test supstanci (Jc-EU-P i PDO) iznosila je 1/2xMIK, jer je cilj bio ispitati efekat sub-inhibitorne doze na adheziju.

3.2.4.2. Procena selektivnosti uočenih efekata prema mikroorganizmima

Kako bismo procenili bezbednost upotrebe antimikrobnih agenasa, na osnovu *in vitro* primenjenih testova, računat je odnos između citotoksičnog i antimikrobnog efekta, tj. indeks selektivnosti antimikrobnog agensa (SI_M). SI_M predstavlja odnos između logaritma odnosa IC_{50} vrednosti (merilo citotoksičnosti, vidi poglavlje 3.2.3.5) i MIK vrednosti (merilo antimikrobnog efekta) test supstanci. Indeks je računat prema sledećoj jednačini:

$$SI_M = \log(IC_{50}/MIK)$$

Pozitivne vrednosti SI_M ukazuju na veću selektivnost test supstanci prema mikroorganizmima nego prema kancerskim ćelijama, dok negativne vrednosti ukazuju na veću toksičnost prema ćelijama.

3.2.5. Statističke analize

Za statističku obradu dobijenih rezultata korišćen je softverski program STATISTICA v.7 (StatSoft Inc.,SAD), pri čemu je nivo značajnosti bio $p < 0,05$ u svim testovima. Vrednosti prikazane u tabelama predstavljaju srednje vrednosti sa standardnim devijacijama. Rezultati antimikrobne aktivnosti, citotoksičnosti i genotoksičnosti podvrgnuti su jednosmernoj (jednofaktorijalnoj) analizi varijanse (One way ANOVA), korišćenjem Studentov-og t -testa i Tukey-evog HSD testa (eng. *Honest Significant Difference*). Za statističku obradu rezultata komet testa korišćen je neparametrijski *Mann Whitney U*-test. Rezultati eksperimenata *in situ* podvrgnuti su analizi standardne varijanse (Two-way ANOVA), korišćenjem Holm-Sidac testa.

REZULTATI

4. REZULTATI

U skladu sa postavljenim glavnim ciljevima prikazani su i analizirani rezultati u okviru tri celine. U okviru prve, prikazani su rezultati hemijske karakterizacije etarskog ulja i postdestilacionog ostatka *J. communis* var. *saxatilis* (Jc-EU-P i PDO), kao i rezultati ispitivanja njihovog antioksidativnog potencijala. Pored toga, u ovoj celini prikazan je i hemijski sastav drugih analiziranih test supstanci, tj. komercijalno nabavljenih etarskih ulja kleke (Jc-EU-K) i čubra (Sm-EU). Druge dve celine se bave antimikrobnim i citotoksičnim potencijalom derivata kleke, međutim, s obzirom da su rezultati citotoksičnosti korišćeni za procenu selektivnosti detektovanog antimikrobnog potencijala, one su prikazane obrnutim redosledom (najpre su dati rezultati analize citotoksičnog efekta).

4.1. Hemijska karakterizacija test supstanci i njihova antioksidativna aktivnost

4.1.1. Hemijski sastav etarskih ulja

Hemijski sastav svih etarskih ulja analiziran je primenom gasne hromatografije sa masenospektrometrijskom detekcijom, a rezultati hemijske analize prikazani su tabelarno. Što se tiče Jc-EU-P, GC-MS analizom identifikovano je 93,95 % ukupnog sastava ulja, pri čemu je procentualna zastupljenost dvadeset pojedinačnih komponenti bila preko 1 %, dok nijedna nije prešla 25 % (Tabela 9, Slika 8.2, Prilog). Dobijeni rezultati pokazuju da u sastav ovog ulja ulaze isključivo seskviterpenski (59,3 %) i monoterpenski ugljovodonici (40,7 %). Od seskviterpena, najzastupljeniji su bili δ -kadinen (10,71 %), germakren D (7,25 %) i α -murolen (6,58 %). α -pinen je bio najzastupljeniji monoterpenski ugljovodonik (23,61 %) i prva po zastupljenosti komponenta ulja, a za njim sledi sabinen (9,53 %). Od ukupnog hemijskog sastava ulja neidentifikovano je 6,05 % i to iz grupe seskviterpena, usled velike sličnosti masenih spektara i retencionih indeksa.

Komercijalno nabavljena etarska ulja kleke (Jc-EU-K) i čubra (Sm-EU) takođe su analizirana GC-MS metodom (Tabela 10, Slike 8.3. i 8.4, Prilog). U ulju Jc-EU-K, specifične težine 920 mg/mL, identifikovana su 33 jedinjenja koja čine 99,9 % ukupnog sastava. Najzastupljenija grupa su monoterpenski ugljovodonici (82,9 %), a među njima najveći udeo imaju α -pinen (47,8 %), sabinen (11,0 %), β -pinen (8,5 %), i limonen (5,8 %). Oksidovani monoterpeni su zastupljeni u značajno manjem procentu (9,51%) dok su seskviterpenski ugljovodonici (4,23 %) i oksidovani seskviterpeni (3,26 %) bili najmanje zastupljene grupe jedinjenja.

Analizom hemijskog sastava Sm-EU (specifične težine 860 mg/mL), identifikovana su ukupno 35 jedinjenja, koja čine 100,0 % sastava ulja. Za razliku od oba ulja kleke, ulje Sm-EU se odlikuje visokim sadržajem oksidovanih monoterpena (61,2 %), među kojima su najzastupljeniji bili karvakrol (30,7 %), timol (18,0 %) i borneol (5,9 %). Monoterpenski ugljovodonici bili su zastupljeni u značajno manjem procentu (29,1 %), a među njima su u najvišim koncentracijama bili *p*-cimen (15,6 %) i γ -terpinen (5,5 %). Najmanje zastupljene grupe jedinjenja bile su seskviterpenski ugljovodonici (8,47 %) i oksidovani seskviterpeni (1,24 %).

Tabela 9. GC-MS analiza etarskog ulja *Juniperus communis* var. *saxatilis* (Jc-EU-P)

Jedinjenje	t _R [min]	LRI	Površina %
α-tujen	5,014	925	0,90
α-pinen	5,142	933	23,61
sabinen	5,796	972	9,53
β-pinen	5,872	976	1,10
β-mircen	6,047	987	1,36
limonen	6,757	1029	2,07
γ-terpinen	7,290	1060	0,91
4-terpineol	9,436	1193	1,26
α-kopaen	12,089	1388	0,93
β-elemen	12,242	1402	4,37
<i>seskviterpen</i>	12,386	1414	0,55
β-kariofilen	12,584	1432	2,94
γ-elemen	12,667	1440	1,31
vidren (tujopsen)	12,717	1445	2,66
α-humulen	12,929	1465	3,08
<i>cis</i> -muurola-4(14),5-dien	13,012	1473	1,15
<i>seskviterpen</i>	13,113	1483	1,90
germakren D	13,187	1491	7,25
<i>koeluirajući seskviterpeni</i>	13,248	1497	1,95
α-murolen	13,328	1505	6,58
γ-kadinen	13,477	1521	5,87
δ-kadinen	13,537	1528	10,71
α-kadinen	13,684	1544	1,83
<i>seskviterpen</i>	13,755	1552	0,89
germakren B	13,906	1569	4,56
<i>seskviterpen</i>	14,588	1654	0,76
Monoterpenski ugljovodonici			40,7 %
Seskviterpenski ugljovodonici			59,3 %
Ukupno identifikovano			93,95 %
Neidentifikovano			6,05 %

Tabela 10. GC-MS/GC-FID analiza komercijalno nabavljenih etarskih ulja *Juniperus communis* (Jc-EU-K) i *Satureja montana* (Sm-EU)

RI	Jedinjenje	Jc-EU-K Sm-EU		RI	Jedinjenje	Jc-EU-K Sm-EU	
		Površina (%)				Površina (%)	
899	triciklen	0,2		1178	mirtenol	0,7	
905	α -tujen	2,7	0,8	1187	vebenon	0,7	
910	α -pinen	47,8	0,9	1222	karvakrol, metil-etar		0,7
924	kamfen	0,4	1,0	1270	bornil-acetat	0,3	
949	sabinen	11,0		1282	<i>trans</i> -pinokarvil-acetat	1,3	
951	β -pinen	8,5	0,2	1284	timol		18,0
969	mircen	3,4	1,0	1293	karvakrol		30,7
981	α -felandren		1,2	1322	α -kubeben	0,2	
994	α -terpinen		1,3	1331	timol-acetat		0,2
1004	<i>p</i> -cimen	2,9	15,6	1347	α -kopaen	0,3	
1006	limonen	5,8		1350	karvakrol-acetat		0,5
1018	<i>cis</i> - β -ocimen		0,4	1356	β -burbonen		0,2
1036	γ -terpinen		5,5	1365	β -elemen	0,8	
1047	<i>cis</i> -sabinen-hidrat	2,5	0,4	1373	sibiren	0,2	
1065	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dien		0,4	1389	<i>cis</i> -kariofilen	0,3	3,7
1066	terpinol		0,8	1399	β -kopaen		0,1
1083	linalol		3,4	1409	aromadendren		0,7
1085	α -pinen oksid	0,6		1423	α -humulen	0,3	0,2
1086	<i>cis</i> -tujon	0,5		1430	6,9-guaiadien		0,1
1104	α -kamfolenal	1,2		1448	<i>cis</i> -muurola-4(14),5-dien	0,4	0,4
1117	<i>trans</i> -pinokarveol	0,5		1456	γ -gurjunen	0,3	0,7
1120	kamfor		1,3	1472	<i>trans</i> -muurola-4(14),5-dien	0,4	1,5
1125	<i>trans</i> -verbenol	1,6		1485	γ -kadinen		0,2
1139	pinokarvon	0,2		1494	δ -kadinen		0,6
1145	borneol		5,9	1551	spatulenol		0,6
1156	terpinen-4-ol	0,8	0,2	1552	kariofilen oksid	1,6	0,7
1173	mirtenal	0,3		1579	humulen epoksid II	0,9	
Monoterpenski ugljovodnici						82,9 %	29,1 %
Oksidovani monoterpeni						9,5 %	61,2 %
Seskviterpenski ugljovodnici						4,2 %	8,5 %
Oksidovani seskviterpeni						3,3 %	1,2 %
Ukupno identifikovano						99,9 %	100,0 %
Broj identifikovanih jedinjenja						33	35

4.1.2. Hemijski sastav PDO

Za utvrđivanje sadržaja hinske kiseline i odabranih fenolnih jedinjenja (14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) u PDO, primenjena je specifična i visokoselektivna LC-MS-MS metoda. Jedinjenja su praćena u dinamičkom SRM (*selected reactions monitoring*) modu. Kalibracione krive na osnovu kojih je izračunat sadržaj fenolnih jedinjenja prikazane su na Slikama 8.5–8.8 (Prilog). ESI-SRM hromatogrami za detektovana jedinjenja u PDO prikazani su na Slikama 8.9–8.11 (Prilog). Sadržaj kvantifikovanih jedinjenja u PDO izražen je u mg/g SE i prikazan u Tabeli 11. Od ukupno 45 ispitanih jedinjenja detektovano je 25 koja predstavljaju samo 3,2 % od ukupnog sastava PDO. Preostalih 20 (epigalokatehin-galat, eskuletin, siringinska kiselina, skopoletin, viteksin, sinapinska kiselina, hiperozid, apiin, *O*-kumarinska kiselina, miricetin, sekoizolaricirezinol, 3,4-dimetoksicimetna kiselina, bajkalin, daidzein, matairezol, genistein,

kemferol, izoramnetin, hrizoeriol, bajkalein) nije bilo prisutno u ispitanom uzorku. Među identifikovanim jedinjenjima najzastupljeniji su bili hinska kiselina (11,09 mg/g SE) i flavonoidi rutin (12,25 mg/g SE), katehin (5,53 mg/g SE) i epikatehin (1,74 mg/g SE). U odnosu na ukupan sadržaj identifikovanih flavonoida (20,5 mg/g SE), sadržaj fenolnih kiselina u PDO je bio znatno niži i iznosio je 0,59 mg/g SE.

Tabela 11. Sadržaj ispitanih fenolnih jedinjenja i hinske kiseline u postdestilacionom ostatku

	Jedinjenje	Sadržaj (mg/g SE)^a
<i>Flavonoidi</i>	rutin (kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozilglukozid)	12,25 ± 0,37
	katehin	5,534 ± 0,553
	epikatehin	1,738 ± 0,174
	amentoflavon	0,392 ± 0,012
	apigenin	0,013 ± 0,001
	izokvercitrin (kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid)	0,232 ± 0,007
	apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	0,140 ± 0,007
	kvercitrin (kvercetin-3- <i>O</i> -ramnozil)	0,139 ± 0,008
	kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	0,021 ± 0,001
	luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	0,025 ± 0,001
	kvercetin	<0,008
	luteolin	<0,006
	naringenin	<0,006
	<i>kumarini</i>	umbeliferon
<i>Fenolne kiseline</i>	protokatehinska kiselina	0,145 ± 0,012
	cimetna kiselina	0,097 ± 0,019
	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,093 ± 0,006
	<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,088 ± 0,008
	vanilinska kiselina	0,060 ± 0,018
	ferulna kiselina	0,053 ± 0,005
	galna kiselina	0,034 ± 0,030
	gentizinska kiselina	0,012 ± 0,001
	5- <i>O</i> -kafeoilhinska kiselina (hlorogenska kiselina)	0,011 ± 0,001
	hinska kiselina	11,09 ± 1,11
kafena kiselina	<0,002 ^b	

^a Rezultati su izraženi kao koncentracija mg/g suvog ekstrakta (SE) ± standardna devijacija ponovljivosti (određena tokom validacije), ^b Nije detektovano ili je manje od granice kvantifikacije instrumenta (Orčić i sar., 2014).

U daljem radu određen je ukupni sadržaj flavonoida⁷ u PDO metodom kompleksiranja jona Al³⁺. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata kvercetina po 1 g suvog ekstrakta (mg ekv.kvercetina g SE) predstavljeni su u Tabeli 8.2. (Prilog). Dodatno, rezultati kalibracije na osnovu kojih je konstruisana standardna kriva kvercetina prikazana je u Tabeli 8.3 i na Slici 8.12 (Prilog). U PDO je određeno 19,1 mg ekv. kvercetina/g SE.

⁷ Ovim testom nije moguće detektovati katehin i epikatehin, zbog odsustva okso-grupe u položaju 4.

4.1.3. Antioksidativni potencijal derivata *J. communis* var. *saxatilis*

U cilju procene antioksidativnog potencijala Jc-EU-P i PDO ispitana je sposobnost neutralizacije stabilnog DPPH radikala i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (DPPH i TBA testovi), a za PDO je određen i redukcion kapacitet primenom FRAP testa. Rezultati su očitani spektrofotometrijski na odgovarajućim talasnim dužinama.

Rezultati DPPH testa su pokazali reaktivnost oba derivata: određena IC_{50} vrednost PDO potrebna za neutralizaciju 50 % DPPH radikala bila je 4,40 $\mu\text{g/mL}$, što je približno vrednosti model antioksidanta BHT ($IC_{50} = 4,90 \mu\text{g/mL}$). Pri najvećim testiranim koncentracijama, vrednost inhibicije DPPH radikala je bila ujednačena i približavala se 100 %, a dalji porast koncentracije PDO nije dovodio do povećanja njegove aktivnosti (Tabela 8.4. i Slika 8.13, Prilog). Aktivnost ulja je bila za nekoliko redova veličine slabija u poređenju sa PDO; koncentracija pri kojoj je neutralisano 50 % DPPH radikala bila je 1,48 mg/mL (Tabela 8.5. i Slika 8.14, Prilog).

Sposobnost etarskog ulja i PDO da inhibiraju proces LP ispitana je na lipozomima kao supstratu koji je bogat nezasićenim masnim kiselinama. Kao inicijator lančane reakcije LP korišćen je Fe^{2+} /askorbat i određena je količina krajnjeg produkta peroksidacije lipida, MDA, u reakciji sa TBA. U ovom testu, jedinjenja u sastavu test supstanci mogu helirati jone Fe^{2+} i tako sprečiti LP ili neutralisati nastale radikalske vrste. Procenat inhibicije LP se povećavao sa porastom testiranih koncentracija; PDO je pokazao bolju aktivnost u poređenju sa uljem; procenjene IC_{50} vrednosti su iznosile 569,14 $\mu\text{g/mL}$ za PDO i 1,75 mg/mL za etarsko ulje. Antioksidant BHT je pokazao najjaču aktivnost ($IC_{50} = 20,35 \mu\text{g/mL}$). Iako je i ovde PDO bio značajno aktivniji od ulja, treba napomenuti da je efekat inhibicije LP bio višestruko slabiji nego efekat neutralizacije DPPH radikala. Naime, dok je aktivnost u DPPH testu bila približna aktivnosti pozitivne kontrole (BHT), u ovom testu je on bio približno 30 puta slabiji u poređenju sa odgovarajućom pozitivnom kontrolom. Rezultati LP prikazani su u Tabelama 8.6 i 8.7 i na Slikama 8.15 i 8.16 (Prilog).

Određivanje redukcionog kapaciteta PDO izvršeno je redukcijom Fe^{2+} -TPTZ kompleksa, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata askorbinske kiseline po 1 g suvog ekstrakta (mg ekv. askorbinske kis/g SE). U poređenju sa redukcionim kapacitetom standarda BHT (32,77 mg ekv. askorbinske kis/g SE), PDO je pokazao skoro dvostruko veći redukcion kapacitet (78,77 mg ekv. askorbinske kis/g SE), (Tabela 8.8, Prilog). Dodatno, rezultati kalibracije na osnovu kojih je konstruisana standardna kriva askorbinske kiseline prikazani su u Tabeli 8.9 i Slici 8.17 (Prilog).

4.2. Citotoksična aktivnost derivata *J. communis* var. *saxatilis* *in vitro*

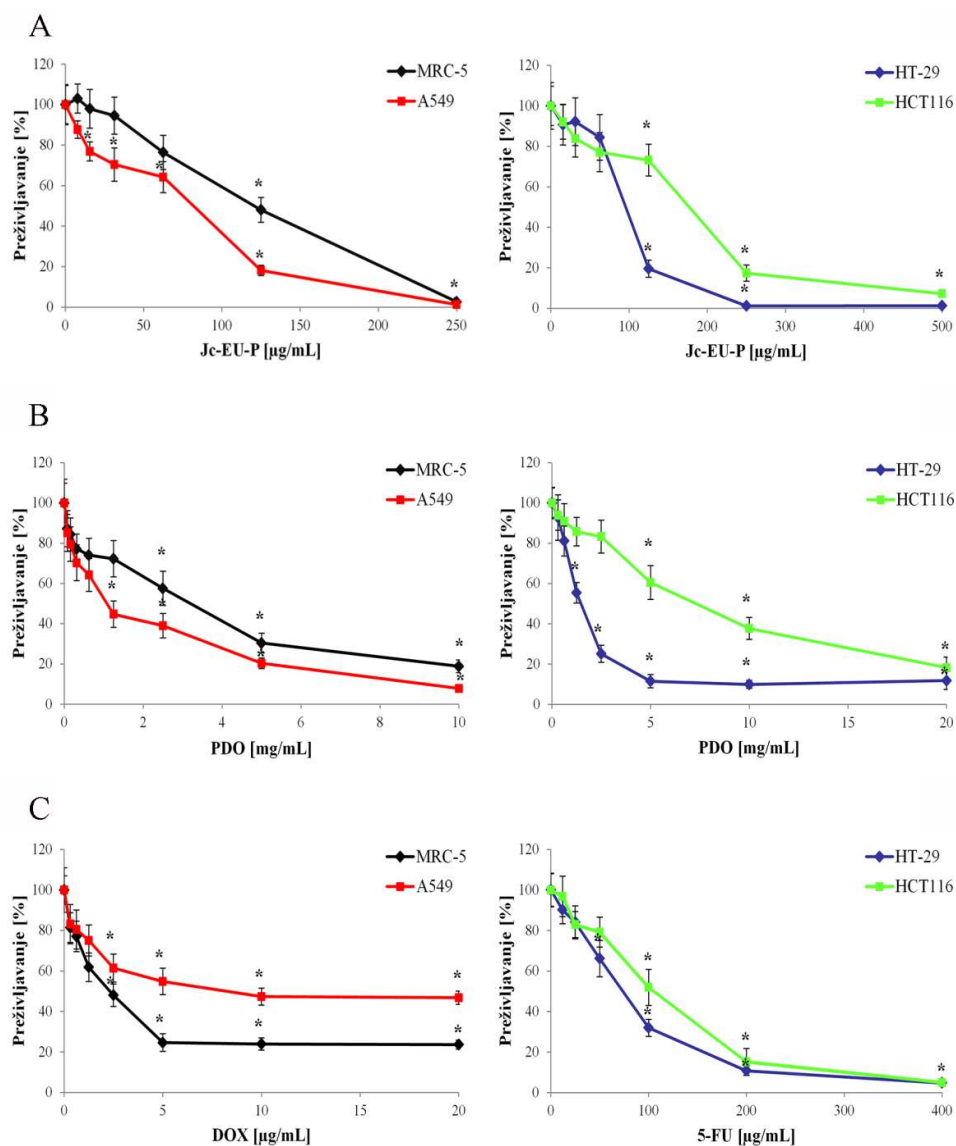
U okviru druge celine u ovoj studiji ispitana je citotoksična aktivnost derivata kleke na različitim humanim ćelijskim linijama i upoređena sa citotoksičnošću odabranih citostatika. Prvo je određena citotoksičnost Jc-EU-P, PDO i odabranih citostatika pojedinačno, a zatim je ispitan i njihov kombinovani efekat. Dalja istraživanja su bila usmerena ka ispitivanju mehanizama koji su u osnovi antikancerske aktivnosti testiranih derivata.

4.2.1. Citotoksična aktivnost pojedinačnih test supstanci

Citotoksična aktivnost Jc-EU-P i PDO ispitana je na tri kancerske ćelijske linije (adenokarcinom pluća – A549, adenokarcinom debelog creva – HT-29 i HCT116) i jednoj normalnoj (fetalni fibroblasti pluća – MRC-5), primenom MTT testa. Paralelno je ispitan i efekat konvencionalnih citostatika DOX i 5-FU: DOX na A549 i MRC-5 ćelijskim linijama, dok je efekat 5-FU ispitan na ćelijama kolona HT-29 i HCT116. Rezultati citotoksične aktivnosti prikazani su na Slici 11, kao i u Prilogu (Tabele 8.10-8.13). Na osnovu konstruisanih kriva preživljavanja izračunate su IC_{50} vrednosti (Tabela 12).

Jc-EU-P i PDO indukuju citotoksičnost prema svim ćelijskim linijama na dozno-zavisanim način: sa povećanjem koncentracije smanjuje se preživljavanje ćelija. Poređenjem aktivnosti biljnih

derivata i DOX na linijama A549 i MRC-5 uočavamo da je efikasnost ulja, a naročito PDO, bila značajno niža u odnosu na konvencionalni citostatik (Tabela 12). Međutim, međusobno poređenje IC_{50} vrednosti koje su dobijene primenom svakog pojedinačnog agensa na ove dve ćelijske linije, pokazuje da je DOX bio toksičniji za normalne MRC-5 ćelije, dok su biljni derivati izazivali snažniji letalni efekat na kancerskim A549 ćelijama. Slično ovome, rezultati ispitivanja citotoksičnog efekta na kancerskim ćelijama kolona pokazali su značajno veću citotoksičnost Jc-EU-P u poređenju sa PDO, pri čemu je HT-29 ćelijska linija bila osetljivija u poređenju sa HCT116. IC_{50} vrednosti ulja su bile uporedive sa vrednostima dobijenim za pozitivnu kontrolu 5-FU. Nasuprot tome, IC_{50} vrednosti određene za PDO su bile približno 20 i 60 puta veće od vrednosti određenih za 5-FU (Tabela 12). Generalno, od svih ispitanih kancerskih linija najosetljivija je bila A549 na delovanje Jc-EU-P ($IC_{50} = 69,4 \mu\text{g/mL}$) i PDO ($IC_{50} = 1270 \mu\text{g/mL}$), dok je najrezistentnija bila HCT116 ($IC_{50} = 160 \mu\text{g/mL}$, odnosno $IC_{50} = 6840 \mu\text{g/mL}$).



Slika 11. Citotoksični potencijal Jc-EU-P (A), PDO (B), DOX (C-levo) i 5-FU (C-desno) prema različitim ćelijskim linijama.

Tabela 12. IC₅₀ vrednosti određene za pojedinačne test supstance (µg/mL)

	HT-29	HCT 116	A549	MRC-5
Jc-EU-P	87	160	69,4	120
PDO	1450	6840	1270	2860
5-FU	75	110	nt	nt
DOX	nt	nt	5,88	1,92

nt-nije testirano

Selektivna toksičnost prema kancerskim ćelijama derivata kleke procenjena je preko odgovarajućeg indeksa selektivnosti (SI_K) koji predstavlja odnos IC₅₀ vrednosti određenih za normalnu i kancersku ćelijsku liniju. Vrednosti SI_K ≥ 2 ukazuju na selektivnu toksičnost jedinjenja, a vrednosti SI_K ≥ 3, na visoku selektivnu toksičnost (Badisa i sar., 2009; Bézivin i sar., 2003; Demirgan i sar., 2016). Sa druge strane, jedinjenja čije su vrednosti SI_K < 2 mogu biti citotoksične i prema normalnim ćelijama. Vrednosti SI_K za Jc-EU i PDO prikazane su u Tabeli 13. Rezultati prikazani u tabeli ukazuju na selektivnu toksičnost PDO prema ispitanim kancerskim ćelijama (SI_K ≥ 2). S druge strane, Jc-EU-P i DOX pokazali su neselektivnu toksičnost prema svim testiranim kancerskim ćelijama (SI_K < 2). Iako prema kvantitativnom kriterijumu Jc-EU-P nije selektivno toksično, treba naglasiti da je njegova SI_K vrednost prema A549 ćelijama bila značajno veća od one izračunate za DOX (vrednosti su bile 1,7 i 0,3), što ukazuje na manju selektivnost konvencionalnog citostatika prema ovoj ćelijskoj liniji.

Tabela 13. Indeksi selektivnosti (SI_K) biljnih derivata i citostatika DOX

Ćelijske linije	SI _K		
	MRC-5 / HT-29	MRC-5 / HCT116	MRC-5 / A549
Jc-EU-P	1,4	0,75	1,7
PDO	2,0	0,4	2,2
DOX	/	/	0,3

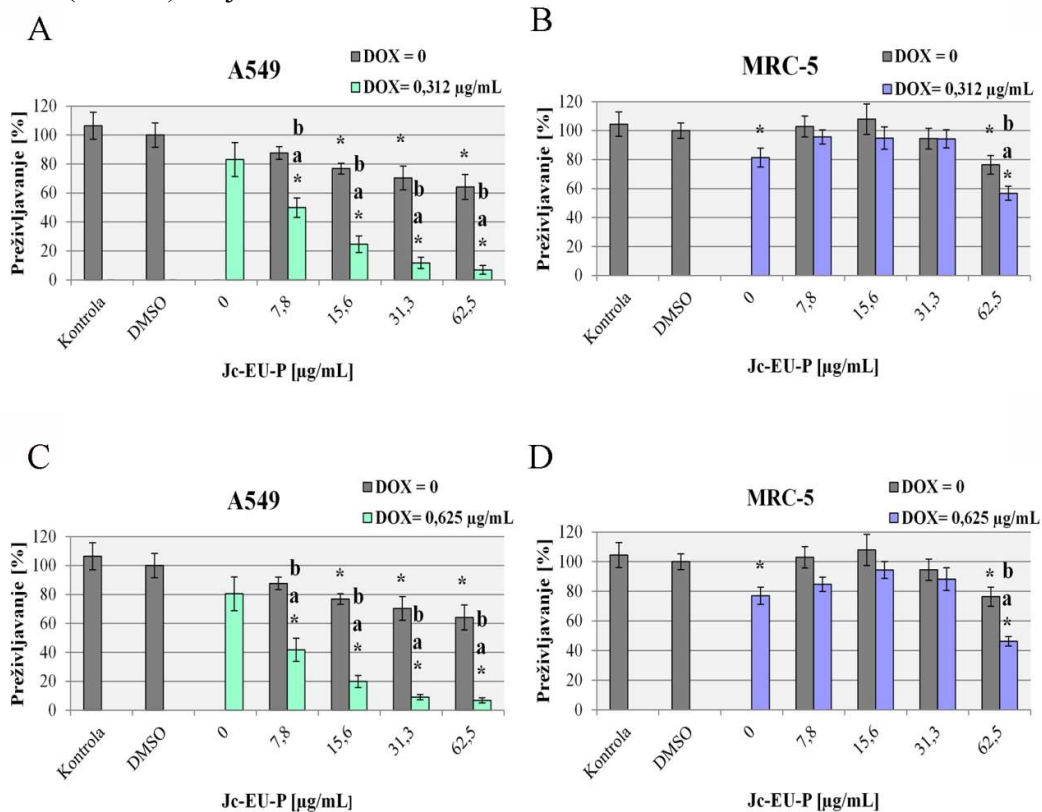
4.2.2. Citotoksična aktivnost dve test supstance u kombinaciji

Nakon što je ispitan citotoksični potencijal pojedinačnih test supstanci, dalje je ispitan kombinovani efekat sa citostatikom. Naime, želeli smo da utvrdimo da li će biljni derivati moći da senzibiliju ćelije i povećaju njihovu osetljivost prema citostatiku, primenjenom u dozama koje bi za normalne ćelije bile netoksične. S obzirom na rezultate citotoksičnosti, odnosno vrednosti SI_K indeksa, odabrane su ćelijske linije A549 i MRC-5 i kombinacije derivata *J. communis* sa citostatikom DOX. Na osnovu rezultata citotoksične aktivnosti pojedinačnih supstanci odabrane su one koncentracije pri kojima je preživljavanje zdravih ćelija bilo ≥80 %. Testirane sub-letalne koncentracije DOX su bile 0,312 µg/mL i 0,625 µg/mL, dok su koncentracije derivata varirale u opsegu 7,8 - 62,5 µg/mL za Jc-EU-P, odnosno 78 - 625 µg/mL za PDO.

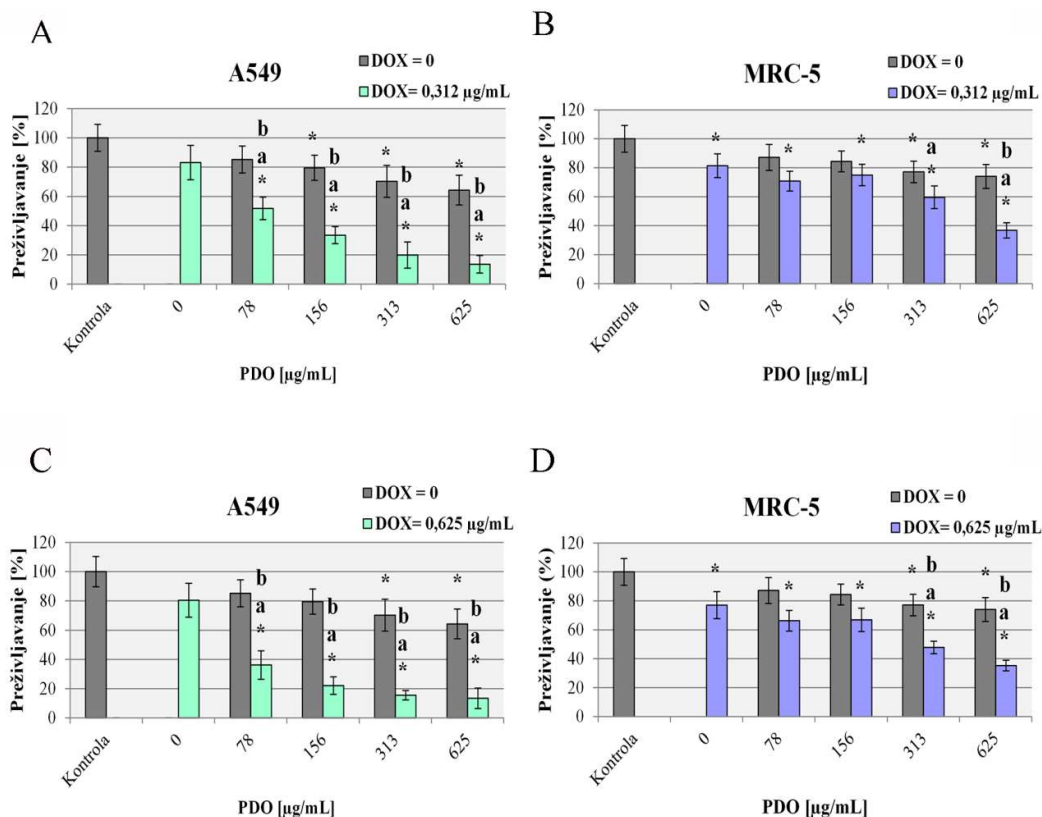
Rezultati citotoksičnog efekta ulja/PDO u kombinaciji sa DOX prikazani su na Slikama 12 i 13 i u Tabelama 8.14 i 8.15 (Prilog). Dobijeni rezultati ističu jači citotoksični efekat kombinacija Jc-EU-P+DOX i PDO+DOX prema kancerskim ćelijama, nego prema normalnim, što ukazuje na veću osetljivost A549 ćelija. Za postizanje istih efekata visoke koncentracije agenasa primenjenih pojedinačno značajno su redukovane u njihovim kombinacijama. To se jasno vidi na osnovu određenih IC₅₀ vrednosti kombinacija koje su bile značajno niže u poređenju sa vrednostima IC₅₀ svake supstance posebno (Tabela 14). Na primer, dok je preživljavanje 50 % A549 ćelija bilo moguće pri pojedinačnim koncentracijama ulja od 69,4 µg/mL i DOX od 5,88 µg/mL, isti efekat je postignut pri značajno nižim vrednostima kada su ova dva agensa u kombinaciji: IC₅₀ vrednosti

kombinacija su bile određene pri koncentracijama ulja od 7,5, odnosno 5,2 $\mu\text{g/mL}$ i DOX od 0,312, odnosno 0,625 $\mu\text{g/mL}$. Slično tome, preživljavanje 50 % A549 ćelija bilo je moguće pri pojedinačnim koncentracijama PDO od 1270 $\mu\text{g/mL}$ i DOX od 5,88 $\mu\text{g/mL}$, međutim isti efekat je postignut pri značajno nižim vrednostima kada su ova dva agensa u kombinaciji: IC₅₀ vrednosti kombinacija su bile određene pri koncentracijama PDO od 86, odnosno 31 $\mu\text{g/mL}$ i DOX od 0,312, odnosno 0,625 $\mu\text{g/mL}$.

Određene IC₅₀ vrednosti kombinacija jasno ukazuju na jači efekat dve supstance primenjene u kombinaciji. Ovo važi za obe ćelijske linije, ali je izraženije u kancerskim (A549) nego u normalnim (MRC-5) ćelijama.



Slika 12. Citotoksični efekat kombinacije Jc-EU-P i DOX prema A549 i MRC-5 ćelijama. Efekat kombinacije DOX (0,312 $\mu\text{g/mL}$) i različitih koncentracija Jc-EU-P prema A549 (A) i MRC-5 (B) ćelijama. Efekat kombinacije DOX (0,625 $\mu\text{g/mL}$) i različitih koncentracija Jc-EU-P prema A549 (C) i MRC-5 (D) ćelijama. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između efekata kombinacije (Jc-EU-P + DOX) i kontrole rastvarača (*), pojedinačno primenjenog DOX (a) i pojedinačno primenjenog Jc-EU-P (b).



Slika 13. Citotoksični efekat kombinacije PDO i DOX prema A549 i MRC-5 ćelijama

Efekat kombinacije DOX (0,312 µg/mL) i različitih koncentracija PDO prema A549 (A) i MRC-5 (B) ćelijama.

Efekat kombinacije DOX (0,625 µg/mL) i različitih koncentracija PDO prema A549 (C) i MRC-5 (D) ćelijama.

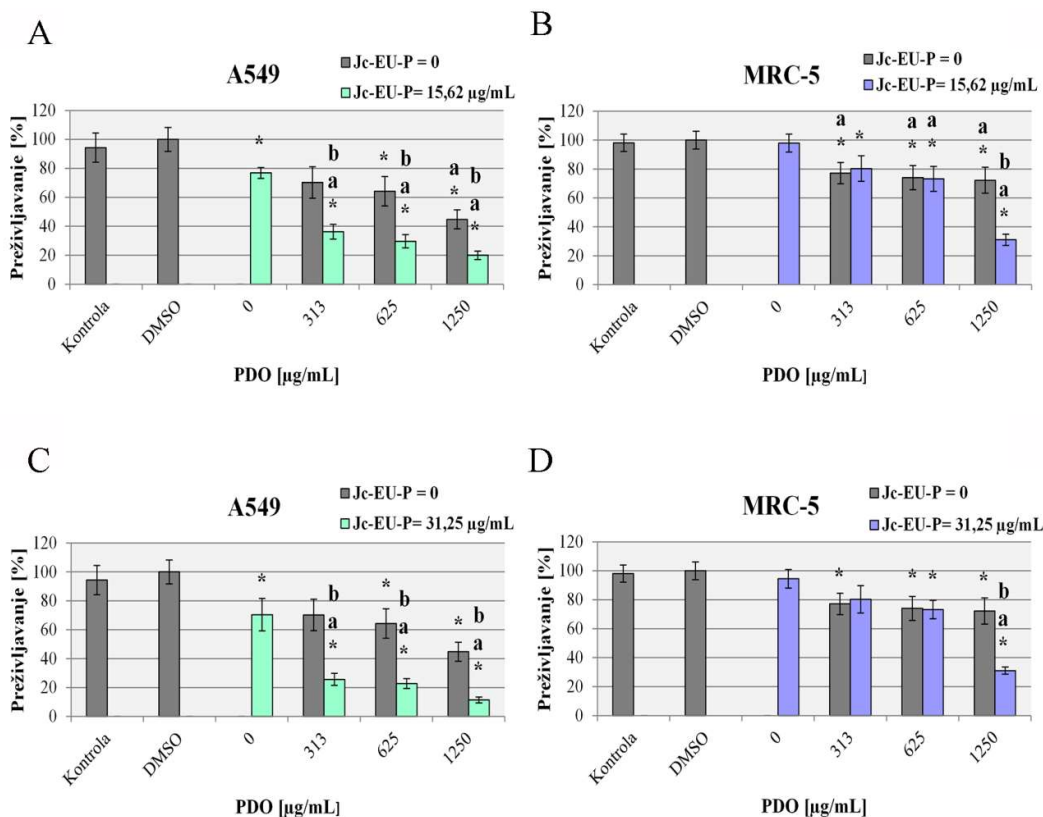
Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između efekata kombinacije (PDO + DOX) i kontrole rastvarača (*), pojedinačno primenjenog DOX (a) i pojedinačno primenjenog PDO (b).

Tabela 14. IC₅₀ vrednosti (µg/mL) biljnih derivata Jc-EU-P/PDO primenjenih pojedinačno i u kombinacijama sa citostatikom DOX

	A549	MRC-5
Jc-EU-P	69,4	120
PDO	1270	2860
DOX ₁ +Jc-EU-P	7,5	69,8
DOX ₂ +Jc-EU-P	5,2	60,8
DOX ₁ +PDO	86	390
DOX ₂ +PDO	31	270

DOX₁-0,312 µg/mL; DOX₂-0,625 µg/mL

Dodatno, ispitan je i efekat kombinacija Jc-EU-P sa PDO u koncentracijama koje su bile blago citotoksične prema MRC-5 ćelijama (preživljavanje je bilo veće od 70 %). Odabrane koncentracije ulja bile su 15,62 µg/mL i 31,25 µg/mL, a PDO je ispitan u opsegu 313-1250 µg/mL. Rezultati su prikazani na Slici 14. Kod A549 se uočava povećana citotoksičnost za sve ispitane kombinacije derivata, dok je kod normalnih ćelija povećan citotoksični efekat bio izražen samo u kombinacijama sa najvećim koncentracijama PDO. Određene IC₅₀ vrednosti kombinacija jasno ukazuju na jači efekat derivata kleke u kombinaciji nego kada je svaki primenjen pojedinačno (Tabela 15).



Slika 14. Citotoksični efekat kombinacije PDO i Jc-EU-P prema A549 i MRC-5 ćelijama. Efekat kombinacije Jc-EU-P (15,62 µg/mL) i različitih koncentracija PDO prema A549 (A) i MRC-5 (B) ćelijama. Efekat kombinacije Jc-EU-P (31,25 µg/mL) i različitih koncentracija PDO prema A549 (C) i MRC-5 (D) ćelijama. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između efekata kombinacije (PDO + Jc-EU-P) i kontrole rastvarača (*), pojedinačno primenjenog Jc-EU-P (a) i pojedinačno primenjenog PDO (b).

Tabela 15. IC₅₀ vrednosti (µg/mL) određene za pojedinačno primenjen PDO i njegovu kombinaciju sa Jc-EU-P

	A549	MRC-5
PDO	1270	2860
Jc-EU-P ₁ + PDO	190	970
Jc-EU-P ₂ + PDO	120	840

Jc-EU-P₁-15,62 µg/mL; Jc-EU-P₂-31,25 µg/mL

Iako su IC₅₀ vrednosti test supstanci primenjenih u kombinacijama i pojedinačno ukazivale na sinergizam, želeli smo da to i potvrdimo i kvantifikujemo. U tom cilju, izračunate su vrednosti kombinatnog indeksa (CI), koji definiše prirodu interakcije između supstanci primenjenih u kombinaciji (Tabela 16). Tretman A549 i MRC-5 ćelija sa kombinacijama Jc-EU-P ili PDO, sa DOX, pokazuje jasan sinergistički efekat, što potvrđuju vrednosti indeksa (CI<1). Dobijeni sinergizam je bio izraženiji u slučaju A549 ćelijske linije, za koju su izračunate CI vrednosti značajno niže u odnosu na one kod MRC-5 ćelija. Kada govorimo o binarnim kombinacijama biljnih derivata (Jc-EU-P i PDO), CI vrednosti takođe ukazuju na jasan sinergizam približno istog intenziteta, ostvaren i kod jednih i kod drugih ćelija.

Analiza prirode interakcija dodatno je izvršena i pomoću izobolograma, predstavljenim na Slici 15. Interakcija dve supstance u kombinaciji prikazana je grafički: tačke koje se nalaze ispod

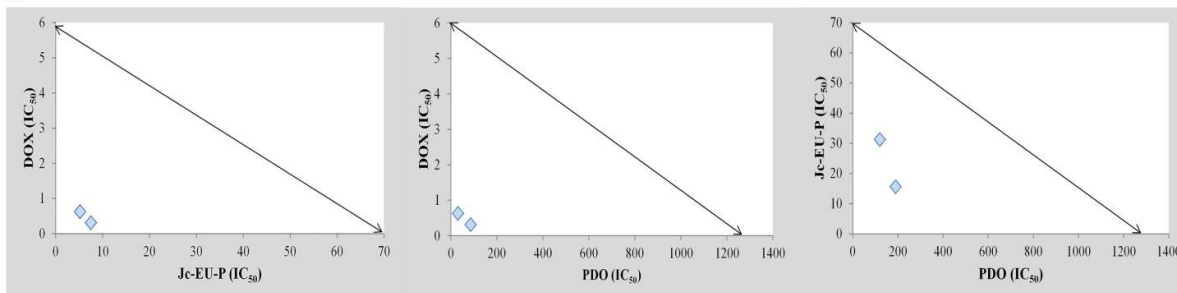
linije aditivnosti označavaju sinergizam. Rezultati ponovo ukazuju na jasan sinergistički efekat u kombinacijama Jc-EU-P + DOX, PDO + DOX i Jc-EU-P + PDO kod obe ćelijske linije.

Tabela 16. Kombinatorni indeks (CI) izračunat za IC_{50} vrednosti ($\mu\text{g/mL}$) u binarnim kombinacijama

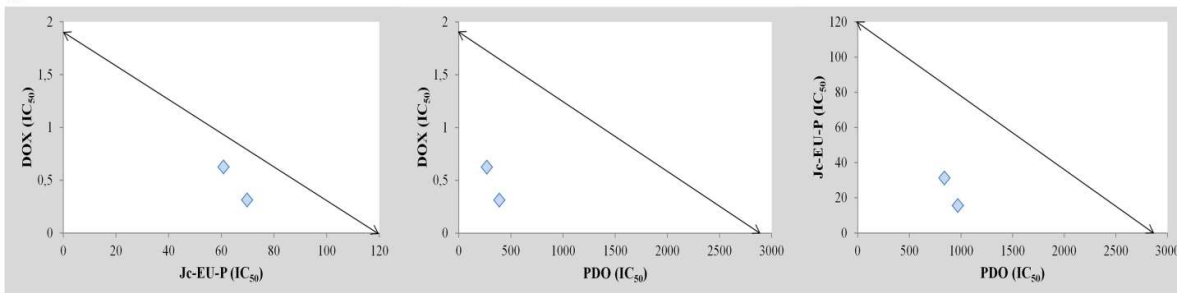
A549		MRC-5	
konc ($\mu\text{g/mL}$) u IC_{50} kombinacija	CI	konc ($\mu\text{g/mL}$) u IC_{50} kombinacija	CI
Jc-EU-P = 7,5 DOX = 0,312	0,16	Jc-EU-P = 69,83 DOX = 0,312	0,75
Jc-EU-P = 5,2 DOX = 0,625	0,18	Jc-EU-P = 60,85 DOX = 0,625	0,84
PDO = 86 DOX = 0,312	0,12	PDO = 390 DOX = 0,312	0,30
PDO = 31 DOX = 0,625	0,13	PDO = 270 DOX = 0,625	0,42
PDO = 190 Jc-EU-P = 15,62	0,37	PDO = 970 Jc-EU-P = 15,62	0,47
PDO = 120 Jc-EU-P = 31,25	0,54	PDO = 840 Jc-EU-P = 31,25	0,55

CI < 1 sinergizam; CI = 1 aditivni efekat; CI > 1 antagonizam

A



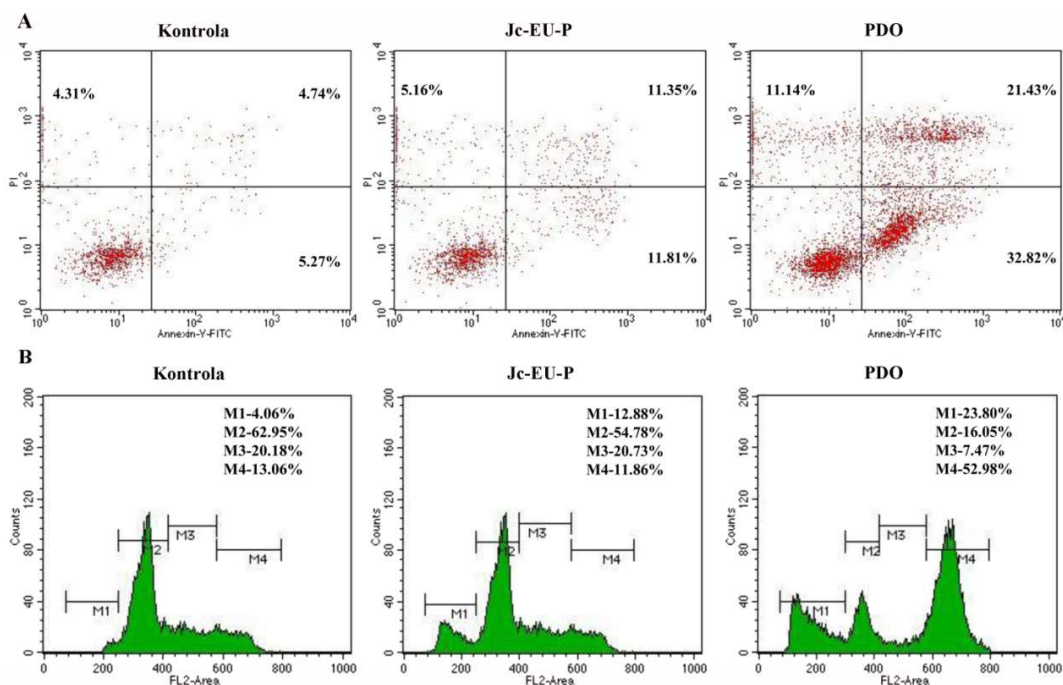
B



Slika 15. Izobologram analiza: kombinovani efekat supstanci DOX, Jc-EU-P i PDO ostvaren kod A549 (A) i MRC-5 (B) ćelijskih linija

4.2.3. Efekat derivata kleke na apoptozu i zaustavljanje ćelijskog ciklusa

U sledećoj fazi istraživanja ispitan je efekat Jc-EU-P i PDO na ćelijski ciklus i tip ćelijske smrti A549 ćelija, korišćenjem protočne citometrije. Ćelije su tretirane koncentracijama koje su odgovarale IC_{50} vrednostima određenim za pojedinačne tretmane uljem (69,4 $\mu\text{g/mL}$) i PDO (1,27 mg/mL) tokom 24h. Međutim, kako je analiza pokazala da je procenat ćelija u kasnoj apoptozu i nekrozi pri koncentraciji od 1,27 mg/mL PDO bio izuzetno veliki (podaci nisu prikazani), bilo je neophodno testirati PDO u nižoj koncentraciji, pa je izabrana vrednost bila 0,3 mg/mL, pri kojoj je preživljavanje bilo veće od 70 %. Rezultati prikazani na Slici 16A ukazuju na slab efekat ulja koji se uočava kao blago povećanje broja ćelija u ranoj (aneksin⁺/PI⁻; 11,81 %) i kasnoj fazi apoptoze (aneksin⁺/PI⁺; 11,35 %) u poređenju sa kontrolom, dok je tretman ćelija sa PDO indukovao značajno povećanje procenta ćelija u ranoj i kasnoj apoptozu, koje je iznosilo 32,82 %, odnosno 21,43 %.



Slika 16. Efekat Jc-EU-P (69,4 $\mu\text{g/mL}$) i PDO (300 $\mu\text{g/mL}$) u A549 ćelijama i to:

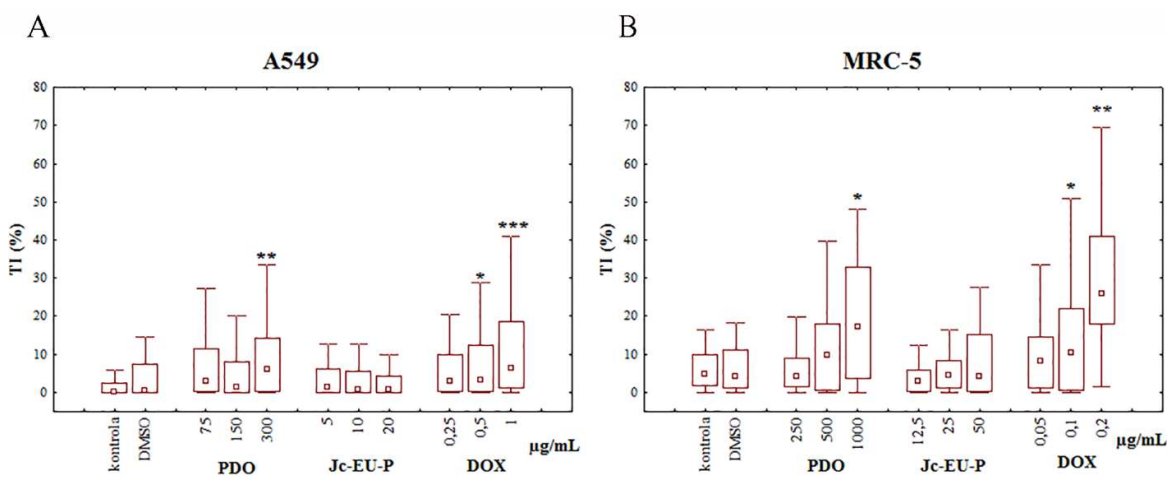
- (A) na indukciju rane i kasne apoptoze/nekroze (donji levi kvadrant - neoštećene ćelije, donji desni kvadrant - ćelije u ranoj apoptozu, gornji desni kvadrant - ćelije u kasnoj apoptozu/nekrozi, gornji levi kvadrant - ćelijski debri)
- (B) na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (marker M1 predstavlja sub-G₁ pik, koji potiče od populacije ćelija sa fragmentisanim DNK molekulima, tj. kasnoj apoptozu; M2 - ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara G₀/G₁ fazi ciklusa; M3- ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara S fazi replikacije; M4- ćelije sa DNK sadržajem koji odgovara G₂/M fazi ciklusa).

Analizom distribucije A549 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (Slika 16B) pokazano je da PDO dovodi do zastoja u G₂/M fazi ciklusa (52,98 % ćelija, u odnosu na kontrolu 39,92 %), pri čemu se broj ćelija u G₀/G₁ (16,05 %) i S (7,47 %) fazi značajno smanjio u odnosu na kontrolu, gde su odgovarajući procenti iznosili 62,95 % i 20,18 %. Istom analizom pokazano je da PDO povećava procenat ćelija u kasnoj apoptozu, odnosno u sub-G₁ fazi (23,80 % u tretmanu i 4,06 % u kontroli), što je predstavljeno jasno izdvojenim pikom na Slici 16B. Tretman uljem nije značajno uticao na distribuciju A549 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa: karakteriše ga blago povećanje broja ćelija u sub- G₁ fazi (za 8,82 %) i blago smanjenje u G₀/G₁ (za 8,17 %), dok je ćelijska distribucija u S fazi

nepromenjena (20,73 % u tretmanu i 20,18 % u kontroli), a u G₂/M fazi neznatno smanjena (procenti u tretmanu i kontroli su iznosili 11,86 % i 13,06 %).

4.2.4. Genotoksičnost test supstanci

Kako bi se proverilo da li se citotoksični efekat ostvaruje posredstvom genotoksičnog efekta, a ujedno testirao još jedan bezbednosni aspekt eventualne upotrebe derivata *J. communis*, ispitan je potencijal Jc-EU-P i PDO da deluju kao genotoksični agensi u MRC-5 i A549 ćelijama. Kao pozitivna kontrola korišćen je citostatik DOX. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 17 i u Tabelama 8.16 i 8.17 (Prilog). Analizom agaroznih gelova utvrđeno je da Jc-EU-P nije indukovalo značajno oštećenje DNK u ispitanim ćelijskim linijama ni na jednoj testiranoj koncentraciji. Nasuprot tome, PDO je pri koncentracijama 1000 µg/mL i 300 µg/mL doveo do značajnog povećanja nivoa oštećenja DNK u MRC-5 i A549 ćelijama. Pri tome je pokazao jači genotoksični potencijal na kancerskim (statistička značajnost razlike između odgovarajućeg tretmana i kontrole je na nivou $p < 0,01$) u poređenju sa normalnim ćelijama ($p < 0,05$). Sve testirane koncentracije DOX (osim onih najnižih) su pokazale da postoji statistički značajno povećanje nivoa oštećenja DNK, što je i očekivano, imajući u vidu da je DOX dokazano genotoksičan (Varela-López i sar., 2019).



Slika 17. Genotoksični efekat Jc-EU-P i PDO na A549 (A) i MRC-5 (B) ćelijama (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Mann Whitney U-test).

4.3. Antimikrobni potencijal derivata kleke

U okviru treće celine ovog istraživanja ispitan je antimikrobni potencijal derivata kleke prema odabranim bakterijama i gljivama. Najpre su ispitan pojedinačni efekti Jc-EU-P i PDO, ali i efekti njihovih kombinacija sa odabranim konvencionalnim antimikrobnim agensima. Dalji tok istraživanja je podrazumevao ispitivanje efekta derivata *J. communis* da moduliraju proces adhezije *in vitro*. Takođe, izvršena je uporedna analiza citotoksičnog i antimikrobnog potencijala, kako bi se dodatno ispitalo bezbednosni aspekt primene agenasa, odnosno utvrdila njihova selektivnost prema testiranim mikroorganizmima. Konačno, u završnoj fazi istraživanja ispitan je antimikrobni efekat etarskog ulja kleke u odabranom prehrambenom proizvodu, u ovom slučaju mesu, a u tu svrhu upotrebljeno je komercijalno nabavljeno ulje kleke Jc-EU-K.

4.3.1. Antifungalni i antibakterijski efekat pojedinačno primenjenih test supstanci

Antimikrobni potencijal Jc-EU-P i PDO ispitan je prema odabranim sojevima bakterija i gljiva, kontaminantima hrane, primenom mikrodilucionih testova. Antifungalni efekat ispitan je prema različitim mikromicetama iz rodova *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* i *Candida*. Kao pozitivne kontrole korišćeni su konvencionalni fungicidi: bif, kkz i dodatno nst u slučaju *C. albicans*. Antibakterijski efekat ulja i PDO praćen je prema gram-pozitivnim: *S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, i gram-negativnim bakterijama: *E. coli*, *S. flexneri*, *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa*. Kao pozitivne kontrole korišćeni su antibiotici str, amp, azm i rif.

MIK vrednost ulja za sve mikromicete bila je približno ista i iznosila je aproksimativno 12,5 mg/mL. MFK vrednost određena je samo za *C. albicans* i iznosila je 12,5 mg/mL, što ukazuje na fungicidni efekat (Tabela 17). Problem toksičnog efekta rastvarača DMSO u najvećoj testiranoj koncentraciji ulja onemogućilo je detekciju MFK vrednosti za ostale indikatorske sojeve. Sa druge strane, analizom rezultata MIK testa pokazano je da PDO ima značajno jači antifungalni efekat od ulja prema većini mikromiceta, osim prema *C. albicans* i *A. niger*. Dok su detektovane MIK vrednosti za PDO uglavnom bile u intervalu 0,119 - 0,9 mg/mL, a vrednosti MFK u opsegu 0,250 - 0,9 mg/mL, za *C. albicans* MIK vrednost je iznosila čak 7,64 mg/mL, a MFK vrednost nije ni određena. U opsegu testiranih koncentracija PDO nije delovao ni fungicidno ni fungistatički prema *A. niger*, što ukazuje na još veću rezistentnost ove gljive. Sa druge strane, najosetljivija mikromiceta je *A. versicolor* sa detektovanim vrednostima MIK i MFK od 0,119 mg/mL i 0,250 mg/mL. Antifungalni efekat PDO bio je uporediv sa efektom bfz, naročito u slučaju *A. versicolor* i *P. ochrochloron*, dok je antifungalni efekat ulja bio značajno slabiji u poređenju sa efektom svih korišćenih konvencionalnih fungicida.

Antibakterijski efekat Jc-EU-P i PDO ispitan je prema različitim bakterijama, pri čemu su gram-pozitivne bile osetljivije na delovanje PDO u poređenju sa gram-negativnim (Tabela 18). Testirani derivati su ispoljili najveću aktivnost prema *L. monocytogenes* (MIK/MBK 3,30/6,25 mg/mL za Jc-EU-P; MIK/MBK 0,39/0,74 mg/mL za PDO). Nešto manje osetljive bile su *S. aureus* (MIK/MBK 5,90/13,89 mg/mL za ulje; MIK/MBK 3,47/11,81 mg/mL za PDO) i MRSA (MIK/MBK 6,25/11,81 mg/mL za ulje; MIK/MBK 3,82/11,81 mg/mL za PDO). Sa druge strane, antibakterijski efekat ulja prema gram-negativnim bakterijama je bio slabiji; jedine vrednosti MIK/MBK bile su određene za *S. flexneri*, dok efekat na *E. coli*, *S. Enteritidis* i *P. aeruginosa*, u opsegu testiranih koncentracija, nije bio uočen. Antibakterijska aktivnost PDO uočena je prema svim gram-negativnim bakterijama, a najosetljivije među njima bile su *S. flexneri* i *P. aeruginosa*, pri čemu su MIK vrednosti iznosile 2,96 i 4,47 mg/mL. U okviru testiranih koncentracija PDO, baktericidne koncentracije nisu određene kod gram-negativnih bakterija.

Na delovanje antibiotika str većina bakterija je bila osetljiva, osim *E. faecalis*. MIK vrednosti su zabeležene u opsegu 1,91-13,89 µg/mL, u zavisnosti od osetljivosti soja. Na delovanje amp bakterije su pokazale najmanju osetljivost – čak pet testiranih sojeva bilo je rezistentno (MRSA, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. Enteritidis* i *P. aeruginosa*). Zatim, na delovanje azm jedino je MRSA bila rezistentna. Gram-pozitivne bakterije su bile najosetljivije na delovanje rif: MIK vrednosti su bile u opsegu 0,09 - 5,90 µg/mL, a MBK u opsegu 0,39 - 23,61 µg/mL; rezistentnih bakterija nije bilo. Uopšteno govoreći, vrednosti MIK i MBK dobijene za Jc-EU-P i PDO su bile veće od vrednosti za referentne antibiotike, što ukazuje na slabiji antibakterijski potencijal ispitanih jedinjenja u poređenju sa pozitivnim kontrolama.

Tabela 17. Antifungalni efekat Jc-EU-P, PDO i konvencionalnih fungicida

Mikromicete	Jc-EU-P		PDO		bif		kkz		nst	
	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK
<i>A. fumigatus</i>	11,11±2,76	nd	0,425±0,075	0,900±0,00	156,44±56,44	213,33±64,00	8,89±2,67	17,78±5,33	nt	nt
<i>A. versicolor</i>	11,81±2,08	nd	0,119±0,047	0,250±0,075	106,67±32,00	199,11±67,46	4,00±0,00	7,11±1,76	nt	nt
<i>A. ochraceus</i>	12,50±0,00	nd	0,400±0,99	0,850±0,150	142,22±42,67	184,89±67,46	9,78±3,53	19,56±7,06	nt	nt
<i>A. niger</i>	13,89±4,17	nd	nd	nd	156,44±56,44	199,11±67,46	8,00±0,00	19,56±7,06	nt	nt
<i>T. viride</i>	11,81±2,8	nd	0,225±0,00	0,550±0,198	142,22±42,67	213,33±64,00	19,56±7,06	39,11±14,11	nt	nt
<i>P. ochrochloron</i>	11,81±2,08	nd	0,250±0,075	0,450±0,00	199,11±67,46	241,78±42,67	4,44±1,33	9,78±3,53	nt	nt
<i>P. funiculosum</i>	12,50±0,00	nd	0,425±0,075	0,900±0,00	213,33±64,00	241,78±42,67	4,44±1,33	15,11±2,67	nt	nt
<i>P. verrucosum var. cyclopium</i>	11,11±2,76	nd	0,900±0,00	nd	184,89±67,46	284,47±85,33	5,78±2,11	17,78±5,33	nt	nt
<i>C. albicans</i>	11,81±2,08	12,5±5,41	7,64±2,76	nd	4722,22±833,33	5000,00±0,00	39,00±0,00	39,11±14,11	1,78±0,44	4,44±1,33

nd - nije detektovano u ispitanom opsegu koncentracije.

nt - nije testirano.

MIK i MFK vrednosti izražene u mg/mL za Jc-EU-P i PDO i µg/mL za fungicide

Tabela 18. Antibakterijski efekat Jc-EU-P, PDO i konvencionalnih antibiotika

Bakterije	Jc-EU-P		PDO		str		amp		azm		rif	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
<i>S. aureus</i>	5,90±1,04	13,89±4,17	3,47±1,04	11,81±2,08	6,94±3,41	13,19±4,88	12,50±5,41	26,39±9,77	2,26±0,83	23,61±4,17	0,09±0,02	0,87±0,26
MRSA	6,25±2,71	11,81±2,08	3,82±1,38	11,81±2,08	13,19±4,88	13,19±4,88	nd	nd	nd	nd	0,11±0,03	0,74±0,13
<i>E. faecalis</i>	11,11±2,71	13,89±4,17	12,50±0,00	23,61±4,17	nd	nd	nd	nd	29,17±12,50	31,94±14,13	5,90±1,04	23,61±4,17
<i>L. monocytogenes</i>	3,30±1,22	6,25±0,00	0,39±0,17	0,74±0,13	13,19±4,88	13,19±4,88	52,78±19,54	61,11±22,05	3,82±1,38	7,64±2,76	0,39±0,17	0,39±0,00
<i>E. coli</i>	nd	nd	6,25±0,00	nd	6,94±2,08	7,64±2,76	nd	nd	52,78±19,54	94,44±16,67	88,89±22,05	nd
<i>S. flexneri</i>	11,81±2,08	23,61±4,17	2,96±0,50	nd	1,91±0,69	2,08±0,78	55,56±16,66	88,89±22,05	5,90±2,90	12,50±5,41	88,89±22,05	nd
<i>S. Enteritidis</i>	nd	nd	13,89±4,17	nd	3,82±1,38	13,89±4,17	nd	nd	47,22±8,33	nd	94,44±16,67	nd
<i>P. aeruginosa</i>	nd	nd	3,47±1,04	nd	13,89±4,17	55,55±16,66	nd	nd	88,89±22,05	nd	88,89±22,05	nd

nd – nije detektovano u ispitanom opsegu koncentracije.

MIK i MBK vrednosti izražene u mg/mL za Jc-EU-P i PDO i µg/mL za antibiotike

4.3.2. Antimikrobni potencijal kombinacije derivata kleke i antibiotika/antimikotika

Antimikrobna aktivnost derivata kleke ispitana je i u kombinaciji sa odabranim konvencionalnim antimikrobnim agensima metodom šahovske table (*Checkerboard assay*), u cilju evaluacije potencijalne *in vitro* sinergije dva agensa. Na osnovu rezultata MIK testa na testiranim bakterijama za dalja istraživanja odabrana je *L. monocytogenes* kao najosetljivija na delovanje Jc-EU-P i PDO, pa je na njoj ispitan kombinovani efekat ulja/PDO sa antibioticima str, amp i azm. Sa druge strane, iako *C. albicans* nije bila osetljivija od drugih u MIK testu, u odnosu na druge testirane gljive, antifungalni efekat kombinacije ulja/PDO sa konvencionalnim mikotikom bif ispitana je upravo na ovom model organizmu, koji je odabran zbog velike incidence i teškoća u lečenju kandidijaza, uzrokovanih učestalim razvojem rezistencije. Rezultati *Checkerboard* testa prikazani su u Tabelama 19 i 20. Dobijene MIK vrednosti za svaku ispitanu kombinaciju test supstanci korišćene su za određivanje indeksa frakcione inhibitorne koncentracije (FIC indeksa, FIC_i).

Tabela 19. Antibakterijski efekat za kombinacije Jc-EU-P/PDO i antibiotika str, amp i azm prema *L. monocytogenes*

Jc-EU-P (MIK)	str (MIK)	FIC _i	interakcija	PDO (MIK)	str (MIK)	FIC _i	interakcija
2	1/32	2,031	indiferentna	4	1/32	4,031	antagonistička
1	1/8	1,125	indiferentna	2	1/32	2,031	indiferentna
1/2	1/4	0,750	aditivna	1	1/32	1,031	indiferentna
1/4	1/4	0,500	sinergizam	1/2	1/32	0,531	aditivna
1/8	1/4	0,375	sinergizam	1/4	1/32	0,281	sinergizam
1/16	1/4	0,312	sinergizam	1/8	1/32	0,156	sinergizam
1/32	2	2,031	indiferentna	1/16	1	1,062	indiferentna
1/64	2	2,016	indiferentna	1/32	1	1,031	indiferentna

Jc-EU-P (MIK)	amp (MIK)	FIC _i	interakcija	PDO (MIK)	amp (MIK)	FIC _i	interakcija
2	1/64	2,016	indiferentna	4	1/32	4,031	antagonistička
1	1/16	1,062	indiferentna	2	1/32	2,031	indiferentna
1/2	1/8	0,625	aditivna	1	1/32	1,031	indiferentna
1/4	1/8	0,375	sinergizam	1/2	1/32	0,531	aditivna
1/8	1/8	0,250	sinergizam	1/4	1/32	0,281	sinergizam
1/16	1/8	0,188	sinergizam	1/8	1/4	0,375	sinergizam
1/32	2	2,031	indiferentna	1/16	1/2	0,562	aditivna
1/64	2	2,016	indiferentna	1/32	1/2	0,531	aditivna

Jc-EU-P (MIK)	azm (MIK)	FIC _i	interakcija	PDO (MIK)	azm (MIK)	FIC _i	interakcija
2	1/8	2,125	indiferentna	4	1/32	4,031	antagonistička
1	1/2	1,500	indiferentna	2	1/32	2,031	indiferentna
1/2	1/2	1,000	aditivna	1	1/32	1,031	indiferentna
1/4	1/2	0,750	aditivna	1/2	1/32	0,531	aditivna
1/8	1	1,125	indiferentna	1/4	1/32	0,281	sinergizam
1/16	1	1,062	indiferentna	1/8	1/4	0,375	sinergizam
1/32	2	2,031	indiferentna	1/16	1/4	0,312	sinergizam
1/64	2	2,016	indiferentna	1/32	1/4	0,281	sinergizam

Opseg testiranih koncentracija u kombinacijama sa uljem 2xMIK – 1/64xMIK, odnosno u kombinacijama sa PDO 4xMIK – 1/32xMIK. Sinergizam FIC_i ≤ 0,5; Aditivni efekat 0,5 < FIC_i ≤ 1; Indiferentni efekat 1 < FIC_i ≤ 4; Anagonizam FIC_i > 4.

U kombinacijama Jc-EU-P sa različitim antibioticima uočeni su svi tipovi interakcija, osim antagonističkih. Dalje, kombinovanjem pojedinih koncentracija ulja (1/4, 1/8, 1/16xMIK) i str (1/4xMIK) ili amp (1/8xMIK) i analizom tipa interakcije, uočen je sinergistički efekat. U slučaju ispitivanja kombinovanog efekta PDO sa različitim antibioticima, uočeno je prisustvo svih tipova

interakcija (od sinergizma do antagonizma). U sledećim navedenim kombinacijama: PDO (1/4 i 1/8xMIK) + str (1/32xMIK); PDO (1/4xMIK) + amp (1/32xMIK); PDO (1/8xMIK) + amp (1/4xMIK); PDO (1/4xMIK) + azm (1/32xMIK) i PDO (1/8, 1/16, 1/32xMIK) + azm (1/4xMIK), agensi su ostvarili sinergistički efekat, dok je kod onih sa najvećim koncentracijama PDO i najmanjim koncentracijama antibiotika uočen blagi antagonistički efekat (FIC_i vrednost je iznosila 4,031). Kombinacija sub-inhibitornih koncentracija PDO (1/8xMIK) i str (1/32xMIK) se pokazala kao najefikasnija, pri čemu je vrednost FIC_i iznosila 0,156. Generalno, ispitivanje kombinovanog efekta derivata kleke sa različitim antibioticima kao rezultat ima smanjenje njihovih efektivnih koncentracija, odnosno vrednosti MIK. Konkretno, u kombinacijama ulja sa antibioticima str i amp, vrednost MIK str smanjena je 4 puta, a u slučaju amp čak 8 puta. U kombinaciji sa različitim antibioticima, efekat PDO je bio izraženiji, pri čemu su MIC vrednosti str, amp i azm bile smanjene i do 32 puta.

Tabela 20. Antifungalni efekat za kombinacije Jc-EU-P/PDO i fungicida bif prema *C. albicans*

Jc-EU-P (MIK)	bif (MIK)	FIC _i	interakcija	PDO (MIK)	bif (MIK)	FIC _i	interakcija
2	1/64	2,016	indiferentna	1	1/64	1,016	indiferentna
1	1/64	1,016	indiferentna	1/2	1/64	0,516	aditivna
1/2	1/64	0,516	aditivna	1/4	1/32	0,281	sinergizam
1/4	1/2	0,750	aditivna	1/8	1/16	0,188	sinergizam
1/8	1/2	0,625	aditivna	1/16	1/16	0,125	sinergizam
1/16	1/2	0,563	aditivna	1/32	1/8	0,156	sinergizam
1/32	1	1,031	indiferentna	1/64	1/8	0,141	sinergizam
1/64	1	1,016	indiferentna				

Opseg testiranih koncentracija test supstanci je iznosio: od 2xMIK - 1/64xMIK za ulje, odnosno od 1xMIK - 1/64xMIK za PDO i bif. Sinergizam FIC_i ≤ 0,5; Aditivni efekat 0,5 < FIC_i ≤ 1; Indiferentni efekat 1 < FIC_i ≤ 4; Anagonizam FIC_i > 4.

Rezultati kombinovanog efekta u slučaju *C. albicans* ukazuju uglavnom na aditivni ili indiferentni efekat ulja i bif (Tabela 20). Sa druge strane, kada je umesto ulja korišćen PDO, uočen je sinergistički efekat u svim kombinacijama, osim u slučaju PDO (1xMIK i 1/2xMIK) i bif (1/64xMIK), kada je uočeni efekat bio indiferentni ili aditivan. Najefikasnija kombinacija bila je ona koja je sadržala PDO (1/16xMIK) i bif (1/16xMIK), pri čemu je vrednost FIC_i iznosila 0,125.

4.3.3. Selektivni antimikrobni efekat derivata kleke

U cilju procene selektivne toksičnosti derivata kleke prema mikroorganizmima u odnosu na testirane ćelijske linije, računat je indeks selektivnosti (SI_M). SI_M predstavlja logaritam odnosa između vrednosti IC₅₀ i MIK dobijenih u MTT, odnosno mikrodilucionom testu; pozitivna vrednost ovog indeksa označava da postoji selektivni antimikrobni efekat koji je utoliko veći, ukoliko je ova vrednost veća. Vrednosti SI_M za Jc-EU-P su bile negativne (oko - 2,0) što ukazuje na veću toksičnost ulja prema sisarskim ćelijama (Tabela 21). Ovo nije iznenađujuće, budući da su rezultati MIK testa i MTT testa već pokazali slab antimikrobni potencijal i relativno veliku citotoksičnost ovog derivata. Međutim, u slučaju PDO dobijene su i pozitivne i negativne vrednosti SI_M, što ukazuje na njegovu različitu selektivnu toksičnost. U odnosu na sve korišćene sisarske ćelijske linije, PDO je pokazao jasnu selektivnu toksičnost prema gljivama (osim *C. albicans*) i prema *L. monocytogenes* (0,1 ≤ SI_M ≤ 1,8). Dodatno, ako analizu vršimo u odnosu na HCT116 liniju, postoji neznatna selektivnost PDO i prema većini bakterija (osim *E. faecalis* i *S. Enteritidis*), gde je pozitivna vrednost SI_M bila u intervalu 0,04-0,4.

Tabela 21. Selektivni indeks (SI_M) određen za Jc-EU-P i PDO

Sojevi mikroorganizama	Jc-EU-P				PDO			
	MRC-5	A549	HT-29	HCT116	MRC-5	A549	HT-29	HCT116
<i>S. aureus</i>	-1,7	-2,0	-1,9	-1,6	-0,08	-0,4	-0,4	0,3
MRSA	-1,7	-2,0	-1,9	-1,6	-0,1	-0,5	-0,4	0,3
<i>E. faecalis</i>	-2,0	-2,2	-2,1	-2,1	-0,6	-1,0	-0,9	-0,3
<i>L. monocytogenes</i>	-1,4	-1,7	-1,6	-1,3	0,9	0,5	0,6	1,2
<i>E. coli</i>	nd	nd	nd	nd	-0,3	-0,7	-0,6	0,04
<i>S. flexneri</i>	-2,0	-2,2	-2,1	-2,1	-0,01	-0,4	-0,3	0,4
<i>S. Enteritidis</i>	nd	nd	nd	nd	-0,7	-1,0	-1,0	-0,3
<i>P. aeruginosa</i>	nd	nd	nd	nd	-0,08	-0,4	-0,4	0,3
<i>A. fumigatus</i>	-2,0	-2,2	-2,1	-1,8	0,8	0,5	0,5	1,2
<i>A. versicolor</i>	-2,0	-2,2	-2,1	-1,9	1,4	1,0	1,1	1,8
<i>A. ochraceus</i>	-2,0	-2,3	-2,2	-1,9	0,9	0,5	0,6	1,2
<i>A. niger</i>	-2,1	-2,3	-2,2	-1,9	nd	nd	nd	nd
<i>T. viride</i>	-2,0	-2,2	-2,1	-1,9	1,1	0,8	0,8	1,5
<i>P. ochrochloron</i>	-2,0	-2,2	-2,1	-1,9	1,1	0,7	0,8	1,4
<i>P. funiculosum</i>	-2,0	-2,3	-2,2	-1,9	0,8	0,5	0,5	1,2
<i>P. verrucosum</i> var. cyclopium	-2,0	-2,2	-2,1	-1,8	0,5	0,1	0,2	0,9
<i>C. albicans</i>	-2,0	-2,2	-2,1	-1,9	-0,4	-0,8	-0,7	-0,05

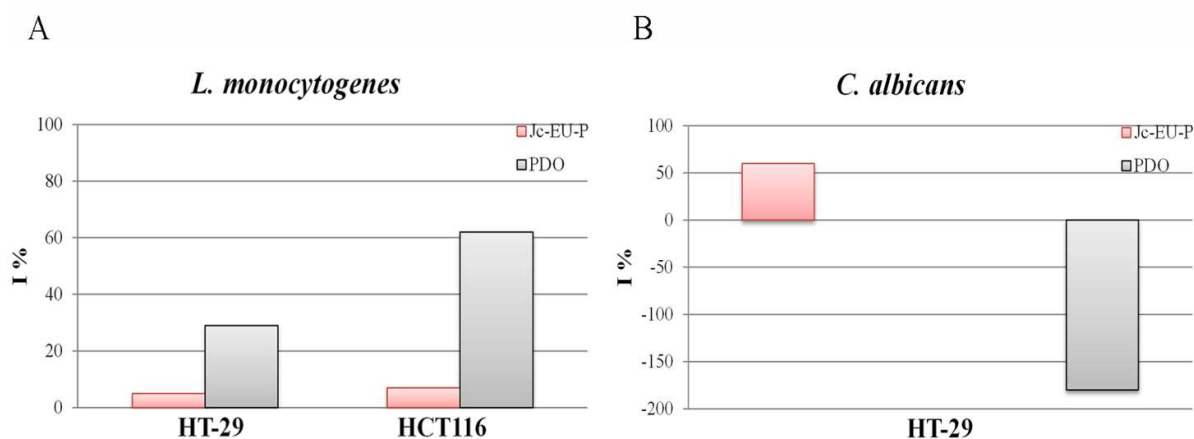
$SI_M = \log (IC_{50}/MIK)$

nd-nije detektovano jer nije određena MIK vrednost u testiranom opsegu

4.3.4. Efekat derivata klike na adheziju patogena *in vitro*

Za testiranje efekta test supstanci na sposobnost adhezije patogena/oportunističkih patogena na sisarske ćelije gajene *in vitro*, odabrane su kvasnica *C. albicans* i bakterija *L. monocytogenes*. Činjenice da se u digestivnom traktu čoveka normalno nalazi *C. albicans*, koja u slučaju prenamnoženosti dovodi do kandidijaza, kao i da se *L. monocytogenes* smatra jednim od najčešćih kontaminenata hrane, usmerila nas je da tragamo za potencijalnim efektom na adheziju upravo na receptore ćelija creva, tako da je analiza vršena na ćelijskim linijama kolona HT-29, a u slučaju listerije dodatno i na ćelijama HCT116. Zatim, imajući u vidu indekse selektivnosti, test adhezivnosti je bio primenjen u dve varijante: u slučaju selektivnog efekta test supstance (efekat PDO na *L. monocytogenes*), ona je primenjena u tzv. ko-tretmanu mikroorganizama i sisarskih ćelija, dok su u slučaju neselektivnog efekta agensa na odabrane patogene, test supstance primenjene u tzv. pretretmanu mikroorganizama kako bi se sprečilo ispoljavanje letalnog efekta test supstanci na sisarskim ćelijama.

Procenat adheriranih ćelija je računat kao odnos broja adheriranih ćelija mikroorganizama i njihovog ukupnog polaznog broja. Polazna pretpostavka je bila ta da će primenom različitih koncentracija test supstanci u tretmanu odabranih patogena biti moguće inhibirati proces njihove adhezije na ćelije kolona. Imajući u vidu da nam nije bio cilj da inhibiramo rast patogena, već da ispitamo efekat derivata na adheziju, za testiranje su odabrane sub-inhibitorne koncentracije Jc-EU-P i PDO koje su iznosile $1/2xMIK$. Rezultati testa adhezivnosti prikazani su na Slici 18 i u Tabeli 8.18 (Prilog).



Slika 18. Efekat Jc-EU-P i PDO na adheziju *L. monocytogenes* i *C. albicans* na HT-29 i HCT116 ćelije

Dobijeni rezultati su pokazali da je PDO značajno inhibirao proces adhezije u slučaju *L. monocytogenes* (Slika 18A). Inhibitorni potencijal je bio izraženiji kada su u pitanju HCT116 ćelije (62 %), nego što je to bilo u slučaju HT-29 ćelija, kada je procenat inhibicije adhezije iznosio 29 %. S druge strane, efekat Jc-EU-P na adheziju listerije je bio zanemarljiv: inhibicija adhezije na HT-29 i HCT116 ćelije iznosila je 5 % i 7 %. U slučaju *C. albicans* dobijeni rezultati su ukazali na visok potencijal ulja da inhibira proces adhezije na HT-29 ćelije: inhibicija adhezije iznosila je 60 % (Slika 18B). Međutim, isti eksperiment sa PDO pokazao je da ova supstanca ne samo što nije inhibirala adheziju, već je ovaj proces stimulisala (stimulacija je iznosila 180 %).

4.3.5. Antimikrobni potencijal kleke u prehrambenim proizvodima

U okviru poslednje faze istraživanja antimikrobnog potencijala, akcenat je bio na ispitivanju mogućnosti primene etarskog ulja *Juniperus communis* u hrani, za šta su primenjeni antimikrobni testovi *in vitro* i *in situ* na mesu. Za testiranje je odabrano komercijalno nabavljeno ulje kleke (Jc-EU-K). Kao pozitivnu kontrolu koristili smo komercijalno nabavljeno etarsko ulje *Satureja montana* (Sm-EU), poznate aromatične i začinske biljke, koje ima dokazan antimikrobni potencijal (Djenane et al., 2011). Pre nego što smo pristupili ispitivanju antimikrobnog potencijala, analiziran je hemijski sastav oba ulja, koji je prikazan u Tabeli 10 (vidi poglavlje 4.1.1.).

4.3.5.1. Antilisterijalni efekat etarskih ulja i tip interakcije u binarnim kombinacijama

Antimikrobni efekat Jc-EU-K i Sm-EU, pojedinačno i u kombinaciji, ispitan je prema bakteriji *L. monocytogenes*. Naime, za ispitivanje antilisterijalnog efekta opredelili smo se na osnovu prethodno dobijenih rezultata istraživanja antibakterijskog efekta ulja kleke Jc-EU-P, koje je najefektivnije bilo upravo prema *L. monocytogenes*. Pored laboratorijskog soja ATCC 19111, u istraživanje su uključeni i primoizolati iz hrane i objekta za njenu preradu, i to: LMB, izolat sa trupa govečeta; LMS, izolat sa tela lososa i LMT, izolat iz tunela za odvodnjavanje klanice. Rezultati su prikazani u Tabeli 22. MIK i MBC vrednosti su izražene kao % (v/v), što je čest način kvantifikacije antimikrobnog potencijala u prehrambenoj mikrobiologiji, ali i u mg/mL (zbog uporedivosti sa prethodno prikazanim rezultatima). Iz Tabele je vidljivo da oba ulja pokazuju umeren i uporediv antilisterijalni efekat, sa inhibitornim potencijalom u opsegu 0,5 – 1 % i boljim baktericidnim efektom Sm-EU. Efekat Sm-EU je bio najjači prema referentnom soju (MIK = 0,5 %; MBK = 1 %), dok su vrednosti MIK i MBK prema izolatima bile ujednačene i iznosile 1 %. Sa druge strane, Jc-EU-K je ostvarilo najjači efekat prema LMT izolatu (MIK = 0,5 %; MBK = 1 %),

dok je najslabiji bio prema LMB izolatu (MIK = 1 %; MBK = 4 %). Vredno je napomenuti i da je efekat Jc-EU-K prema referentnom soju *L. monocytogenes* bio slabiji u odnosu na ranije testirano Jc-EU-P (vidi Tabelu 18 u poglavlju 4.3.1.), sa nešto većom vrednosti MIK (4,6 vs. 3,3 mg/mL za Jc-EU-K i Jc-EU-P), ali značajno većom vrednosti MBK (skoro 3x veća vrednost je određena za komercijalno ulje, tj. 18,4 vs. 6,25 mg/mL).

Tabela 22. MIK i MBK vrednosti etarskih ulja *J. communis* i *S. montana* prema odabranim sojevima *L. monocytogenes*

Soj	Jc-EU-K		Sm-EU	
	MIK/MBK (%)	MIK/MBK (mg/mL)	MIK/MBK (%)	MIK/MBK (mg/mL)
ATCC 19111	0,5/2,0	4,6/18,4	0,5/1,0	4,3/8,6
LMB	1,0/4,0	9,2/36,8	1,0/1,0	8,6/8,6
LMS	0,5/2,0	4,6/18,4	1,0/1,0	8,6/8,6
LMT	0,5/1,0	4,6/9,2	1,0/1,0	8,6/8,6

1 % = 9,2 mg/mL Jc-EU-K; 1 % = 8,6 mg/mL Sm-EU

U daljem istraživanju, primenom metode šahovske table, ispitan je antibakterijski efekat različitih kombinacija ulja Jc-EU-K i Sm-EU prema odabranim sojevima *L. monocytogenes*. Računanjem FICi indeksa analiziran je i tip interakcija u kombinacijama. Kao što je već istaknuto, oba agensa primenjena su u opsegu koncentracija $2 \times \text{MIK}$ - $1/64 \times \text{MIK}$. Rezultati *Checkerboard* testa ukazuju na značajno veću osetljivost izolata u poređenju sa referentnim sojem (Tabela 23). Naime, u različitim kombinacijama ulja ostvareni efekat je uglavnom bio indiferentan prema referentnom soju ATCC 19111, dok je samo za jednu kombinaciju bio aditivan. Sa druge strane, kada je reč o primoizolatima, ostvaren je jasan sinergistički efekat ulja: najniže FICi vrednosti iznosile su 0,281 u slučaju LMB izolata, i 0,266 u slučaju druga dva izolata (LMS i LMT).

U daljem radu nameravali smo da ispitamo dinamiku inhibicije rasta test supstancama, i to u *in vitro* i *in situ* uslovima. Međutim, kako je broj sinergističkih kombinacija dobijenih u metodi šahovske table bio veliki, bilo je potrebno odabrati kako test sojeve, tako i odgovarajuće kombinacije za dalje testiranje. Budući da je krajnji cilj ovog dela istraživanja ispitivanje antibakterijskog efekta pomenutih ulja na junećem mesu *in situ*, za dalja istraživanja odabrani su LMB izolat i referentni soj ATCC 19111. Za izbor kombinacija agenasa koji će biti testirani, bilo je neophodno najpre uraditi senzorne analize.

Tabela 23. Kombinovani efekat ulja *J. communis* i *S. montana* prema odabranim sojevima *L. monocytogenes*

Jc-EU-K (MIK)	Sm-EU (MIK)	FICi	interakcija	Jc-EU-K (MIK)	Sm-EU (MIK)	FICi	interakcija
ATCC 19111				LMS			
2	1/64	2,016	indiferentna	2	1/64	2,016	indiferentna
1	1/64	1,016	indiferentna	1	1/64	1,016	indiferentna
1/2	1/4	0,750	aditivna	1/2	1/8	0,625	aditivna
1/4	1	1,250	indiferentna	1/4	1/8	0,375	sinergizam
1/8	1	1,125	indiferentna	1/8	1/4	0,375	sinergizam
1/16	1	1,062	indiferentna	1/16	1/4	0,312	sinergizam
1/32	1	1,031	indiferentna	1/32	1/4	0,281	sinergizam
1/64	1	1,016	indiferentna	1/64	1/4	0,266	sinergizam
Jc-EU-K (MIK)	Sm-EU (MIK)	FICi	interakcija	Jc-EU-K (MIK)	Sm-EU (MIK)	FICi	interakcija
LMB				LMT			
2	1/64	2,016	indiferentna	2	1/64	2,016	indiferentna
1	1/64	1,016	indiferentna	1	1/64	1,016	indiferentna
1/2	1/64	0,516	aditivna	1/2	1/4	0,750	aditivna
1/4	1/8	0,375	sinergizam*	1/4	1/4	0,500	sinergizam
1/8	1/4	0,375	sinergizam	1/8	1/4	0,375	sinergizam
1/16	1/4	0,312	sinergizam	1/16	1/4	0,312	sinergizam
1/32	1/4	0,281	sinergizam	1/32	1/4	0,281	sinergizam
1/64	1/2	0,516	aditivna	1/64	1/4	0,266	sinergizam

Sinergizam $FICi \leq 0,5$; Aditivni efekat $0,5 < FICi \leq 1$; Indiferentni efekat $1 < FICi \leq 4$; Anagonizam $FICi > 4$.

*Senzorno prihvatljiva inhibitorna kombinacija, koja je odabrana za dalja ispitivanja; ona sadrži 0,25 % Jc-EU-K i 0,125 % Sm-EU (videti kasnije)

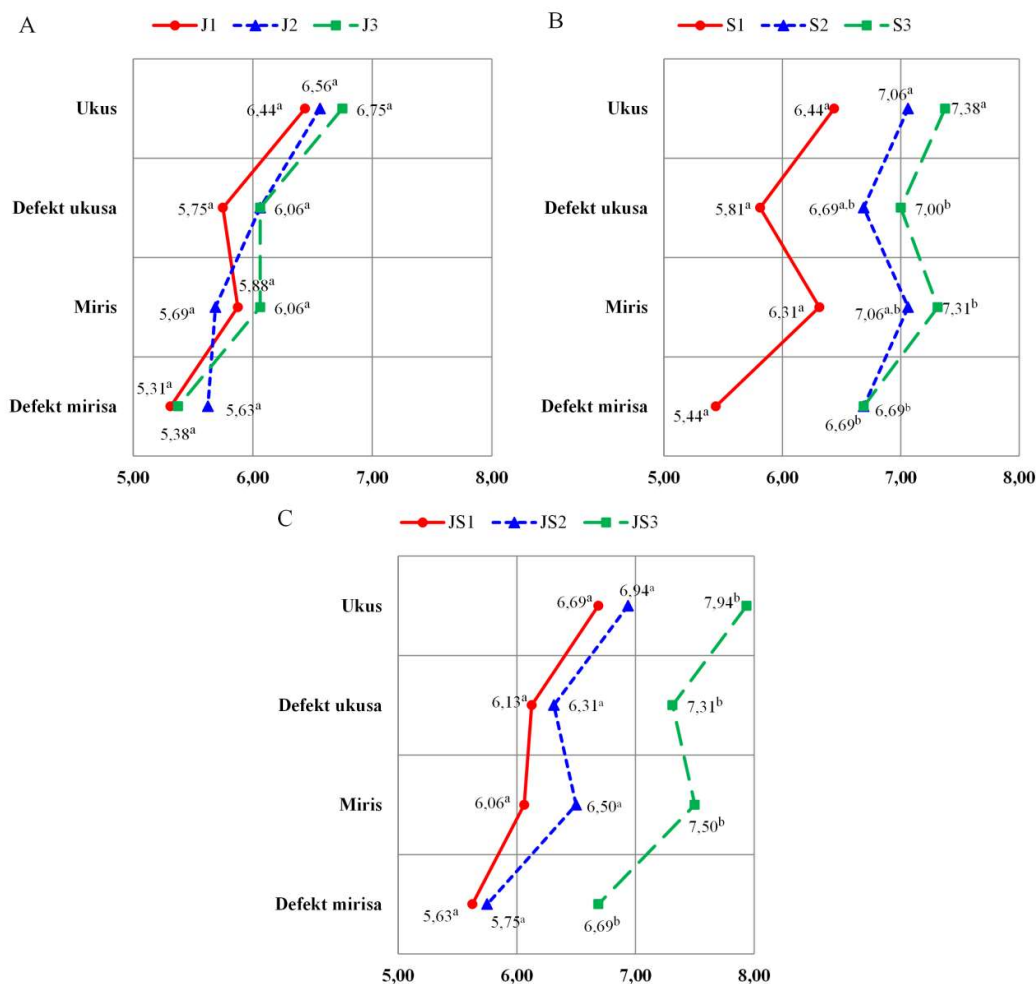
4.3.5.2. Analiza senzorne prihvatljivosti

U ovom istraživanju ispitan je uticaj Jc-EU-K i Sm-EU na senzorna svojstva junećeg mesa, obrađenog na odgovarajući način. Kako je bila namera istražiti antibakterijski efekat test supstanci u mesu mariniranom u crvenom vinu, u ovoj fazi su utvrđivane koncentracije Jc-EU-K i Sm-EU, kao i njihove kombinacije, koje su senzorno najprihvatljivije. U preliminarnim istraživanjima trebalo je, na osnovu rezultata dobijenih u *Checkerboard* analizi, izabrati odnos oba agensa, koji je, u kontekstu mirisa i ukusa, najbolji za dalje analize. Na osnovu dobijenih rezultata preliminarne analize (preliminarna analiza mirisa i ukusa vina s dodatkom različitih koncentracija pojedinačnih ulja ili njihovih kombinacija, Tabela 8.19, Prilog), opredelili smo se za kombinacije ulja primenjene u odnosu Jc-EU-K:Sm-EU = 2:1, što je odgovaralo sinergističkoj kombinaciji 1/4 MIK Jc-EU-K (0,25 %) i 1/8 MIK Sm-EU (0,125 %) za LMB izolat (obeležena u Tabeli 23).

Zatim se pristupilo pravoj senzornoj analizi, koja je obuhvatala determinaciju organoleptičkih svojstava na odgovarajući način obrađenog junećeg mesa: uzorci mesa su marinirani u marinadama od crvenog vina sa dodatkom osnovnih začina (so, crni biber i beli luk), u prisustvu tri različite koncentracije ulja, pojedinačno ili u kombinacijama odgovarajućeg odnosa. Uzorci su analizirani pomoću skale intenziteta ukusa i mirisa, i ocenjeni ocenama od 1-9 (ocena 5 odgovara intenzitetima netretirane kontrole, manje vrednosti ukazuju na slabiji intenzitet mirisa/ukusa, a veće na njihov veći intenzitet), pri čemu su uzorci ocenjeni između 3 i 7 bili senzorno prihvatljivi. Dodatno, skala intervala 5-9 je korišćena za kvantifikovanje defekata ova dva senzorna svojstva (ocena 5 – odsustvo defekta, ocena 9 – defekt najizraženiji). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 19. Svi uzorci u koje je dodato Jc-EU-K u koncentracijama 0,5 %, 0,25 % ili 0,125 % bili su bolje ocenjeni i senzorno prihvatljiviji (vrednost na skali intenziteta je bila ispod 7,

Slika 19a), u poređenju sa uzorcima u koje je dodato Sm-EU. Takođe, za sve tri koncentracije Jc-EU-K nije bilo statistički značajne razlike između uzoraka u okviru svakog organoleptičkog svojstva ($p > 0,05$). Uzorci u koje je dodato Sm-EU u koncentraciji od 0,0625 % bili su senzorno prihvatljivi, uzorci sa dodatkom 0,125 % bili su na granici prihvatljivosti, dok je uzorak sa najvećom koncentracijom od 0,5 % bio najlošije ocenjen i iznad gornje granice prihvatljivosti (vrednost na skali intenziteta je bila preko 7, Slika 19b). Uzorci sa najvišim dodatim koncentracijama Sm-EU imali su jako izražen miris i ukus karakterističan za dodato ulje. Ocene ukazuju na oštrinu i jačinu mirisa, odnosno na intenzivan, gorak i veštački ukus ovog ulja. U okviru ocenjenih organoleptičkih svojstava za miris (defekt mirisa i defekt ukusa) primećeno je da postoji statistički značajna razlika između uzoraka sa najnižim i najvišim koncentracijama Sm-EU ($p < 0,05$).

Interesantno, analiza organoleptičkih svojstava kombinacija ukazala je da su defekti koji potiču od Sm-EU bili ublaženi dodavanjem Jc-EU-K. Iako je ocena uzorka sa koncentracijom Sm-EU od 0,125 % bila na granici prihvatljivosti, kombinacija ulja Jc-EU-K 0,25 % + Sm-EU 0,125 % bila je senzorno prihvatljiva, dok je kombinacija Jc-EU-K 0,5 % + Sm-EU 0,25 % bila senzorno neprihvatljiva (Slika 19c). Statistički značajna razlika za sve parametre senzorne analize postoji između uzoraka sa dodatkom nižih koncentracija oba ulja u poređenju sa uzorcima koji sadrže najveće koncentracije ulja ($p < 0,05$).



Slika 19. Senzorna analiza mariniranog junećeg mesa sa dodatkom etarskih ulja A) Jc-EU-K (J1=0,125 %, J2=0,25 %, J3=0,5 %); B) Sm-EU (S1=0,0625 %, S2=0,125 %, S3=0,25 %); C) JS smeša (J1+S1, J2+S2, J3+S3). Malim slovima su obeležene srednje vrednosti ocenjenih uzoraka koji se statistički značajno razlikuju u okviru istog organoleptičkog svojstva ($p < 0,05$).

Imajući u vidu rezultate senzorne i *Checkerboard* analize, odabrane su koncentracije agenasa i njihove kombinacije za dalja testiranja: 0,25 % Jc-EU-K, 0,125 % Sm-EU i njihova smeša 0,25 % Jc-EU-K + 0,125 % Sm-EU.

4.3.5.3. Dinamika inhibicije rasta sojeva *L. monocytogenes*

Primenom *Time kill* testa praćena je dinamika preživljavanja *L. monocytogenes* u prisustvu različitih koncentracija ulja Jc-EU-K i Sm-EU, primenjenih pojedinačno i u kombinacijama. U referentnom soju i LMB izolatu ispitan je efekat inhibitornih koncentracija ulja 0,25 % Jc-EU-K, 0,125 % Sm-EU kao i njihove kombinacije 0,25 % Jc-EU-K+0,125 % Sm-EU. Osim inhibitornih, dodatno je ispitan efekat sub-inhibitornih koncentracija i njihovih kombinacija pripremljenih u istom odnosu koncentracija test supstanci (Jc-EU-K:Sm-EU = 2:1), što je bilo u skladu sa preporukama iz literature (Mulyaningsih i sar.,2010). Ispitan je veći broj sub-inhibitornih koncentracija/kombinacija čistih supstanci, koje su prikazane u Tabeli 24, dok su dobijeni rezultati prikazani u Tabelama 25 i 26.

Tabela 24. Koncentracije ulja i njihove kombinacije ispitane u *Time kill* testu

Jc-EU-K (%)	Jc-EU-K (oznaka)	Sm-EU (%)	Sm-EU (oznaka)	Smeša ulja (%)	Smeša ulja (oznaka)
0,250	I(J)*	0,125	I(S)*	0,250+0,125	I(JS)*
0,190	sub-I(J) _{0,75} **	0,094	sub-I(S) _{0,75} **	0,190+0,094	sub-I(JS) _{0,75} **
0,125	sub-I(J) _{0,5} **	0,062	sub-I(S) _{0,5} **	0,125+0,062	sub-I(JS) _{0,5} **
0,094	sub-I(J) _{0,375} **	0,050	sub-I(S) _{0,375} **	0,094+0,050	sub-I(JS) _{0,375} **
0,062	sub-I(J) _{0,25} **	0,031	sub-I(S) _{0,25} **	0,062+0,031	sub-I(JS) _{0,25} **

*: inhibitorna koncentracija/kombinacija ulja

** : sub-I: sub-inhibitorna koncentracija/kombinacija ulja (broj u subskriptu označava faktor umanjenja)

Tabela 25. Efekat etarskih ulja *J. communis* i *S. montana* i njihovih kombinacija prema referentnom soju *L. monocytogenes* ATCC 19111 u *Time kill* testu

h	Kontrola	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja
		sub-I(J) _{0,25}	sub-I(S) _{0,25}	sub-I(JS) _{0,25}	sub-I(J) _{0,375}	sub-I(S) _{0,375}	sub-I(JS) _{0,375}	sub-I(J) _{0,5}	sub-I(S) _{0,5}	sub-I(JS) _{0,5}
		0,062	0,031	0,062 + 0,031	0,094	0,050	0,094 + 0,050	0,125	0,062	0,125 + 0,062
0	5,11±0,29	4,43±0,26 ^{a,b,C}	4,81±0,20 ^a	4,32±0,27 ^{b,C}	4,22±0,25 ^{a,b,C}	4,91±0,23 ^b	4,60±0,28 ^{a,b,C}	4,91±0,20 ^b	4,95±0,24 ^b	4,70±0,31 ^b
4	6,43±0,29	4,24±0,18 ^{a,C}	4,46±0,26 ^{a,C}	4,91±0,21 ^{b,C}	4,18±0,19 ^C	4,28±0,19 ^C	4,51±0,36 ^C	3,50±0,21 ^{a,C}	3,83±0,21 ^{a,b,C}	4,09±0,32 ^{b,C}
8	7,35±0,29	4,44±0,21 ^{a,C}	4,40±0,26 ^{a,C}	5,26±0,24 ^{b,C}	4,00±0,15 ^C	4,01±0,27 ^C	4,11±0,29 ^C	2,01±0,16 ^{a,C}	2,60±0,16 ^{b,C}	2,99±0,22 ^{c,C}
12	8,66±0,35	7,01±0,32 ^{a,C}	5,08±0,10 ^{b,C}	5,28±0,16 ^{b,C}	5,33±0,22 ^{a,C}	4,16±0,34 ^{b,C}	3,68±0,24 ^{c,C}	2,36±0,21 ^C	2,18±0,19 ^C	2,23±0,19 ^C
24	9,19±0,31	9,34±0,26^a	8,19±0,23^{b,C}	7,74±0,34^{b,C}	6,42±0,28^{a,C}	5,61±0,21^{b,C}	3,74±0,24^{c,C}	2,56±0,24^{a,C}	2,07±0,21^{b,C}	1,42±0,09^{c,C}
28	9,40±0,26	9,44±0,26 ^a	9,16±0,24 ^a	7,82±0,32 ^{b,C}	5,91±0,22 ^{a,C}	6,36±0,23 ^{b,C}	2,99±0,17 ^{c,C}	2,80±0,15 ^{a,C}	3,15±0,21 ^{b,C}	1,62±0,12 ^{c,C}
32	9,33±0,35	9,46±0,31 ^a	9,42±0,26 ^a	8,58±0,27 ^{b,C}	5,77±0,21 ^{a,C}	6,23±0,24 ^{b,C}	3,10±0,24 ^{c,C}	3,08±0,20 ^{a,C}	3,66±0,27 ^{b,C}	2,14±0,19 ^{c,C}

h	Kontrola	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja
		sub-I(J) _{0,75}	sub-I(S) _{0,75}	sub-I(JS) _{0,75}	I(J)	I(S)	I(JS)
		0,190	0,094	0,190 + 0,094	0,250	0,125	0,250 + 0,125
0	5,11±0,29	4,51±0,17 ^{a,C}	4,31±0,24 ^a	4,15±0,19 ^{a,b,C}	4,24±0,28 ^{a,C}	4,77±0,23 ^b	3,17±0,20 ^{c,C}
4	6,43±0,29	3,12±0,17 ^{a,C}	3,78±0,18 ^{b,C}	3,29±0,19 ^{a,C}	2,12±0,17 ^{a,C}	4,83±0,18 ^{b,C}	<1
8	7,35±0,29	1,87±0,18 ^{a,C}	2,48±0,20 ^{a,C}	2,05±0,12 ^{a,C}	1,10±0,15 ^{a,C}	2,68±0,15 ^{a,C}	<1
12	8,66±0,35	1,05±0,12 ^{a,C}	2,10±0,15 ^{b,C}	<1	<1	1,41±0,13 ^C	<1
24	9,19±0,31	<1	1,88±0,13^C	<1	<1	<1	<1
28	9,40±0,26	<1	<1	<1	<1	<1	<1
32	9,33±0,35	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Koncentracije ulja izražene su u %, a brojnost bakterija u log CFU/mL.

Mala slova a,b,c označavaju statistički značajnu razliku između agenasa pojedinačno i u kombinaciji u okviru podgrupe ($p < 0,05$).

Veliko slovo C označava statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

Rezultati ispod granice detekcije (< 1 log CFU/mL), nisu statistički analizirani.

Analiza sinergizma vršena je nakon 24 h inkubacije, zato su ove vrednosti dodatno markirane.

Tabela 26. Efekat etarskih ulja *J. communis* i *S. montana* i njihovih kombinacija prema LMB izolatu *L. monocytogenes* u *Time kill* testu

h	Kontrola	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja
		sub-I(J) _{0,25}	sub-I(S) _{0,25}	sub-I(JS) _{0,25}	sub-I(J) _{0,375}	sub-I(S) _{0,375}	sub-I(JS) _{0,375}	sub-I(J) _{0,5}	sub-I(S) _{0,5}	sub-I(JS) _{0,5}
		0,062	0,031	0,062 + 0,031	0,094	0,050	0,094 + 0,050	0,125	0,062	0,125 + 0,062
0	4,42±0,17	4,94±0,22 ^{a,C}	4,83±0,27 ^{a,C}	4,68±0,30 ^b	4,89±0,23 ^{a,C}	4,67±0,22 ^{a,b,C}	4,48±0,28 ^b	4,73±0,27 ^{a,C}	4,50±0,25 ^{a,b}	4,24±0,20 ^b
4	5,54±0,28	4,51±0,19 ^{a,C}	3,99±0,22 ^{b,C}	4,13±0,28 ^{a,b,C}	4,47±0,20 ^C	4,12±0,20 ^C	4,18±0,23 ^C	4,91±0,20 ^{a,C}	4,06±0,27 ^{b,C}	1,38±0,13 ^{c,C}
8	6,26±0,24	5,20±0,20 ^{a,C}	5,27±0,21 ^{a,C}	3,92±0,23 ^{b,C}	4,25±0,11 ^{a,C}	3,96±0,21 ^{a,C}	4,45±0,26 ^{b,C}	4,77±0,21 ^{a,C}	3,19±0,16 ^{b,C}	1,10±0,15 ^{c,C}
12	8,79±0,32	7,06±0,20 ^{a,C}	6,19±0,33 ^{b,C}	5,29±0,35 ^{c,C}	4,63±0,12 ^{a,C}	3,98±0,20 ^{b,C}	3,18±0,28 ^{c,C}	4,04±0,15 ^{a,C}	3,04±0,24 ^{b,C}	<1
24	9,26±0,24	9,21±0,26^a	8,37±0,23^{b,C}	5,66±0,23^{c,C}	6,39±0,29^{a,C}	4,48±0,26^{b,C}	2,41±0,18^{c,C}	4,77±0,27^{a,C}	2,34±0,19^{b,C}	<1
28	9,29±0,31	9,02±0,33 ^a	9,19±0,29 ^a	5,26±0,20 ^{b,C}	8,21±0,24 ^{a,C}	4,13±0,29 ^{b,C}	2,36±0,20 ^{c,C}	5,34±0,24 ^{a,C}	2,65±0,18 ^{b,C}	<1
32	9,15±0,36	8,90±0,27 ^a	9,09±0,30 ^a	3,65±0,27 ^{b,C}	8,86±0,28 ^a	4,34±0,27 ^{b,C}	2,74±0,24 ^{c,C}	5,88±0,24 ^{a,C}	2,14±0,20 ^{b,C}	<1

h	Kontrola	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja	Jc-EU-K	Sm-EU	smeša ulja
		sub-I(J) _{0,75}	sub-I(S) _{0,75}	sub-I(JS) _{0,75}	I(J)	I(S)	I(JS)
		0,190	0,094	0,190 + 0,094	0,250	0,125	0,250 + 0,125
0	4,42±0,17	4,79±0,22 ^{a,C}	4,37±0,24 ^b	3,88±0,21 ^{c,C}	4,70±0,22 ^a	4,46±0,23 ^a	3,26±0,21 ^{b,C}
4	5,54±0,28	4,24±0,25 ^{a,C}	3,97±0,23 ^{a,C}	2,01±0,16 ^{b,C}	2,92±0,15 ^{a,C}	4,21±0,15 ^{b,C}	1,89±0,13 ^{c,C}
8	6,26±0,24	4,01±0,21 ^{a,C}	2,97±0,23 ^{b,C}	<1	1,79±0,12 ^{a,C}	2,18±0,18 ^{b,C}	<1
12	8,79±0,32	3,43±0,16 ^{a,C}	2,65±0,25 ^{b,C}	<1	1,51±0,13 ^{a,C}	1,18±0,12 ^{a,C}	<1
24	9,26±0,24	3,47±0,29^{a,C}	2,20±0,15^{b,C}	<1	<1	<1	<1
28	9,29±0,31	3,18±0,21 ^{a,C}	2,15±0,16 ^{b,C}	<1	<1	<1	<1
32	9,15±0,36	2,54±0,22 ^{a,C}	2,05±0,12 ^{b,C}	<1	<1	<1	<1

Koncentracije ulja izražene su u %, a brojnost bakterija u log CFU/mL.

Mala slova a,b,c označavaju statistički značajnu razliku između agenasa pojedinačno i u kombinaciji u okviru podgrupe ($p < 0,05$).

Veliko slovo C označava statistički značajnu razliku u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$).

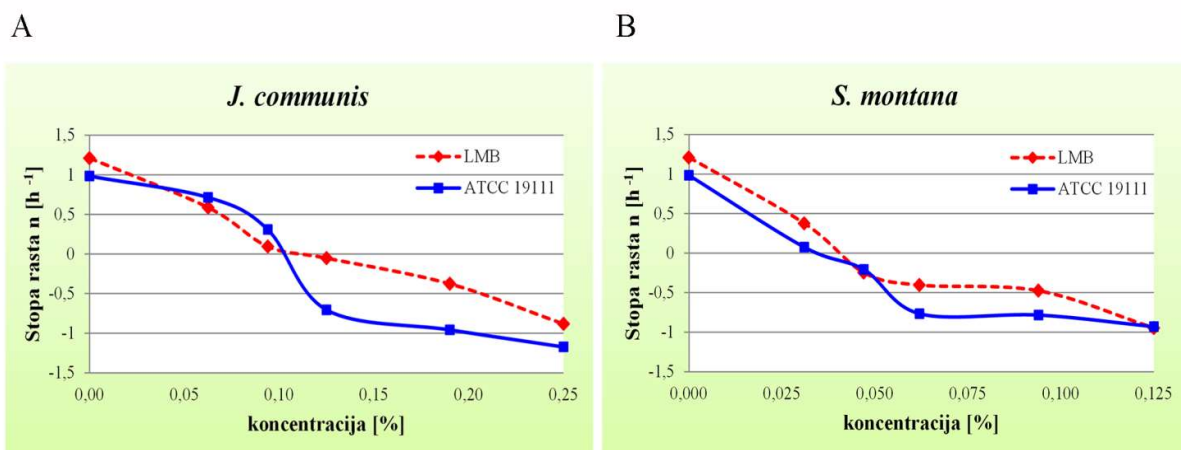
Rezultati ispod granice detekcije (< 1 log CFU/mL), nisu statistički analizirani.

Analiza sinergizma vršena je nakon 24 h inkubacije, zato su ove vrednosti dodatno markirane.

Analiza sinergizma je izvršena na osnovu broja CFU/mL nakon 24 h inkubacije, poređenjem aktivnosti sub-inhibitornih koncentracija primenjenih pojedinačno i u kombinaciji. Naime, ukoliko je tokom ovog perioda u suspenziji tretiranoj kombinacijama došlo do redukcije broja bakterija za ≥ 2 log CFU/mL u odnosu na suspenziju sa pojedinačno primenjenim efikasnijim agensom, onda je to potvrda sinergizma (Mulyaningsih i sar., 2010).

U slučaju referentnog soja, kombinacije ulja u sub-inhibitornim koncentracijama nisu ostvarile sinergistički efekat, budući da je nakon 24 h inkubacije razlika u redukciji broja bakterija u poređenju sa efikasnijim agensom (Sm-EU) uvek bila manja od 2 log (Tabela 25). Ovakav rezultat je bio dodatna potvrda rezultata dobijenih u metodi šahovske table. Sa druge strane, iste kombinacije ispitane prema LMB izolatu pokazale su se kao efikasnije (Tabela 26). Jasan sinergizam uočen je za dve sub-inhibitorne kombinacije, sub-I(JS)_{0,25} i sub-I(JS)_{0,375}, budući da je redukcija broja bakterija nakon 24 h inkubacije u poređenju sa efikasnijim pojedinačnim agensom (Sm-EU) iznosila 2,71 log CFU/mL, odnosno 2,07 log CFU/mL. Za ostale sub-inhibitorne kombinacije nije bilo moguće izračunati razliku, jer je broj CFU/mL često bio ispod granica detekcije.

Interesantno je da je kompletna inhibicija rasta u *Time kill* testu ostvarena primenom onih koncentracija ulja koje su u mikrodulucionom MIK eseju bile sub-inhibitorne. Da bismo ovu pojavu razjasnili, pristupili smo proceni tzv. dinamičkih MIK vrednosti, ili MIK krivih (cMIK) za svaki soj i svako pojedinačno ulje primenom *Time kill* testa. Naime, eksperimentalno su određene krive rasta svakog soja u prisustvu različitih koncentracija ulja. Za svaku primenjenu koncentraciju test supstance rast bakterija je praćen tokom prvih 12 h inkubacije, kako bi se izbegao ulazak populacija u stacionarnu fazu. Za svaku krivu rasta izračunate su stope (brzine) rasta (n) i grafički je predstavljena zavisnost stope rasta od primenjene koncentracije ulja (Slika 20). Dalje je sa svakog grafika očitana koncentracija ulja koja ne dozvoljava rast, ali ni ne dovodi do odumiranja populacije (stopa rasta $n = 0$), što u stvari predstavlja cMIK. Dobijene cMIK vrednosti su bile značajno niže od vrednosti MIK dobijenih u mikrodilucionoj metodi, što je naročito bilo izraženo u slučaju Sm-EU (Tabela 27).



Slika 20. Dinamika rasta bakterija u funkciji koncentracije ulja *J. communis* (a) i *S. montana* (b)

Tabela 27. Usporedni prikaz MIK vrednosti određenih *Time kill* i mikrodilucionom metodom

Soj	cMIK (%)		MIK (%)	
	Jc-EU-K	Sm-EU	Jc-EU-K	Sm-EU
ATCC 19111	0,103	0,035	0,5	0,5
LMB	0,144	0,042	1	1

4.3.5.4. Antibakterijski efekat vinskih marinada sa etarskim uljima

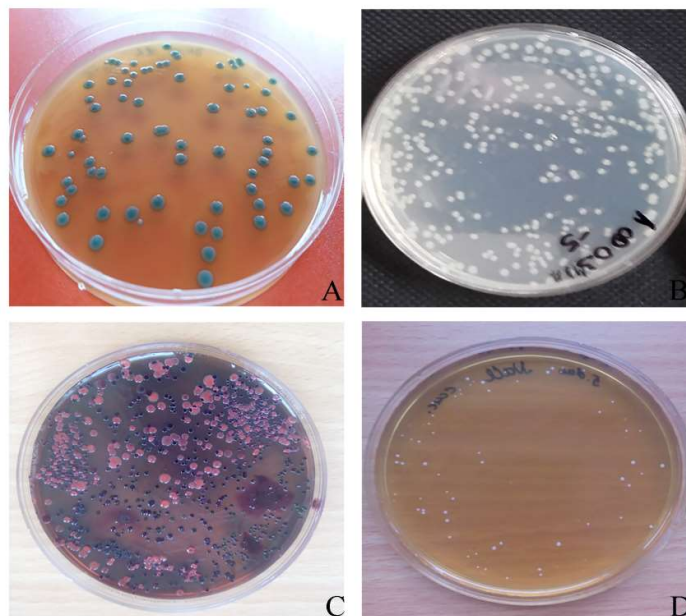
Efekat različitih vinskih marinada na dinamiku rasta bakterija na junećem mesu ispitan je *in situ* primenom *Time kill* testa. Međutim, pre postavljanja eksperimenata, bilo je neophodno potvrditi mikrobiološku ispravnost uzoraka mesa koji su korišćeni, što je utvrđeno analizom njihove mikroflore. Analiza je obuhvatila praćenje sledećih parametara: ukupnog broja aerobnih heterotrofnih mezofilnih bakterija (AHMB), Enterobacteriaceae (ENT) i bakterija mlečne kiseline (BMK), kao i prisustvo i brojnost *E. coli*, *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes*. Dobijene vrednosti broja bakterija, izražene kao log CFU/g, prikazane su u Tabeli 28. Rezultati ispitivanja su zadovoljili mikrobiološke kritrijume propisane Pravilnikom o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl. glasnik RS 72/2010). Ovim je pokazano da je uzorak mesa bio mikrobiološki bezbedan i higijenski ispravan.

Tabela 28. Mikrobiološka analiza uzorka mesa pre inokulacije

	AHMB	ENT	BMK	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
log CFU/g	3,72 ± 0,24	2,50 ± 0,22	2,80 ± 0,21	1,31 ± 0,17	nd	nd

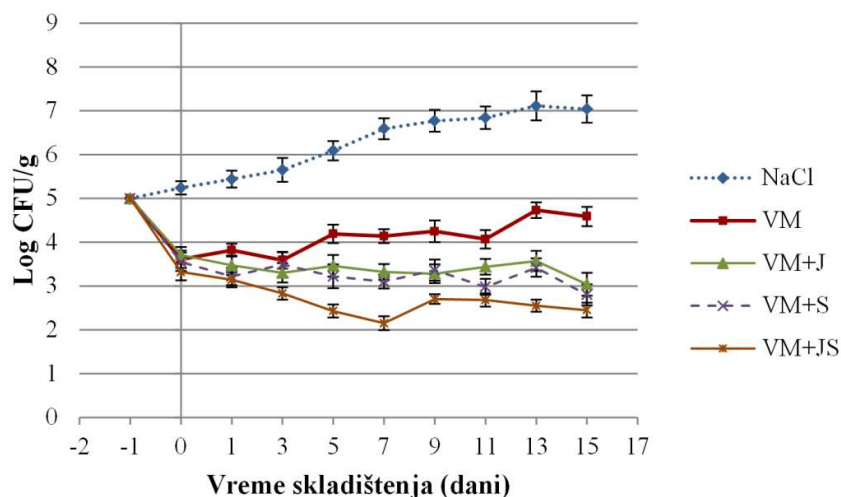
nd – Nije detektovano prisustvo bakterija u uzorku.

Eksperimentalni model *in situ* izvedenog *Time kill* testa je podrazumevao mariniranje junećeg mesa tokom 24 h u marinadama napravljenim od crvenog vina, sa dodatkom osnovnih začina (kuhinjska so, beli luk u prahu, mleveni crni biber), sa ili bez dodatka ulja i njihovih kombinacija. Pripremljene su osnovna vinska marinada bez ulja (kontrolna, VM), marinade sa pojedinačnim uljem kleke koncentracije 0,25 % (VM+J), uljem čubra koncentracije 0,125 % (VM+S) ili njihovih kombinacija (VM+JS), i meso je marinirano u njima. Pored vinskih marinada, pripremana je i negativna kontrola (uzorci mesa u rastvoru 8,5 g/L kuhinjske soli, kontrola označena kao NaCl). Antimikrobni efekat je praćen prema patogenu *L. monocytogenes* (kao što je već istaknuto, sojevi ATCC 19111 i LMB) inokulisanom na meso (5 log CFU/g), i to u vremenskom periodu od 15 dana, tokom koga su uzorci mesa držani/“inkubirani“ u frižideru. Dodatno, praćen je i efekat prema prisutnoj mikroflori i to AHMB, ENT i BMK. Morfologija kolonija praćenih grupa je prikazana na Slici 21.



Slika 21. Izgled kolonija analiziranih grupa bakterija na odgovarajućim podlogama: (A) *L. monocytogenes* na LDAB medijumu, (B) predstavnika AHMB na LA medijumu, (C) predstavnika ENT na EMB medijumu, (D) predstavnika BMK na MRS medijumu

Efekat različitih vinskih marinada na dinamiku rasta *L. monocytogenes* prikazan je na Slikama 22 i 23 i u Tabelama 8.20 i 8.21 (Prilog), za referentni soj ATCC 19111 i LMB izolat. Analizom dobijenih rezultata uočeno je da je ostvaren sličan efekat različitih vinskih marinada na oba soja. Antibakterijski efekat osnovne marinade VM je bio najizraženiji - broj bakterija je u proseku za oko 2,5-3 log CFU/g smanjen u odnosu na NaCl. Dodatak jednog ili drugog etarskog ulja (VM+J ili VM+S) dodatno je pojačao antilisterijalni efekat VM, što se u slučaju ATCC 19111 soja jasno uočava počev od petog dana inkubacije. Najizraženiji efekat na LMB postignut je dodatkom ulja čubra (VM+S) počev od devetog dana inkubacije, odnosno u prisustvu ulja kleke (VM+J) počev od trinaestog dana inkubacije. Kombinacija ulja VM+JS dodatno je uticala na redukciju brojnosti za oko 1-2 log CFU/g u odnosu na osnovnu VM, što je naročito bilo izraženo u slučaju osetljivijeg soja ATCC 19111. Na kraju inkubacionog perioda broj bakterija oba soja je bio približno isti i iznosio je oko 7 log CFU/g u kontroli, 4,5 log CFU/g u VM, odnosno 2,4 - 3,3 log CFU/g u ostalim marinadama (VM+J, VM+S i VM+JS).



Slika 22. Efekat vinskih marinada na dinamiku rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 na junećem mesu, sa i bez dodatka etarskih ulja kleke (Jc-EU-K) i čubra (Sm-EU).

Uzorci mesa su marinirani na 4 °C tokom 24 h, a zatim inkubirani/skladišteni narednih 15 dana u frižideru, na 4 °C.

Uzorak "-1", označava stanje pre mariniranja, dok nulti dan prikazuje stanje odmah nakon mariniranja:

NaCl - negativna kontrola; VM - osnovna vinska marinada; VM+J - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K; VM+S - marinada koja sadrži 0,125 % Sm-EU; VM+JS - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K i 0,125 % Sm-EU.

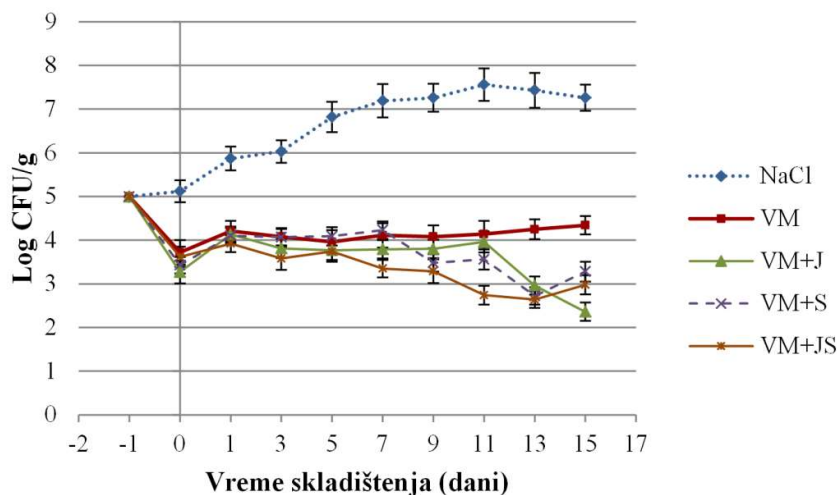
Korelacija između dva para za faktore vreme i tretman (two-way Anova):

A: analiza faktora „vreme“ između dva para uzastopnih dana, u okviru svakog tretmana:

NaCl - za parove 3:5 i 5:7 ($p < 0,01$); VM - za parove (-1):0, 3:5 i 11:13 ($p < 0,001$); VM+J - za parove (-1):0 i 13:15 ($p < 0,001$); VM+S - za parove (-1):0, 11:13 i 13:15 ($p < 0,001$); VM+JS - za parove (-1):0, 3:5 i 7:9 ($p < 0,05$).

B: analiza faktora „tretman“ svakog dana uzorkovanja (osim dan -1):

svi tretmani u odnosu na NaCl - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+J u odnosu na VM - u danima 1, 5 - 15 ($p < 0,05$); VM+S u odnosu na VM - u danima 1, 5 - 15 ($p < 0,001$); VM+JS u odnosu na VM - u danima 1 - 15 ($p < 0,001$); VM+J u odnosu na VM+S u danu 11 ($p < 0,01$); VM+JS u odnosu na VM+J - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+JS u odnosu na VM+S - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,01$).



Slika 23. Efekat vinskih marinada na dinamiku rasta *L. monocytogenes* LMB izolata na junećem mesu, sa i bez dodatka etarskih ulja kleke (Jc-EU-K) i čubra (Sm-EU)

Uzorci mesa su marinirani na 4 °C tokom 24 h, a zatim inkubirani/skladišteni narednih 15 dana u frižideru, na 4 °C. Uzorak "-1", označava stanje pre mariniranja, dok nulti dan prikazuje stanje odmah nakon mariniranja:

NaCl - negativna kontrola; VM - osnovna vinska marinada; VM+J - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K; VM+S - marinada koja sadrži 0,125 % Sm-EU; VM+JS - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K i 0,125 % Sm-EU.

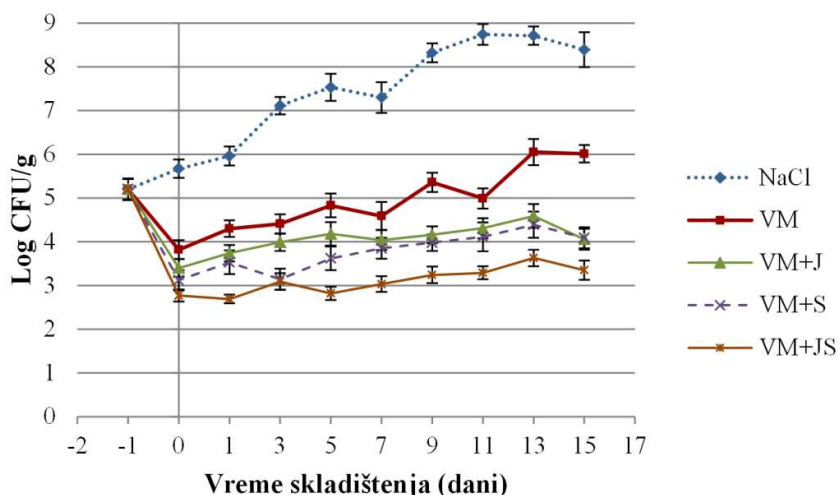
Korelacija između dva para za faktore vreme i tretman (two-way Anova):

A: analiza faktora „vreme“ između dva para uzastopnih dana, u okviru svakog tretmana:

NaCl - za parove 0:1 i 3:5 ($p < 0,001$); VM - za parove (-1):0, 0:1 ($p < 0,01$); VM+J - za parove (-1):0, 0:1, 11:13 i 13:15 ($p < 0,001$); VM+S - za parove (-1):0, 0:1, 7:9, 11:13 i 13:15 ($p < 0,001$); VM+JS - za parove (-1):0 i 9:11 ($p < 0,001$).

B: analiza faktora „tretman“ svakog dana uzorkovanja (osim dan -1): svi tretmani u odnosu na NaCl - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+J u odnosu na VM - u danima 1, 13 i 15 ($p < 0,01$); VM+S u odnosu na VM - u danima 9 - 15 ($p < 0,01$); VM+JS u odnosu na VM - u danima 3, 7 - 15 ($p < 0,01$); VM+J u odnosu na VM+S u danima 7, 11 i 15 ($p < 0,01$); VM+JS u odnosu na VM+J - u danima 7 - 11 i 15 ($p < 0,01$); VM+JS u odnosu na VM+S - u danima 3, 7, 11 i 15 ($p < 0,01$).

U slučaju grupe AHMB dobijeni rezultati ukazuju da su vrednosti log CFU/g bile smanjene u prisustvu svake od marinada u poređenju sa negativnom kontrolom (Slika 24 i Tabela 8.22, Prilog). Sa dodavanjem oba ulja, antibakterijski efekat marinade je bio značajno veći nego što je to bilo u slučaju onih sa dodatkom svakog ulja pojedinačno. Najizraženiji efekat VM+JS, u odnosu na marinade sa pojedinačnim uljima, postignut je upravo kod ove grupe bakterija, sa izuzetkom trećeg dana inkubacije, kada je statistički značajna razlika postojala samo između efekta VM+JS i VM+J. Antibakterijski efekat marinada VM+J i VM+S je bio manje izražen i prilično ujednačen. Na kraju inkubacionog perioda broj AHMB dostigao je 8,7 log CFU/g u negativnoj kontroli, 6 log CFU/g u VM, ≈ 4 log CFU/g u VM+J i VM+S i 3,35 log CFU/g u VM+JS.



Slika 24. Efekat vinskih marinada na dinamiku rasta AHMB na junećem mesu, sa i bez dodatka etarskih ulja kleke i čubra

Uzorci mesa su marinirani na 4 °C tokom 24 h, a zatim inkubirani/skladišteni narednih 15 dana u frižideru, na 4 °C. Uzorak “-1”, označava stanje pre mariniranja, dok nulti dan prikazuje stanje odmah nakon mariniranja:

NaCl - negativna kontrola; VM - osnovna vinska marinada; VM+J - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K; VM+S - marinada koja sadrži 0,125 % Sm-EU; VM+JS - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K i 0,125 % Sm-EU.

Korelacija između dva para za faktore vreme i tretman (two-way Anova):

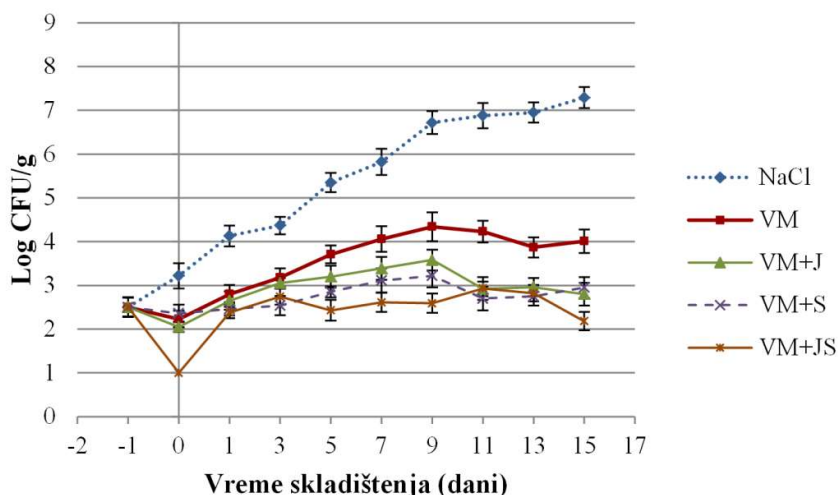
A: analiza faktora „vreme“ između dva para uzastopnih dana, u okviru svakog tretmana:

NaCl - za parove 1:3, 3:5, 7:9 i 9:11 ($p < 0,05$); VM - za parove (-1):0, 0:1, 3:5, 7:9 i 11:13 ($p < 0,05$); VM+J - za parove (-1):0 i 13:15 ($p < 0,001$); VM+S - za parove (-1):0, 0:1 i 3:5 ($p < 0,01$); VM+JS - za par (-1):0 ($p < 0,001$).

B: analiza faktora „tretman“ svakog dana uzorkovanja (osim dan -1):

svi tretmani u odnosu na NaCl - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+J u odnosu na VM - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+S u odnosu na VM - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+JS u odnosu na VM - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+J u odnosu na VM+S u danima 3 i 5 ($p < 0,001$); VM+JS u odnosu na VM+J - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+JS u odnosu na VM+S - u svim danima uzorkovanja, osim dana 3 ($p < 0,001$).

Efekat različitih vinskih marinada na broj ENT prikazan je na Slici 25 i u Tabeli 8.23 (Prilog). Tokom petnaestodnevne inkubacije broj bakterija iz grupe ENT je dostigao vrednost od 7,3 log CFU/g u negativnoj kontroli, 4 log CFU/g u VM, oko 2,9 log CFU/g u VM+J i VM+S, što u poređenju sa inicijalnim brojem od 2,5 log CFU/g (dan -1), ukazuje na značajnu inhibiciju rasta marinadama sa pojedinačnim uljima. Uz to, marinada sa dodatkom oba ulja omogućila je održavanje broja ovih bakterija na približno istom nivou kao pre mariniranja (redukcija za oko 0,3 log CFU/g), čak i nakon 15 dana inkubacije. Interesantno je napomenuti da je kombinacija ulja dovela do naglog pada broja bakterija iz familije ENT tokom samog procesa mariniranja, kada je on pao ispod granica detekcije (< 2 log CFU/g). Dodavanje jednog ili drugog ulja nije dovelo do statistički značajnog smanjenja broja bakterija u poređenju sa brojem u VM, tokom prvih dana inkubacije, ali počev od petog dana za VM+S, odnosno sedmog dana za VM+J, uočava se statistički značajna redukcija brojnosti bakterija ove grupe. Poređenjem antibakterijskog efekta VM+JS i marinada sa dodatkom svakog ulja pojedinačno, može se uočiti da je efekat marinade sa dodatkom oba ulja bio izraženiji samo u određenim danima inkubacionog perioda i to petog, sedmog, devetog i petnaestog dana inkubacije.



Slika 25. Efekat vinskih marinada na dinamiku rasta ENT na junećem mesu sa i bez dodatka etarskih ulja kleke i čubra

Uzorci mesa su marinirani na 4 °C tokom 24 h, a zatim inkubirani/skladišteni narednih 15 dana u frižideru, na 4 °C.

Uzorak "-1", označava stanje pre mariniranja, dok nulti dan prikazuje stanje odmah nakon mariniranja:

NaCl - negativna kontrola; VM - osnovna vinska marinada; VM+J - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K; VM+S - marinada koja sadrži 0,125 % Sm-EU; VM+JS - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K i 0,125 % Sm-EU.

Vrednost 1 log CFU/g na grafiku predstavlja broj bakterija ispod granice detekcije (< 2 log CFU/g).

Korelacija između dva para za faktore vreme i tretman (two-way Anova):

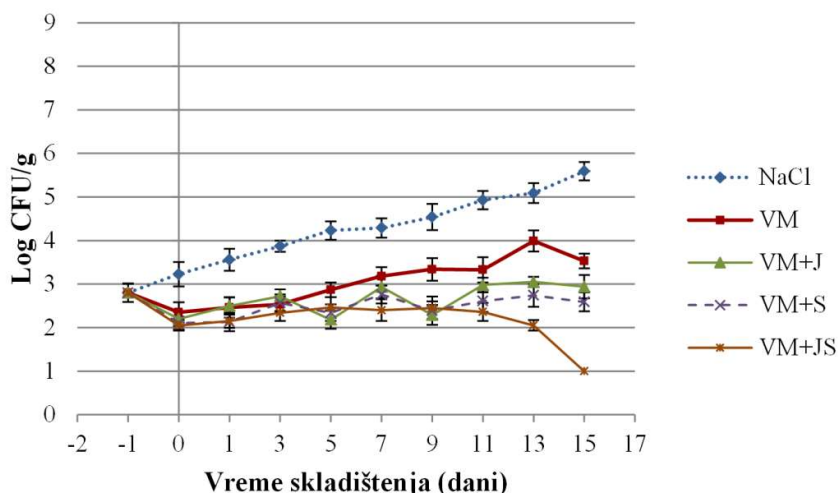
A: analiza faktora „vreme“ između dva para uzastopnih dana, u okviru svakog tretmana:

NaCl - za parove (-1):0, 0:1, 3:5, 5:7 i 13:15 ($p < 0,05$); VM - za parove 0:1 i 3:5 ($p < 0,001$); VM+J - za parove 0:1, 1:3 i 9:11 ($p < 0,05$); VM+S - za par 9:11 ($p < 0,01$); VM+JS - za par 13:15 ($p < 0,001$).

B: analiza faktora „tretman“ svakog dana uzorkovanja (osim dan -1):

svi tretmani u odnosu na NaCl - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+J u odnosu na VM - u danima 5 - 15 ($p < 0,001$); VM+S u odnosu na VM - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,05$); VM+JS u odnosu na VM - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,01$); VM+J u odnosu na VM+S u danima 3 - 9 ($p < 0,001$); VM+JS u odnosu na VM+J - u danima 5 - 9 i dan 15 ($p < 0,001$); VM+JS u odnosu na VM+S - u danima 5 - 9 i dan 15, ($p < 0,01$).

Kada je o BMK reč, uticaj svih marinada na dinamiku rasta ovih bakterija bio je najmanje izražen (Slika 26, Tabela 8.24, Prilog), što je u stvari posledica slabijeg rasta ovih bakterija i u kontroli (< 6 log CFU/g). Broj bakterija na početku inkubacionog perioda bio je 2,8 log CFU/g, a na kraju inkubacionog perioda iznosio je 5,6 log CFU/g u kontroli; 3,5 log CFU/g u VM; 2,9 log CFU/g u VM+J; 2,6 log CFU/g VM+S, dok je broj u VM+JS bio ispod granice detekcije (< 2 log CFU/g). Efekat marinade sa dodatkom oba ulja, kao i efekat marinade sa dodatkom ulja čubra (osim trećeg dana inkubacije) bio je izraženiji u poređenju sa efektom osnovne VM, tokom čitavog perioda inkubacije. Međutim, efekat marinade sa dodatkom ulja kleke nije bio izražen do sedmog dana inkubacije, da bi počev od devetog dana postojala značajna razlika u poređenju sa osnovnom VM. Interesantno je bilo to da efekat marinade sa dodatkom oba ulja nije bio naročito izražen u poređenju sa efektom marinada sa dodatkom svakog ulja pojedinačno, tokom dužeg vremenskog perioda skladištenja. Značajna razlika u efektu VM+JS u poređenju sa efektom VM+J, odnosno VM+S, uočava se počev od jedanaestog dana skladištenja.



Slika 26. Efekat vinskih marinada na dinamiku rasta bakterija mlečne kiseline (BMK) na junećem mesu sa i bez dodatka etarskih ulja kleke i čubra

Uzorci mesa su marinirani na 4 °C tokom 24 h, a zatim inkubirani/skladišteni narednih 15 dana u frižideru, na 4 °C.

Uzorak “-1”, označava stanje pre mariniranja, dok nulti dan prikazuje stanje odmah nakon mariniranja:

NaCl - negativna kontrola; VM - osnovna vinska marinada; VM+J - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K; VM+S - marinada koja sadrži 0,125 % Sm-EU; VM+JS - marinada koja sadrži 0,25 % Jc-EU-K i 0,125 % Sm-EU.

Vrednost 1 log CFU/g na grafiku predstavlja broj bakterija ispod granice detekcije (< 2 log CFU/g).

Korelacija između dva para za faktore vreme i tretman (two-way Anova):

A: analiza faktora „vreme“ između dva para uzastopnih dana, u okviru svakog tretmana:

NaCl - za sve parove, osim 5:7, 7:9 i 11:13 ($p < 0,05$); VM - za parove (-1):0, 11:13 i 13:15 ($p < 0,01$); VM+J - za parove (-1):0, 3:5, 5:7, 7:9, 9:11 ($p < 0,001$); VM+S - za parove (-1):0, 1:3, 5:7 ($p < 0,01$); VM+JS - za par (-1):0 ($p < 0,001$).

B: analiza faktora „tretman“ svakog dana uzorkovanja (osim dan -1):

svi tretmani u odnosu na NaCl - u svim danima uzorkovanja ($p < 0,001$); VM+J u odnosu na VM - u danima 5, 9 - 15 ($p < 0,01$); VM+S u odnosu na VM - u danima 0, 1, 5, 7, 11 - 15 ($p < 0,05$); VM+JS u odnosu na VM - u danima 0, 1, 5 - 15 ($p < 0,01$); VM+J u odnosu na VM+S u danima 1, 11 - 15 ($p < 0,01$); VM+JS u odnosu na VM+J - u danima 1, 3, 7, 11 - 15 ($p < 0,05$); VM+JS u odnosu na VM+S - u danima 7, 11 - 15, ($p < 0,05$).

Generalno, rezultati ovog dela istraživanja ukazuju da su vrednosti log CFU/g za sve praćene grupe bakterija, u poređenju sa negativnom kontrolom bile smanjene primenom bilo koje od marinada. Efekat osnovne VM bio je najizraženiji pri čemu je brojnost bakterija na kraju inkubacionog perioda bila redukovana za oko 2-3 log CFU/g. Dodatak bilo kog pojedinačnog ulja ili njihove kombinacije dodatno je smanjilo brojnost za oko 1-2,5 log CFU/g u odnosu na osnovnu VM. Antibakterijski efekat VM+J je bio najizraženiji kod LMB soja (1,98 log CFU/g) i AHMB (1,95 log CFU/g), dok je efekat VM+S bio najjači kod AHMB (1,92 log CFU/g). Međutim, jasno pojačavanje antibakterijskog efekta u slučaju VM+JS, a u poređenju sa VM+J i VM+S, uočeno je samo u slučaju AHMB i iznosilo je 0,7 log CFU/g. Važno je napomenuti i to da je tokom prvih 24 h mariniranja bio izražen baktericidni efekat, dok je tokom daljeg skladištenja mesa efekat uglavnom bakteriostatički. Brojnost bakterija se održavala tokom veoma dugog perioda što je pokazatelj da je meso bilo dobro konzervisano. U tretmanu sa VM+JS, brojnost bakterija ENT je bio ispod granice detekcije (< 2 log CFU/g) i to već nultog dana (odmah nakon mariniranja), dok je nemogućnost detekcije BMK bila uočena na kraju perioda skladištenja (15. dan).

DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Učestalost rezistencije patogenih bakterija prema konvencionalnim antibioticima sa jedne strane, i ćelija kancera prema citostaticima sa druge strane, predstavlja globalni problem današnjice i izazov za kliničku praksu. Zbog ograničene efikasnosti postojećih lekova istraživanja se usmeravaju ka otkrivanju novih prirodnih proizvoda sa antimikrobnim i citotoksičnim dejstvom (Blair i sar., 2015; Zheng, 2017). Osim pronalazaženja novih agenasa, dobra strategija u rešavanju ovog problema je kombinovanje supstanci prirodnog porekla i konvencionalnih lekova, čime bi se mogla dodatno pojačati efikasnost postojećih medikamenata (Mulyaningsih i sar., 2010). Važan izvor aktivnih materija predstavljaju lekovite, začinske i jestive biljke. Pokazano je da njihovi različiti produkti poseduju brojne biološke aktivnosti što opravdava njihovu široku primenu u tradicionalnoj medicini (Adams, 2014; Bakkali i sar., 2008).

Pored toga, opasnost po zdravlje ljudi predstavljaju i sintetički konzervansi i aditivi koji se dodaju u hranu sa ciljem da produže njenu održivost, poboljšaju kvalitet i spreče mikrobiološku kontaminaciju. Na primer, poznati sintetički antioksidanti, kao što su butil-hidroksitoluen (BHT), butil-hidroksianizol (BHA) i drugi, mogu izazvati mutagenezu i/ili kancerogenezu (Karre i sar., 2013). Imajući sve ovo u vidu, potreba za korišćenjem novih, prirodnih alternativa, umesto postojećih hemijskih aditiva i konzervanasa je izvesna. Naime, brojna etarska ulja začinskih biljaka, bogata terpenskim jedinjenjima, zbog svog potentnog antimikrobnog potencijala mogu biti veoma dobri konzervansi (Djenane i sar., 2011). Od izuzetnog naučnog i praktičnog interesa je ispitivanje do sada nedovoljno istraženih biljnih vrsta kao potencijalno novih izvora biološki aktivnih supstanci. Sa tom idejom započeto je istraživanje biološke aktivnosti prirodnih proizvoda kleke (*Juniperus communis*), i to njenih etarskih ulja i postdestilacionog ostatka.

Predmet naših istraživanja najpre su bili prirodni proizvodi dobijeni iz ženskih šišarki *J. communis* var. *saxatilis*: etarsko ulje (Jc-EU-P) i postdestilacioni ostatak (PDO). Određen je njihov hemijski sastav, a zatim je ispitan njihov antioksidativni, antimikrobni, citotoksični i genotoksični potencijal. Na kraju, ispitana je mogućnost primene ulja *J. communis* u konzervaciji hrane; za ovu analizu korišćeno je komercijalno nabavljeno etarsko ulje Jc-EU-K. Analiza antimikrobnog i citotoksičnog potencijala PDO urađena je po prvi put.

Brojne studije izveštavaju o biološkim aktivnostima etarskih ulja i različito pripremljenih ekstrakata biljaka iz roda *Juniperus*. Potvrđena su antioksidativna, antimikrobna, citotoksična, anti-inflamatorna, antinociceptivna, hipoglikemijska svojstva biljnih derivata, kao i sposobnost inhibicije holinesterazne aktivnosti (Akkol i sar., 2009; Cabral i sar., 2012; Orhan i sar., 2011; Tumen i sar., 2012). Takođe, studija Lesjak (2011) bavila se detaljnom analizom hemijskih, biohemijskih i bioloških aktivnosti metanolnih ekstrakata i etarskih ulja iglica i šišarki osam vrsta roda *Juniperus*, sakupljenih sa različitih lokaliteta Republike Srbije, Hrvatske i Makedonije (*Juniperus communis* L. var. *communis*, *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm, *Juniperus excelsa* M. Bieb., *Juniperus sibirica* Burgsdorf., *Juniperus foetidissima* Willd., *Juniperus oxycedrus* L. var. *oxycedrus*, *Juniperus sabina* L. var. *sabina* i *Juniperus phoenicea* L. var. *phoenicea*).

Što se tiče hemijskog sastava etarskih ulja kleke, u našem istraživanju, od svih identifikovanih jedinjenja u ženskim šišarkama, najzastupljeniji su terpeni ugljovodonici. Štaviše, ulje Jc-EU-P odlikuje se samo prisustvom ugljovodoničnih jedinjenja (Vasiljević i sar., 2018), a neobično je što je udeo seskviterpena među njima relativno visok (59,3%). Najdominantnije komponente ovog ulja su monoterpen α -pinen (23,61 %), inače karakterističan za četinarske vrste, seskviterpen δ -kadinen i monoterpen sabinen. Sa druge strane, ulje Jc-EU-K se odlikuje daleko najvećim udelom monoterpenskih ugljovodonika (82,89%), ali su prisutni i oksidovani monoterpenoidi, kao i obe grupe seskviterpena (ugljovodonični i oksidovani; Vasiljević i sar., 2019). Dominantno jedinjenje i ovde je α -pinen, ali je njegova zastupljenost značajno veća (47,8 %), a zatim slede sabinen i β -pinen. Poredeći međusobno dobijene rezultate za oba etarska ulja kleke, kao i rezultate našeg istraživanja sa rezultatima iz literature, mogu se uočiti razlike u

kvalitativnom, a naročito u kvantitativnom terpenoidnom sastavu (Angioni i sar., 2003; Dahmane i sar., 2015; Fejér i sar., 2018; Gao i sar., 2019; Glišić i sar., 2007; Höferl i sar., 2014; Lesjak i sar., 2011; Majewska i sar., 2017; Orav i sar., 2010). Uticaj različitih ekoloških faktora na rast ispitivane vrste predstavlja najverovatniji razlog njihove međusobne varijabilnosti, inače često prisutne između vrsta roda *Juniperus*, zbog čega etarska ulja nemaju veliki hemotaksonomski značaj (Adams, 2014).

U sastavu PDO, od fenolnih jedinjenja, flavonoidi su bili najzastupljeniji, dok je sadržaj fenolnih kiselina bio višestruko manji. Od 25 identifikovanih jedinjenja u sastavu PDO, rutin i hinska kiselina bili su najdominantniji (Vasilijević i sar., 2018). Pregledom literature, stiče se utisak da je manje navoda o hemijskom sastavu ekstrakata *J. communis* u poređenju sa izveštajima o sastavu ulja. Variranja hemijskog sastava ekstrakata u okviru istih vrsta sa različitim lokaliteta, govore o uticaju različitih ekoloških faktora na sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima (Innocenti i sar., 2007; Lantto i sar., 2016; Lesjak, 2011; Miceli i sar., 2009).

Imajući u vidu da su biljke značajan izvor prirodnih antioksidanata, te da oni značajno doprinose drugim biološkim aktivnostima, deo istraživanja je posvećen ispitivanju antioksidativnog potencijala derivata kleke kao potencijalno važne karakteristike. Poznato je da slobodni radikali interaguju sa makromolekulima u ćeliji, dovode do lipidne peroksidacije, oksidacije proteina i izazivaju oksidativna oštećenja DNK molekula, što za posledicu ima poremećaj fizioloških funkcija i u krajnjoj instanci može voditi neoplastičnoj transformaciji ili ćelijsku smrt. Oksidativni stres se prepoznaje kao važan faktor u nastanku ozbiljnih sistemskih oboljenja i patoloških stanja, uključujući neoplastičnu transformaciju i razvoj malignih bolesti (Halliwell i Gutteridge, 2006).

Kompletna slika o antioksidativnom potencijalu dobijena je korišćenjem DPPH, TBA i FRAP testova (Vasilijević i sar., 2018). Ukoliko poredimo aktivnosti našeg PDO sa različito pripremljenim ekstraktima, što ima smisla s obzirom da su dominantne komponente u oba slučaja fenolna jedinjenja, njegov dobar antioksidativni potencijal je u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja (Elmastaş i sar., 2006; Orhan i sar., 2011; Zhang i sar., 2019). Studija Lesjak (2011) ističe bolju antioksidativnu aktivnost ekstrakata iglica u poređenju sa potencijalom ekstrakata šisarki. Pomenuta studija je pokazala slične rezultate antioksidativne aktivnosti za ekstrakt šisarki *J. communis* sa našim rezultatima: IC₅₀ vrednost ekstrakta potrebna za neutralizaciju 50 % DPPH radikala bila je 33,5 µg/mL, IC₅₀ vrednost u TBA testu određena je pri koncentraciji od 0,89 mg/mL, dok je vrednost redukcionog potencijala iznosila 22,66 mg ekv. askorbinske kis./g SE. Štaviše, PDO u našem istraživanju (Vasilijević i sar., 2018) je pokazao nešto bolju antioksidativnu aktivnost u svim testovima u poređenju sa Lesjak (2011). Ovako snažan antioksidativni potencijal u direktnoj je vezi sa fenolnim sastavom, s obzirom da je ova klasa jedinjenja dobro poznata kao antioksidanti (Babich i sar., 2011). On bi se verovatno mogao povezati i sa dominantnim identifikovanim komponentama: rutinom, katehinom i epikatehinom (Azevedo i sar., 2013; Cruz-González i sar., 2016; Yang i sar., 2008), s tim da nije isključeno učešće i drugih, neidentifikovanih komponenti (ne treba zaboraviti da je procenat identifikovanih jedinjenja u PDO veoma mali i iznosi 3,2 % od ukupnog sastava; Vasilijević i sar., 2018). Fenolno jedinjenje poput rutina svoje antioksidativno dejstvo ispoljava sprečavanjem nastanka slobodnih radikala ili njihovom neutralizacijom. Rutin vrši neutralizaciju slobodnih radikala vezivanjem atoma vodonika za slobodne radikale, ili sprečava njihovo formiranje vezivanjem za jone prelaznih metala (Fe²⁺ i Cu²⁺). U tom slučaju dolazi do formiranja helata, čime se sprečava interakcija pomenutih jona sa H₂O₂ i stvaranje hidroksil-radikala. Osim toga, rutin inhibira aktivnost enzima koji su uključeni u proces stvaranja slobodnih radikala. Dodatno, pokazano je da rutin zaustavlja lančanu reakciju lipidne peroksidacije, smanjuje oštećenje lipida i vrši stabilizaciju ćelijske membrane. Smatra se da je prisustvo aromatičnog prstena i slobodnih hidroksilnih grupa razlog dobre antioksidativne aktivnosti ovog flavonoida (Samsonowicz i sar., 2015).

Sa druge strane, lošiji antioksidativni potencijal etarskog ulja detektovan u ovom istraživanju (Vasilijević i sar., 2018) nije potpunosti u skladu sa dostupnom literaturom (Höferl i sar., 2014; Lesjak i sar. 2011, 2013). Dok su rezultati DPPH testa bili u skladu sa rezultatima Lesjak (2011), što pokazuju i slične IC₅₀ vrednosti našeg ulja (1,64 µL/mL) i onog testiranog od strane

Lesjak (8,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$), dobijeni rezultati TBA testa nisu bili u saglasnosti sa pomenutom studijom. Određena IC_{50} je bila višestruko veća u našem istraživanju, što ukazuje na značajno slabiji potencijal inhibicije lipidne peroksidacije uljem testiranim u ovoj disertaciji. To može imati veze sa manjim procentom α -pinena i sabinena u sastavu našeg ulja, kao i razlikama u procentualnoj zastupljenosti drugih komponenti. Na stepen antioksidativne aktivnosti etarskih ulja najverovatnije utiču i sinergističke interakcije između njegovih komponenti (Höferl i sar., 2014). Generalno, ako posmatramo naše rezultate, slabija antioksidativna aktivnost ulja, u poređenju sa antioksidativnim potencijalom PDO i BHT, može biti posledica njegove lošije rastvorljivosti u polarnim rastvaračima korišćenim u testovima antioksidantne aktivnosti.

Uzimajući u obzir da je karcinom pluća jedan od najčešćih kancera, sa visokom smrtnošću i čestim razvojem rezistencije na citostatike (Chang, 2011), u daljem istraživanju bilo je od važnosti ispitati citotoksični potencijal derivata kleke prema ćelijama adenokarcinoma pluća A549. Istraživanjem su obuhvaćene i normalne MRC-5 ćelije, poreklom od fetalnih fibroblasta pluća, budući da upotreba antikancerskih lekova po pravilu uzrokuje pojavu toksičnih efekata i na zdrava tkiva, pa je bilo potrebno uvesti je kao kontrolu (Vasilijević i sar., 2018).

Citotoksična aktivnost etarskih ulja različitih vrsta roda *Juniperus* prema različitim kancerskim ćelijama poreklom od malignih tumora mozga, pluća, jetre, dojke i grlića materice, potvrđena je u istraživanju El-Sawi i sar. (2007). Važna karakteristika etarskih ulja i njihovih pojedinačnih jedinjenja je hidrofobnost koja im omogućava akumulaciju u ćelijskim membranama. Ona interaguje sa lipidnom membranom, narušavaju njenu strukturu i povećavaju njenu permeabilnost. Navedeni procesi uzrokuju poremećaj enzimskog sistema i gubitak ćelijskog sadržaja, koji vode ka ćelijskoj smrti (Lv i sar., 2011; Moreira i sar., 2005)

Uzimajući u obzir hemijski sastav etarskog ulja *J. communis*, citotoksičnost bi se mogla pripisati lipofilnim terpenoidnim jedinjenjima, koje primarno vode destrukciji membrane mitohondrija i utiču na povećanje nivoa RKV u ćeliji (Bakkali i sar., 2008). Za neke monoterpe prisutne u ulju je dokazan antikancerski potencijal: na primer, α -pinen ispoljava antiproliferativni i proapoptotski efekat prema različitim kancerskim ćelijama (Chen i sar., 2015; Kusuhara i sar., 2012; Matsuo i sar., 2011), d-limonen je pokazao antikancersku aktivnost prema ćelijama neuroblastoma i ćelijama karcinoma želuca (Russo i sar., 2014; Zhang i sar., 2014). Navedene komponente čine 36,07 % ukupnog sastava etarskog ulja, međutim, ni doprinos ostalih komponenti nije isključen (Burt, 2004). Veća citotoksičnost ulja prema kancerskim ćelijama A549 može se objasniti i dodatnim mehanizmima koji su karakteristični za maligne ćelije, a to su inhibicija topoizomeraze, modulacija p53, bcl-2, AMPK i MAPK/ERK, Chk2-CDC25 signalnih puteva, kao i inhibicija izoprenilacije p21^{ras}. Ovi mehanizmi su opisani za α -pinen, limonen, β -elemen, β -kariofilen i α -humulen (Aydin i sar., 2013; Lesgards i sar., 2014).

Sa druge strane, citotoksičnost PDO je značajno manja. Ona se pripisuje polifenolima u njegovom sastavu. Naime, iako su oni poznati kao prirodni antioksidanti, prisutni u visokim koncentracijama mogu izazvati pro-oksidativni efekat i na taj način indukovati citotoksičnost (Babich i sar., 2011). Zaista, rezultati ove studije su pokazali da su efektivne koncentracije PDO bile izuzetno visoke, pa se citotoksični efekat može objasniti upravo pro-oksidativnim efektom polifenola.

Rezultati citotoksičnosti usmerili su dalja istraživanja na druge aspekte antikancerskog dejstva. Uzimajući u obzir da je apoptoza, ili programirana ćelijska smrt, poželjni ishod antikancerske aktivnosti, ispitan je efekat derivata *J. communis* da indukuju ćelijsku smrt A549 ćelija (Vasilijević i sar., 2018). Eventualna klinička upotreba biljnih derivata zahteva dalja istraživanja, a sa aspekta bezbednosti, važni su rezultati genotoksičnosti na humanim ćelijskim linijama, MRC-5 i A549. Uz bezbednosne aspekte, istraživanje genotoksičnog efekta je važno i sa stanovišta rasvetljavanja mehanizama citotoksičnog delovanja test supstanci, s obzirom da je opšte poznata činjenica da citostatici po pravilu dovode do oštećenja na molekulu DNK (Connor i McDiarmid, 2006).

Ispitivanje efekta biljnih derivata na tok ćelijskog ciklusa i ćelijsku smrt pokazalo je da PDO zaustavlja proliferaciju A549 ćelija u G_2/M kontrolnoj tački ciklusa i povećava broj ćelija u sub- G_1

fazi ćelijskog ciklusa, indukujući fragmentaciju DNK, koja predstavlja parametar apoptoze. Navedene činjenice donekle rasvetljavaju citotoksičnost PDO, ukazujući da je jedan od mogućih mehanizama sposobnost indukcije apoptoze. U prilog tome je činjenica da je PDO primenjen u najvećim koncentracijama indukovao značajni genotoksični efekat, koji je bio izraženiji u A549 ćelijama u poređenju sa normalnim (Vasilijević i sar., 2018). Naime, poznato je da DNK oštećenja mogu aktivirati p53 signalni put, koji zaustavlja ćelijski ciklus i omogućava ćeliji da popravi oštećenje ili pak inicira apoptozu (Vogelstein i sar., 2000). Međutim, u slučaju naših rezultata dobijenih na A549 liniji, s obzirom da je detektovan i genotoksični i pro-apoptotski efekat, smatramo da nije došlo do efikasne reparacije oštećenja na molekulu DNK, već su ona dovela do usmeravanja ćelija u apoptozu. U prilog tome idu i literaturni podaci, koji ukazuju da pojedini konstituenti PDO imaju pro-apoptotski efekat. Tako je pokazano da flavonoid kvercetin izaziva zastoj ćelijskog ciklusa i indukuje apoptozu u humanim kancerskim ćelijama grlića materice, mehanizmima koji uključuju aktivaciju p53 i inhibiciju NF-kB (Priyadarsini i sar., 2010). Potvrđen je pro-apoptotski efekat luteolina u A459 ćelijama (Meng i sar., 2016a) i apigenina u ćelijama karcinoma želuca i ćelijama limfoma (Hashemi i sar., 2010). Kada govorimo o jedinjenjima koja mogu biti odgovorna za genotoksičnost PDO, mislimo da bi ona mogla biti inicirana upravo pro-oksidativnom aktivnošću polifenola. Značajni su literaturni podaci koji ukazuju da rutin, dominantna identifikovana komponenta u sastavu PDO, može da izazove oštećenja na molekulu DNK i da utiče na signalne puteve, što dovodi do apoptoze kancerskih ćelija (Marcarini i sar., 2011; Perk i sar., 2014). Međutim, vredno je istaći i činjenicu da je genotoksični potencijal PDO, u poređenju sa DOX kao pozitivnom kontrolom, bio značajno niži u normalnim MRC-5 ćelijama, što ukazuje da bi potencijalna upotreba PDO bila bezbednija od samog DOX.

Prema ranijem istraživanju, ekstrakt šišarki *J. communis* efikasno indukuje apoptozu tako što povećava nivo p53 proteina u humanim ćelijama neuroblastoma, SH-SY5Y (Lantto i sar., 2016). Prva *in vivo* studija (Tsai i sar., 2018) je pokazala da ekstrakt *J. communis*, subkutano ubrizgan pacovima, može uspešno da probije hemato-encefalnu barijeru i da indukuje apoptozu ćelija glioma. Najnovija istraživanja pokazuju da ekstrakt *J. communis* može indukovati apoptozu kod različitih kancerskih ćelija uključujući A549, HepG2 (ćelije hepatokarcinoma), 22RV1 i DU145 (ćelije karcinoma prostate), regulacijom većeg broja signalnih puteva: inhibicijom PI₃K/Akt i aktivacijom p53 puta (Raasmaja i sar., 2019). Takođe, rezultati istraživanja Gao i sar. (2019) potvrđuju antikancersku aktivnost ekstrakta na ćelije melanoma *in vitro*, dok u *in vivo* uslovima utiče na smanjenje rasta tumora, bez uočljivog toksičnog uticaja na ostale organe kod miša. Antikancerska aktivnost ekstrakta *J. communis* u *in vitro* i *in vivo* uslovima, uočena u ovm radu, posredovana je različitim mehanizmima, uključujući inhibiciju proliferacije ćelija, zaustavljanje ćelijskog ciklusa, indukciju apoptoze i smanjenje angiogeneze.

Kada govorimo o citotoksičnosti etarskog ulja, iako je ono bilo značajno efikasnije pa je citotoksični odgovor uočen na dozama koje su nekoliko redova veličine manje od onih definisanih za PDO (Vasilijević i sar., 2018), na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu ne možemo sa preciznošću utvrditi tip ćelijske smrti koje ulje izaziva. Naime, odsustvo genotoksičnosti i jasnog pro-apoptotskog efekta je neočekivano i zahteva dalje analize. Iako ulje nije pokazalo genotoksični efekat na humanim ćelijama *in vitro*, zbog mogućih drugih neželjenih efekata, neophodno je uraditi veći broj ispitivanja pre nego što bi se ono proglasilo bezbednim za ljudsku upotrebu (Burt, 2004).

Poželjna karakteristika delovanja citostatika je veća selektivnost prema kancerskim ćelijama, i zato selektivna toksičnost predstavlja jedan od glavnih kriterijuma u ispitivanjima novih hemioterapijskih agenasa i njihove kliničke primene (de Oliveira i sar., 2016). Na osnovu istraživanja citotoksičnosti i kvantifikacije preko vrednosti SI_K, prednost oba derivata *J. communis*, a naročito PDO, ogleda se u njihovoj većoj selektivnosti prema A549 ćelijama u poređenju sa DOX. Iako se, prema kvantitativnom kriterijumu, selektivnost etarskog ulja ne može smatrati značajnom (SI_K<2), ono se pokazalo mnogo manje toksičnim za normalne ćelije, tačnije, vrednosti SI_K indeksa su bile veće, nego u slučaju konvencionalnog citostatika DOX (1,7 za ulje, 0,3 za DOX). Takođe, ono je ostvarilo citotoksični efekat koji se može smatrati značajnim za dalja ispitivanja, a naročito

kada se ima u vidu povećana rezistencija A549 ćelijske linije prema konvencionalnim citostaticima (Kweon i sar., 2006).

Citotoksičnost DOX ostvaruje se umetanjem u molekul DNK kao i vezivanjem za topoizomerazu II, što vodi nastanku prekida i posledičnoj inhibiciji replikacije i transkripcije. Pokazano je takođe da DOX omogućava stvaranje RKV, što dodatno doprinosi njegovom citotoksičnom delovanju (Mizutani i sar., 2005; Wang i sar., 2012). Slično kao i drugi citostatici, DOX izaziva neželjene efekte reverzibilne prirode, kao što su mučnina, povraćanje, mijelosupresija, aritmija i alopecija. Međutim, DOX može da izazove neželjene efekte ireverzibilne prirode, kao što je oštećenje miokarda, koje posledično može dovesti do kardiomiopatije i kongestivne srčane insuficijencije (Varela-López i sar., 2019; Chen i sar., 2007). Uzimajući u obzir da je klinička upotreba DOX ograničena usled brojnih neželjenih efekata, potreba za novim agensima koji bi mogli da smanje njegove terapijske doze bila je osnovni motiv za ispitivanje kombinovanog efekta ovog leka i derivata kleke. Rezultati citotoksičnosti pojedinačnih test supstanci dodatno su podstakli ova istraživanja, ukazujući na veću selektivnost derivata kleke prema kancerskim ćelijama. Sa druge strane, citotoksičnost DOX na MRC-5 ćelijama bila je veća u poređenju sa citotoksičnim efektom postignutim na kancerškoj ćelijskoj liniji, čime je pokazana njegoova neselektivna toksičnost prema A549, barem u našoj studiji. Jedno od mogućih objašnjenja dobijene veće toksičnosti DOX je povećana rezistentnost i jači mehanizmi antioksidativne zaštite A549 ćelija, koji ove ćelije štite od oksidativnog stresa izazvanog delovanjem DOX. Istraživanja Kweon i sar. (2006) su pokazala da je rezistencija A549 ćelija nastala kao rezultat konstitutivno povišene ekspresije hem oksigenaze 1, što dovodi do povećane antioksidativne zaštite u ovim ćelijama. Međutim, imajući u vidu i druge mehanizme delovanja DOX, rezultati dobijeni sa ovim citostatikom čine se neočekivanim. Međutim, slični rezultati dobijeni su i od strane nekih drugih autora, koji su pokazali da je citotoksični efekat 5-FU i drugih referentnih citostatika (cisplatina, karboplatina i oksaliplatina) bio izraženiji na normalnim ćelijama u poređenju sa kancerskim (Gao i sar., 2019; Simić i sar., 2015).

Kombinovana primena različitih citostatika i prirodnih proizvoda može da poboljša efikasnost hemioterapijskih agenasa (Srdic-Rajic i sar., 2016). Na primer, pokazan je antiproliferativni efekat na ćelijama melanoma i glioblastoma, primenom ekstrakta *J. communis* u kombinaciji sa 5-FU i temozolomidom (Gao i sar., 2019; Tsai i sar., 2018). Mogućnost smanjenja doze konvencionalnog citostatika DOX i sprečavanje snažnih nuspojava koje on izaziva, posebno kardiotoksičnosti, mogla bi biti nova strategija u lečenju karcinoma pluća (Tong i sar., 2012). U prilog tome su rezultati ispitivanja kombinovanog efekta derivata *J. communis* sa DOX, koji nedvosmisleno pokazuju veću osetljivost kancerskih ćelija (Vasiljević i sar., 2018). Jači sinergizam u A549 ćelijama, u slučaju PDO, moguće je objasniti činjenicom da on, kroz različite mehanizme delovanja, može dovesti do povećane produkcije RKV, što bi dalje moglo da doprinese povećanju stepena oksidativnog stresa koji DOX indukuje. Naime, PDO je pokazao dobru antioksidantnu aktivnost, te je verovatno da u velikim koncentracijama, koje su i bile citotoksične, deluje pro-oksidativno (Babich i sar., 2011). Pored toga, treba istaći i da su rezultati ove studije ukazali da bi jedan od mogućih antikancerskih mehanizama PDO mogao biti indukcija apoptoze, dok je za DOX ovaj mehanizam već utvrđen prethodnim istraživanjima (Carvalho i sar., 2009; Kluza i sar., 2004; Li i sar., 2006). Imajući to u vidu, moglo bi se pretpostaviti da bi jedan od mogućih mehanizama kombinovanog efekta PDO i DOX takođe mogao biti indukcija apoptoze. Međutim, neophodna su dodatna ispitivanja kako bi se što preciznije objasnili mehanizmi antikancerskog delovanja PDO, koji su ipak u velikoj meri nepoznati. Sa druge strane, povećana permeabilnost ćelijske membrane, kao posledica delovanja etarskog ulja, najverovatnije olakšava unošenje DOX u ćeliju i njegovu akumulaciju u jedru, što kao rezultat ima povećanje njegovog citotoksičnog efekta (Ambrož i sar., 2016).

U literaturi nema puno podataka o mehanizmima interakcije bioaktivnih komponenti/prirodnih proizvoda kleke i različitih antikancerskih lekova. Studija Iriti i sar. (2017) navodi da je rutin značajno povećao antikancersku aktivnost hemoterapeutika ciklofosfamida i metotreksata u ćelijama raka dojke, inhibicijom aktivnosti efluksa pumpi. Ovaj flavonoid smanjuje

aktivnost proteina transportera: P-glikoproteina (P-gp protein) i BCRP proteina (eng. *Breast Cancer Resistance Protein*) i na taj način povećava antikancersku aktivnost pomenutih citostatika. Takođe, pokazano je da rutin uspešno zaustavlja dalji tok ćelijskog ciklusa u G₂/M i G₀/G₁ fazi i inicira apoptozu. Pokazano je da prisustvo ekstrakta *J. communis* povećava osetljivost kancerskih ćelija A549 na delovanje 5-FU i gemcitabina. Pojedinačni efekat ovih citostatika doveo je do smanjenja nivoa enzima Akt signalnog puta, pAkt i pGsk3β, koji štite ćelije od ulaska u apoptozu. U kombinovanom tretmanu ekstraktom kleke sa pomenutim citostaticima detektovano je još značajnije smanjenje nivoa ovih enzima, što ukazuje na njihovo sinergističko dejstvo. Kao posledica smanjenja nivoa enzima, dalje dolazi do smanjenja aktivnosti Akt-signalnog puta i povećanja broja ćelija u apoptozi (Raasmaja i sar., 2019). Ostvareni jači sinergizam u A549 ćelijama u poređenju sa MRC-5 u skladu je sa ranije pomenutim podacima koji sugerišu da neka etarska ulja i jedinjenja iz grupe polifenola mogu da aktiviraju dodatne puteve apoptoze specifične za kancerske ćelije (Lesgards i sar., 2014; Mahbub i sar., 2015; Wang i sar., 2004; 2012). Slično objašnjenje važi za pojačani citotoksični efekat PDO kada je ispitan u kombinaciji sa etarskim uljem. Treba naglasiti da je njihov sinergizam detektovan po prvi put.

Radi dobijanja kompletnije slike o biološkim aktivnostima kleke ispitana je antimikrobna aktivnost njenih derivata. Pored svih pomenutih blagotvornih dejstava, za koje se tvrdi da vrste roda *Juniperus* poseduju, u ranijim istraživanjima je posebna pažnja bila usmerena na ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata, etarskih ulja i njihovih pojedinačnih komponenti (Cavaleiro i sar., 2006; Pepeljnjak i sar., 2005; Taviano i sar., 2013; Zheljzakov i sar., 2017). Iako je antimikrobni potencijal prema različitim mikroorganizmima dosta izučavan, u ovoj studiji akcenat je bio na ispitivanju efekta PDO i etarskog ulja prema kontaminentima hrane – patogenim bakterijama i gljivama – uzročnicima njenog kvarenja (Nikolić i sar., 2019). Sličan odabir bakterija i gljiva izvršen je i u studiji Šiler i sar. (2014).

Gljive iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* produkuju mikotoksine, uzročnike trovanja hranom. Kako se mikotoksikoze svrstavaju među deset najvažnijih rizika po zdravlje ljudi, činjenica da etarska ulja i njihove komponente mogu da inhibiraju ekspresiju nekih enzima, koji se smatraju ključnim u sintezi mikotoksina, može biti od velikog značaja (Singh i sar., 2010). Pregledom literature stiče se utisak da su antifungalni mehanizmi etarskih ulja i njihovih pojedinačnih komponenti bolje istraženi nego mehanizmi kojim ekstrakti deluju kao antifungalni agensi. Prema Freisesleben i Jager (2014), ulja antifungalni potencijal mogu ostvariti narušavanjem strukture i funkcije ćelijske membrane i inhibicijom sinteze ćelijskog zida. Dodatno, ona svoj antifungalni efekat mogu ostvariti i delovanjem unutar ćelije, na taj način što dovode do poremećaja funkcije mitohondrija i inhibicije efluks pumpe, ponovo delujući na nivou membrana. Brojni su primeri antifungalnog delovanja ulja u literaturi. Tako je etarsko ulje *Citrus sinensis* inhibiralo rast *A. niger* i izazvalo ireverzibilne morfološke promene hifa (Sharma i Tripathi., 2008). Slične rezultate su dobili Tao i sar. (2014), korišćenjem ulja *Citrus reticulata* prema *Penicillium italicum* i *Penicillium digitatum*. Izlaganje *C. albicans* uljima *Nigella sativa* i *Melaleuca alternifolia* dovelo je do značajnog oštećenja ćelijskog zida i disfunkcije ćelijske membrane (İşcan i sar., 2016; Hammer i sar., 2004). Timol, jedan od dominantnih komponenata etarskog ulja *Monarda punctata*, ali i mnogih drugih ulja, indukovao je stvaranje RKV u sporama, lizirao ih i na taj način ostvario efikasnu fungicidnu aktivnost prema *Aspergillus flavus* (Shen i sar., 2016). Takođe, postoje studije koje se bave ispitivanjem efekta etarskih ulja na formiranje biofilma; tako je npr. pokazana antibiofilm aktivnost ulja prema patogenima *C. albicans* i *A. fumigatus* (Nazzaro i sar., 2017).

Sa druge strane, novije studije daju pregled mehanizama delovanja različitih ekstrakata na patogene gljive. Tako je na primer pokazano da komponente ekstrakta *Scutellaria baicalensis* bajkalein i vagonin izazivaju programiranu ćelijsku smrt sličnu apoptozi kod humanih patogena *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *A. fumigatus* i *C. albicans* (Da i sar., 2019). U cilju rasvetljavanja mehanizama delovanja biljnih ekstrakata bitno je istaći da fenoli, koji po pravilu ulaze u njihov sastav, antifungalni efekat ostvaruju tako što deluju na nivou ćelijskog zida i ćelijske membrane, a takođe narušavaju i funkciju mitohondrija (Lagrouh i sar., 2017), slično kao i etarska ulja.

O delovanju derivata vrste *J. communis* na kvasce i gljive dostupni su oskudni podaci. Na primer, u samo nekoliko radova je istaknut antifungalni efekat ekstrakta i etarskog ulja ove vrste (Falcão i sar., 2018; Fierascu i sar., 2018), a prema našem saznanju efekat PDO je prvi put ispitivan u našoj studiji (Nikolić i sar., 2019). Rezultati naše studije ukazuju na slab, skoro zanemarljiv antifungalni efekat Jc-EU-P, što je donekle u saglasnosti sa dostupnim podacima o slaboj aktivnosti etarskog ulja dobijenog iz šišarki *J. communis* i nešto jačoj iz iglica (Glišić i sar., 2007; Cabral i sar., 2012). U istraživanju Angioni i sar. (2003) ispitan je efekat etarskih ulja različitih vrsta roda *Juniperus* i njihovih pojedinačnih komponenti prema *C. albicans*, pri čemu je jedino β -3-karen pokazao umeren efekat. Takođe, pokazano je da ulje kleke nije značajno uticalo na rast, sporulaciju i produkciju aflatoksina kod *Aspergillus parasiticus* (Gömöri i sar., 2018).

Sa druge strane, PDO je pokazao umerenu antifungalnu aktivnost, utvrđenu prema skali o antimikrobnom potencijalu koja je predložena od strane Holetz i sar. (2002). Naime, na osnovu vrednosti MIK, antimikrobni agensi su grupisani u one sa jakim ($\text{MIK} < 0,1 \text{ mg/mL}$), umerenim ($0,1 \text{ mg/mL} < \text{MIK} < 0,5 \text{ mg/mL}$) i slabim ($0,5 \text{ mg/mL} < \text{MIK} < 1 \text{ mg/mL}$) antimikrobnim potencijalom. Efekat PDO ogledao se u boljoj fungistatičkoj i fungicidnoj aktivnosti prema većem broju indikatorskih sojeva mikromiceta u poređenju sa antifungalnim efektom Jc-EU-P. Antifungalni efekat PDO bio je najslabiji u slučaju *C. albicans*, međutim u kombinaciji sa bif postignut je sinergistički efekat. Naime, iako su vrednosti MIK pojedinačno određene za PDO i bif bile veoma visoke, primenjene u kombinaciji, ove test supstance delovale su sinergistički, pri čemu je MIK vrednost bif bila smanjena čak 16 puta. Dobijeni rezultat je značajan, imajući u vidu povećanu rezistenciju *C. albicans* prema azolnim lekovima kao što je bif (White i sar., 2002). Dobijeni rezultati otvaraju put za dalja istraživanja, u cilju moguće primene PDO u dopunskoj terapiji raznih gljivičnih infekcija, uključujući kandidijaze.

Kako bismo ustanovili koje bi pojedinačne komponente mogle biti odgovorne za uočenu antifungalnu aktivnost, izvršili smo opsežnu analizu literaturnih izvora na ovu temu. Pregled rezultata antifungalne aktivnosti različitih flavonoida prema *C. albicans* i analize mogućih mehanizma njihovog delovanja prikazani su u studijama Aboody i Mickymaray (2020) i Seleem i sar. (2017). Pregledom literature uočene su studije koje su ukazale na visok ili umeren potencijal rutina da inhibira rast *C. albicans* (Han, 2009; Šiler i sar., 2014;), ali da je bilo i onih koje su tvrdile da rutin nema antifungalni efekat (Araruna i sar., 2012; Johann i sar., 2011). Osim rutina, antifungalna aktivnost potvrđena je za apigenin, katehin, izokvercitrin i kvercetin prema različitim vrstama roda *Candida*, kao i za kvercetin u slučaju *A. fumigatus* (Lee i sar., 2018; Sadeghi-Ghadi i sar., 2020; Sitheeque i sar., 2009; Yun i sar., 2015). Studija Tiwari i sar. (2017) ističe snažan antifungalni efekat kvercetina prema *A. flavus* i *A. parasiticus*, dok je efekat fenolnih kiselina (galne i kafene) bio nešto slabiji.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja antifungalnog efekta, moglo bi se reći da se PDO izdvojio kao efikasan antifungalni agens za razliku od Jc-EU-P, što je potvrđeno i vrednostima SI_M (Nikolić i sar., 2019). Naime, u cilju procene rizika potencijalne upotrebe derivata kleke kao antifungalnih agenasa, određena je njihova selektivna toksičnost prema gljivama u odnosu na sve testirane humane ćelijske linije. PDO je pokazao veću selektivnu toksičnost prema svim analiziranim gljivama osim *C. albicans*, s tim da je ona bila najveća kada je računata u odnosu na HCT116 ćelije. Različita osetljivost testiranih sojeva gljiva i ćelijskih linija zasnovano je na molekularnim karakteristikama svojstvenim svakoj od njih (Fedorova i sar., 2005), što sugerise neophodnost upotrebe više od jedne ćelijske linije za istraživanja, uključujući i procenu selektivne toksičnosti. Generalno, visoke vrednosti SI_M ukazuju na dobar potencijal PDO u ostvarivanju mikotoksikološke bezbednosti hrane, ali i drugim aspektima njegove potencijalne upotrebe kao antifungalnog agenasa. Zbirno gledano, rezultati analize antifungalnog efekta etarskog ulja i PDO *J. communis* otvaraju put za dalja istraživanja u cilju moguće primene PDO u terapiji raznih gljivičnih infekcija, uključujući kandidijaze.

Budući da je *C. albicans* sastavni deo mikrobioma čoveka, ova gljiva je normalno prisutna i na mukoznim membranama digestivnog trakta. To znači da je u stalnom kontaktu sa intestinalnim ćelijama na koje se može adherirati, međutim njena prekomerna adhezija i nekontrolisana

proliferacija mogu dovesti do različitih patoloških stanja. Kod osoba sa oslabljenim imunitetom česta je pojava kandidijaza; kod njih gljive lako prelaze iz komensalne kvasolike u patogenu hifalnu formu i izazivaju infekcije (Sawant i Khan, 2017). Naime, promena ćelijske morfologije i filamentozni rast, tj. prelazak u formu hifa, smatra se jednim od najznačajnijih faktora virulencije *C. albicans* (Jacobsen i sar., 2012). Pored navedenog morfološkog dimorfizma, u važne faktore virulencije ubrajaju se i ekspresija proteina važnih za procese adhezije i invazije, tigmotropizam (promena orijentacije rasta kao posledica promene sredinskih uslova), sposobnost formiranja biofilma, fenotipska plastičnost kao i produkcija hidrolitičkih enzima (Mayer i sar., 2013).

Rezultati naših istraživanja su pokazali značajnu sposobnost Jc-EU-P da inhibira proces adhezije *C. albicans* na HT-29 ćelije, iako su vrednosti MIK određene za ulje bile visoke (11,81 mg/mL). Međutim, treba imati u vidu da su inhibicije adhezije i rasta nezavisne, te da smo anti-adhezivni potencijal i određivali za sub-inhibitorne doze. Ovi rezultati ukazuju na visok potencijal etarskog ulja da spreči prekomernu proliferaciju *C. albicans* u gastrointestinalnom traktu i njenu transformaciju u patogenu formu. Pregledom literature nisu nađeni podaci o potencijalu etarskog ulja *J. communis* da inhibira adheziju *C. albicans* na ćelije kolona čoveka. Sudjana i sar. (2012) su ukazali na visok potencijal ulja *Melaleuca alternifolia* da inhibira adheziju *C. albicans* na ćelije grlića materice (HeLa). Budzyńska i sar. (2014) su pokazali da različita etraska ulja redukuju adheziju *C. albicans* na ćelije fibroblasta na taj način što smanjuju ekspresiju adhezina i blokiraju morfološku transformaciju. Imajući u vidu da su proces adhezije i invazije u osnovi povezani sa formiranjem hifa, zanimljivo je to da etarsko ulje kedra (*Cedrus libani*) inhibira rast hifa i na taj način smanjuje adheziju. Takođe, pokazano je da kamfor, jedna od aktivnih komponenti ulja kedra, smanjuje ekspresiju gena koji kodiraju proteine uključene u hifalni rast ćelije (*ECE1*, *ECE2* (*HWPI*), *RBT1* i *EEDI*) (Manoharan i sar., 2017). Budući da je pokazana uloga Ras/cAMP signalnog puta u regulaciji genske ekspresije adhezina, pretpostavlja se da linalol i kamfor narušavaju ovaj signalni put i na taj način inhibiraju rast hifa *C. albicans* (Hsu i sar., 2013). Slično, magnolol i honokiol, lignani prisutni u etanolnom ekstraktu *Magnolia officinalis*, narušavaju Ras1-cAMP-Efg1 signalni put koji je uključen u regulaciju inhibicije adhezije, filamentoznog rasta i formiranje biofilma, i na taj način smanjuju adheziju *C. albicans*. U tretmanu sa pomenutim neolignanima nivo ekspresije nekih specifičnih gena koji su uključeni u hifalni rast ćelije, a koji su regulisani ovim signalnim putem, značajno je smanjen (Sun i sar., 2015).

Neočekivano, u prisustvu PDO proces adhezije ne samo što nije bio inhibiran, već je bio značajno stimulisan. Dobijeni rezultati su bili iznenađujući, imajući u vidu hemijski sastav i biološke aktivnosti flavonoida koji ulaze u sastav ekstrakata *Juniperusa*, uključujući anti-adhezivni i već pomenuti antifungalni efekat prema *C. albicans* (Gao i sar., 2016; Lee i sar., 2018;). Rezultati istraživanja Ivanov (2019) ističu potencijal odabranih flavonoida, posebno apigetrina, apigenina i izokvercitrina da inhibiraju proces formiranja biofilma i prelazak iz kvasolike u hifalnu formu.

Kako bi objasnili uočeni efekat PDO, vredno je istaći da hidrofobnost površine ćelije (eng. *Cell Surface Hydrophobicity*, CSH) ima važnu ulogu u inicijalnoj fazi adhezije *C. albicans* na ćelije domaćina i različite površine medicinskih materijala (Masuoka i sar., 2004; Panagoda i sar., 2001). Neka prethodna istraživanja su pokazala da postoji pozitivna korelacija između CSH i adhezije različitih vrsta roda *Candida* na biotičke i abiotičke površine (Li i sar., 2003; Luo i Samaranyake., 2002; Panagoda i sar., 2001; Silva-Dias i sar., 2015). Pokazano je da neki derivati biljaka mogu da povećavaju vrednost CSH i tako stimulišu filamentozni rast i formiranje biofilma. Tako, npr. vodeni ekstrakt *Azadirachta indica* povećava CSH *C. albicans* i stimuliše formiranje biofilma (Polaquini i sar., 2006). Ova pojava nije karakteristika isključivo gljiva, već se povezuje i sa adhezijom i formiranjem biofilma bakterija. Tako je pokazano da flavonoid 4',5,7-trihidroksi-6-metilflavanon značajno stimuliše proces formiranja biofilma kod *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Stimulacija formiranja biofilma u celosti, ili barem delimično može biti povezana sa povećanim nivoom hidrofobnosti (Nobakht i sar., 2017). Uzimajući u obzir sve navedeno, možemo da pretpostavimo da flavonoidi u sastavu PDO mogu povećavati hidrofobnost *C. albicans* i na taj način stimulisati adheziju *C. albicans* na HT-29 ćelije.

Za razliku od antifungalne aktivnosti koja je do sada bila slabo istraživana, antibakterijski potencijal etarskih ulja i ekstrakata različitih vrsta roda *Juniperus* bio je predmet brojnih istraživanja (Ehsani i sar., 2012; Ložienė i sar., 2016; Martz i sar., 2009; Miceli i sar., 2020; Zhang i sar., 2020). Istaknut je antibakterijski efekat etarskog ulja *J. communis* prema gram-pozitivnim bakterijama, dok su gram-negativne uglavnom pokazivale veći stepen rezistencije (Ehsani i sar., 2012; Lesjak, 2011; Wanner i sar., 2010). Ova činjenica je u skladu sa opštim stavom da su gram-pozitivne bakterije osetljivije na delovanje etarskih ulja i biljnih ekstrakata od gram-negativnih, što se dovodi u vezu sa različitom propustljivošću njihovog ćelijskog zida (Kalemba i sar., 2003; Tajkarimi i sar., 2010). Rezultati ove studije su pokazali uglavnom slab antibakterijski efekat Jc-EU-P i PDO (Nikolić i sar., 2019), što je u saglasnosti sa rezultatima Glišić i sar. (2007). Slabija antimikrobna aktivnost ulja, u poređenju sa onom koju je ostvario PDO, može biti posledica isključivog sadržaja terpenkih ugljovodonika, koji prema podacima iz literature imaju niži antimikrobni potencijal od oksidovanih terpenoida (Dorman i Deans, 2000; Griffin i sar., 1999). Na primer, efekat 4-terpineola je bio značajan kada su u pitanju bile neke gram-negativne bakterije (Angioni i sar., 2003; Filipowicz i sar., 2003), dok je antimikrobni efekat ostvaren u slučaju α -pinena, β -pinena, sabinena, γ -terpinena, β -mircena i limonena prema *E. coli*, *S. aureus* i *B. cereus* bio slab ili gotovo zanemarljiv (Dorman i Deans, 2000). Aktivnost monoterpenskih ugljovodonika nije bila okarakterisana kao značajna ni u drugim studijama (Angioni i sar., 2003; Filipowicz i sar., 2003; Matias i sar., 2016; Sonboli i sar., 2006). Takođe, aktivnost etarskih ulja ne zavisi samo od dominantnih komponenti u njegovom sastavu, već i od interakcija između glavnih i manje zastupljenih jedinjenja. Različite komponente ulja samostalno ili sinergistički deluju na različite strukture bakterijske ćelije (Hyldgaard i sar., 2012). Međutim, i pored činjenice da su terpenki ugljovodonici dominantni (ili u slučaju Jc-EU-P i jedini) konstituenti ulja, postoje izveštaji prethodnih studija koji, za razliku od našeg, ističu dobar antibakterijski potencijal etarskog ulja *J. communis* prema *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *S. aureus*. Različita biološka aktivnost etarskih ulja dobijena u različitim studijama posledica je različitog hemijskog sastava. Na kvalitativni i kvantitativni sastav utiču promenljivi uslovi životne sredine, uključujući temperaturu, relativnu vlažnost vazduha, izlaganje suncu i vetru (Wang i sar., 2006). Takođe, poreklo ulja i sam postupak destilacije značajno utiču na variranje hemijskog sastava (Filipowicz i sar., 2003; Zheljzakov i sar., 2017). Različitu biološku aktivnost pokazuju i pojedinačne komponente u sastavu ulja. I dok su jedni tvrdili da α -pinen, β -pinen, sabinen, limonen, γ -terpinen, α -terpineol, p-cimen, germakren imaju antimikrobni potencijal (Filipowicz i sar., 2003; Ložienė i sar., 2016; Oyedemi i sar., 2009; Zanetti i sar., 2010), drugi su tvrdili, kao što je gore već navedeno, da većina ovih jedinjenja pokazuje zanemarljiv antimikrobni potencijal ili ga nema uopšte (Dorman i Deans, 2000). Neusaglašenost u vezi sa rezultatima antimikrobnog potencijala etarskih ulja, a naročito rezultata antimikrobnog potencijala pojedinačnih komponenti, govori u prilog tome da aktivnost monoterpna nije tako jednoznačna. Kao što je ranije već istaknuto, ulje zbog svoje hidrofobnosti interaguje sa ćelijskom membranom bakterija i povećava njenu permeabilnost. Naime, permeabilnost ćelijske membrane nastaje kao rezultat promene membranskog potencijala, tj. smanjene aktivnosti protonske pumpe i izlaska jona iz ćelije, što kao posledicu ima lizu i ćelijsku smrt. Smatra se da je pomenuti mehanizam najodgovorniji za oštećenje bakterijske ćelije izazvano etarskim uljima (Burt, 2004). Budući da se u sastavu etarskih ulja nalazi veliki broj različitih komponenti i njihovo antibakterijsko delovanje se može zasnivati na postojanju više različitih mehanizama delovanja (Hyldgaard i sar., 2012; Meng i sar., 2016b).

Dalje, Kovač i sar. (2015) su u svojim istraživanjima pokazali da α -pinen ima značajnu ulogu u kontroli antibiotske rezistencije posredovane različitim mehanizmima, uključujući inhibiciju aktivnosti efluks pumpi, narušavanje strukture ćelijske membrane i poremećaj metabolizma kod *Campylobacter jejuni*. Pokazana je sposobnost eugenola, γ -terpinena i α -terpineola da oštećuju ćelijski zid i narušavaju integritet ćelijske membrane bakterija *L. monocytogenes*, *S. pyogenes*, *P. vulgaris* i *E. coli*, a takođe da izazivaju curenje (eng. *leakage*) proteina i lipida iz ćelija. Na taj način, navedene komponente vrše strukturnu i funkcionalnu destabilizaciju ćelijske membrane, što predstavlja jedan od mogućih mehanizama kojim ostvaruju

svoju antibakterijsku aktivnost (Chouhan i sar., 2017; Oyedemi i sar., 2009). U studijama Peruć i sar. (2018, 2019) ispitan je efekat ulja *J. communis* na odabrane mikobakterije. Pokazano je da ono narušava integritet ćelijske membrane i izaziva curenje ćelijskog sadržaja, što je potvrđeno od strane Meng i sar. (2016b) upotrebom transmisiona elektronske mikroskopije (TEM).

Sa druge strane, bolja antibakterijska aktivnost PDO, naročito izražena prema *L. monocytogenes*, može biti objašnjena antimikrobnim potencijalom polifenola (Daglia, 2012). Pokazano je da polifenoli, naročito flavonoidi, mogu biti efikasni antimikrobni agensi prema širokom spektru mikroorganizama (Cushinie i Lamb, 2005; Orhan i sar., 2010). Istraživanjem mehanizama delovanja flavonoida pokazano je da ova jedinjenja imaju više različitih ciljnih mesta u ćeliji. Na primer, pretpostavlja se da epigalokatehin-galat deluje na nivou ćelijske membrane, dok se antimikrobna aktivnost kvercetina i apigenina može delimično pripisati njihovoj sposobnosti da inhibiraju DNK girazu. Katehini primarno izazivaju disrupciju ćelijske membrane, što posledično dovodi do „curenja“ ćelijskog sadržaja i ćelijske smrti (Cushinie i Lamb, 2005; Morimoto i sar., 2015).

Među flavonoidima čiji su mehanizmi delovanja izučavani je i rutin, za koga je pokazano da inhibira katalitičku aktivnost topoizomeraze IV, indukuje SOS odgovor i na taj način inhibira rast *E. coli* (Bernard i sar., 1997). Martz i sar. (2009) su ispitivali antibakterijski potencijal ekstrakta iglica *J. communis*, kao i antibakterijski potencijal izolovane fenolne i terpenoidne frakcije ovog ekstrakta. Onu su istakli bolju aktivnost fenolne frakcije u inhibiciji rasta *S. aureus*, u poređenju sa efektom terpenoidne frakcije. Iako precizni mehanizam delovanja ekstrakta nije poznat, istraživanja Martz i sar. (2009) sugerišu da jedinjenja iz fenolne frakcije u većoj meri utiču na antimikrobni potencijal ekstrakta *J. communis*, u poređenju sa jedinjenjima iz terpenoidne frakcije. U prilog tome ističu i činjenicu da etarsko ulje iglica kleke nije pokazalo značajnu antimikrobnu aktivnost, budući da je u svom sastavu sadržalo dominantno monoterpene (90 %). Interesantno je bilo i to da su MIK vrednosti izolovanih frakcija bile veće od vrednosti nefrakcionisanog ekstrakta. Ova činjenica ukazuje da antimikrobna aktivnost ekstrakta *J. communis* može biti posledica sinergističkog dejstva jedinjenja iz fenolne i terpenoidne frakcije. U svakom slučaju, sposobnost pojedinačnih jedinjenja da interaguju sa ćelijskom membranom bakterije *S. aureus* i da izazovu njeno oštećenje predstavlja jedan od mogućih načina antibakterijske aktivnosti ekstrakta.

Važno je istaći da je u našoj studiji detektovan sinergistički efekat Jc-EU-P/PDO u kombinaciji sa odabranim konvencionalnim antimikrobnim agensima prema *L. monocytogenes* (Nikolić i sar., 2019). Naime, pokazano je da su MIK vrednosti antibiotika višestruko smanjene u kombinacijama sa etarskim uljem, i to: četiri puta u slučaju str i osam puta u slučaju amp. Još bolji rezultat je postignut u slučaju PDO, kada su MIK vrednosti antibiotika (str/amp/azm) u kombinaciji smanjene čak 32 puta. Generalno, upotreba prirodnih jedinjenja kao pomoćnih lekovitih sredstava u borbi protiv raznih infekcija mogla bi da poveća efikasnost konvencionalnih lekova i dodatno smanji njihove terapijske doze, uz eliminaciju brojnih nuspojava (Cunha, 2001; Milenković i sar., 2018).

Na osnovu rezultata MIK testa, za dalja istraživanja odabrana je *L. monocytogenes*, kao najosetljivija na delovanje Jc-EU-P, a naročito na PDO. U daljem istraživanju učinilo se zanimljivim ispitati potencijal derivata kleke da inhibiraju adheziju *L. monocytogenes* na ćelije kolona u kulturi (linije HT-29 i HCT116). Činjenica da HT-29 i HCT 116 ćelije poseduju osobinu da vrše sekreciju mucina, koji ima važnu ulogu u modulaciji adhezije mikroorganizama na površinu ćelije, ukazuje da one predstavljaju dobar model za ispitivanje procesa adhezije (Mo i sar., 2016).

Brojne studije ističu dobar anti-adhezivni potencijal različitih biljnih ekstrakata i etarskih ulja prema različitim bakterijama (Bensch i sar., 201; Beydokthi i sar., 2017; Miladi i sar., 2016), međutim, od interesa za naša istraživanja su bili podaci o potencijalu biljnih derivata da inhibiraju adheziju *L. monocytogenes*. Potencijal ulja *Thymus capitatus*, timola i karvakrola da spreče kolonizaciju ove bakterije, ali i *E.coli*, na ćelije gastrointestinalnog trakta, pokazan je u studiji Džamić i sar. (2015). Pomenute test supstance značajno su inhibirale proces adhezije *L. monocytogenes* i *E.coli* na ćelije kolona HT-29, pri čemu je inhibicija adhezije iznosila oko 50 % za sve test supstance u slučaju *L. monocytogenes*.

Poznato je da adhezija patogenih bakterija na površinu crevne mukoze predstavlja prvi korak u razvoju intestinalnih infekcija. Adhezija može biti otežana prisustvom bakterija koje čine normalnu crevnu floru, na taj način što one blokiraju receptore za specifične proteine – adhezine, koje proizvode patogene bakterije (Kline i sar., 2009). Ko-agregacija ili interakcija sa patogenom jedan je od pretpostavljenih mehanizama kojim neki sojevi BMK inhibiraju adheziju *L. monocytogenes* na HT-29 ćelije (Garriga i sar., 2015). Zahvaljujući različitim faktorima virulencije, *L. monocytogenes* ima sposobnost efikasne adhezije i invazije u ćelije domaćina, mogućnost preživljavanja u ćelijama makrofaga i brzog širenja sa mesta infekcije (Vázquez-Boland i sar., 2001).

L. monocytogenes karakterišu brojni faktori virulencije kao što su internalini, hemolizin (listeriozin O), ActA protein, fosfolipaze, metaloproteinaze, adhezivni proteini i drugi. Bakterijski proteini: Lap, Ami, FbpA, DltA, LapB, InlJ, ActA, InlF i RecA, odgovorni su za proces adhezije listerije na ćelije domaćina. Internalin A (IntA) i internalin B (IntB) su ključni proteini odgovorni za intracelularnu invaziju. Oni se vezuju za receptore na membrani domaćina i to: IntA se vezuje za E-kadherin a IntB za c-Met, i na taj način omogućavaju invaziju patogena u ćelije domaćina. Pored IntA i IntB, postoje i drugi proteini poput p60, koji su uključeni u proces invazije. Act A protein omogućava kretanje bakterije kroz citoplazmu domaćina, dok su proteini listeriolizin O (LLO) i fosfolipaze (PlcA i PlcB) odgovorni za destrukciju ćelijske membrane fagozoma (Dhama i sar., 2015; Osanai i sar., 2013; Vázquez-Boland i sar., 2001). Uloga nekih od navedenih proteina u procesu adhezije i invazije pokazana je u različitim istraživanjima, na različitim modelima sisarskih ćelija. Konkretno, uloga IntA i IntB u invaziji *L. monocytogenes* pokazana je na modelu enterocita (Pentecost i sar., 2010). Uloga proteina p60 u invaziji na ćelije kolona (Caco-2) potvrđena je u istraživanjima Park i sar. (2000), dok su studije Milohanic i sar. (2000, 2001) ukazale na značaj Ami proteina u procesu adhezije, budući da je soj *L. monocytogenes* mutiran za ovaj protein imao smanjenu adheziju na različite sisarske ćelije. Kao najznačajniji, LLO protein stvara pore na ćelijskoj membrani i predstavlja glavnog uzročnika ćelijske smrti domaćina (Hashino i sar., 2015). Ista grupa autora sugeriše da ovaj enzim utiče na aktivnost MARK signalnog puta u inficiranim ćelijama trofoblata i na taj način uzrokuje abortus kod miševa. Pokazana je važna uloga LAP proteina u adheziji *L. monocytogenes* na različite intestinalne ćelije poreklom iz donjeg dela tankog creva i gornjeg dela debelog creva čoveka, kao i njegov značaj u širenju infekcije intestinalnog trakta (Jaradat i sar., 2003). Pregledom literature nađeno je da prirodne supstance svoj anti-adhezivni potencijal ostvaruju mehanizmima koji direktno utiču na smanjenje virulentnosti *L. monocytogenes*. Naime, pokazano je da prirodne supstance sprečavaju adheziju *L. monocytogenes* tako što vrše inhibiciju efluks pumpi, narušavaju integritet ćelijske membrane i utiču na različite QS signalne puteve (eng. *quorum sensing*, Upadhyay i sar., 2012; Vazquez-Armenta., 2018; Zhang i sar., 2020). Pokazano je da kvercetin oštećuje ćelijsku membranu *L. monocytogenes* i smanjuje ekspresiju gena odgovornih za virulenciju *actA*, *inlA*, *inlC*, kao i gena *sigB*, koji se aktivira u uslovima stresa kako bi bakterijama omogućio preživljavanje (eng. *stress response factor*), što najverovatnije utiče na smanjenje adhezije i proces formiranja biofilma (Vazquez-Armenta i sar., 2020).

Prema našem saznanju, do istraživanja naše grupe (Nikolić i sar., 2019) u dostupnoj literaturi nema podataka o efektu derivata *J. communis* na adheziju *L. monocytogenes*. Pored toga što je ovo prvi izveštaj o anti-adhezivnom potencijalu PDO, činjenica da on snažno inhibira adheziju *L. monocytogenes* na ćelije kolona posebno je značajna, kako zbog toga što se kleka već koristi u tradicionalnoj medicini u lečenju poremećaja gastrointestinalnog trakta (Taviano i sar., 2013), tako i zbog činjenice da je upravo digestivni sistem primarno mesto inicijalne infekcije ovom bakterijom. Slični rezultati dobijeni su i za neke druge kontaminante hrane; tako je pokazano da etarsko ulje i ekstrakt, dobijeni iz šišarki *J. communis*, efikasno inhibiraju adheziju *Campylobacter jejuni* na polistiren (Klančnik i sar., 2018). Takođe, još bolja anti-adhezivna aktivnost kleke na *C. jejuni* (99,3 %) pokazana je kada se ova bakterija nalazila u mešovitoj kulturi sa *L. monocytogenes*. Klančnik i sar. (2018) ističu značaj svojih rezultata sa aspekta buduće potencijalne primene derivata kleke u prevenciji mikrobiološke kontaminacije hrane. Budući da je pokazano da ulje *J. communis*

oštećuje ćelijsku membranu bakterija (Meng i sar., 2016b), značajan je podatak da mehanizam kojim ono redukuje adheziju *C. jejuni* podrazumeva inhibiciju CmeGH membranskog proteina, jednog od glavnih proteina transportera (Klančnik i sar., 2020). Takođe, druga grupa autora je pokazala da etarsko ulje *J. communis* utiče na procese koji su regulisani QS sistemom, smanjuje pokretljivost *C. jejuni* i inhibira proces adhezije i invazije na abiotičke i biotičke površine (Šimunović i sar., 2020). Kod sojeva *Mycobacterium avium* i *M. intracellulare*, etarsko ulje *J. communis* značajno je redukovalo adheziju na HeLa ćelije i površinu polistirena (Peruč i sar., 2019). Međutim, ne treba zanemariti ranije već istaknutu činjenicu da je PDO stimulisao adheziju *C. albicans*, te da je efekat test supstanci Jc-EU-P i PDO očigledno bio *species*-specifičan. Za razjašnavanje mehanizama koji leže u osnovi ovih događaja neophodne su dodatne analize.

Kako bi potencijalno novi antimikrobni agensi mogli naći primenu i u konzervaciji hrane, dalja istraživanja su usmerena na *in situ* analizu antimikrobnog potencijala u prehrambenim proizvodima, u ovom slučaju mesa. Kontaminacija hrane predstavlja veliki problem za javno zdravlje; smatra se da se bolja kontrola patogena može postići upotrebom prirodnih konzervanasa (Oussalah i sar., 2007). Veoma popularnoj upotrebi etarskih ulja u hrani, kao prirodnih aditiva, doprinela su dugogodišnja istraživanja pre svega njihovog antimikrobnog i antioksidativnog potencijala, istraživanja bezbednosti njihove upotrebe, kao i saznanja o mehanizmima njihovog delovanja. Imajući u vidu da su *J. communis* i *S. montana* poznate začinske biljke koje se koriste u pojedinim začinskim mešavinama za jela od mesa, učinilo se zanimljivim da ispitamo antimikrobni potencijal ovih ulja, kao i njihov kombinovani efekat. Budući da je u dosadašnjem radu etarsko ulje *J. communis* pokazalo najbolji efekat na *L. monocytogenes*, te da se ova bakterija zbog izrazite rezistencije prema različitim stresornim faktorima smatra jednim od najznačajnijih patogena hrane (Wright i sar., 2016), od važnosti je bilo ispitati efekat pomenutih ulja na rast ove bakterije u različitim uslovima. Najpre je izvršena preliminarna analiza aktivnosti u *in vitro* uslovima (u hranljivom medijumu), a zatim u *in situ* uslovima, u mariniranom junećem mesu kao modelu hrane (Vasilijević i sar., 2019).

Antibakterijski efekat ulja u *in vitro* uslovima ispitan je primenom mikrodilucionih testova (MIK i *Checherboard* test), dok je dinamika inhibicije rasta test supstancama u *in vitro* i *in situ* uslovima ispitana primenom *Time kill* eseja. Kako bi se dobila što opsežnija slika antilisterijalnog potencijala u istraživanje su, pored referentnog ATCC 19111 soja, uvedeni i izolati *L. monocytogenes* iz hrane/objekta za njenu preradu LMB, LMS i LMT. U okviru ovog dela istraživanja preliminarnim eksperimentima smo ukazali na antimikrobni potencijal Jc-EU-K i Sm-EU prema *L. monocytogenes* i to prema svim sojevima (Vasilijević i sar., 2019). Dobijeni rezultati za ulje Jc-EU-K bili su saglasni sa uočenom aktivnošću Jc-EU-P, s tim da je ostvarena nešto slabija aktivnost (Nikolić i sar., 2019). Pored toga, rezultati za oba ulja, i kleke i čubra, bili su u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja njihovog antimikrobnog, a naročito antilisterijalnog potencijala (Djenane i sar., 2011; Mazzarrino i sar., 2015). Imajući u vidu da je dobar antilisterijalni potencijal ulja *S. montana* u hrani prethodno dokumentovan (Djenane i sar., 2011), te da su aktivnosti ulja Sm-EU i Jc-EU-K u ovom istraživanju bile uporedive, možemo konstatovati da se dalje istraživanje etarskog ulja *J. communis* u *in situ* uslovima u hrani preporučuje.

In vitro analiza antilisterijalnog efekta oba ulja u kombinaciji, urađena na osnovu rezultata *Checkerboard* testa, ukazala je na sinergizam ($FIC_i = 0,266 - 0,375$) u slučaju izolata, dok su uglavnom indiferentni i aditivni efekti ($FIC_i = 0,75$) postignuti kod referentnog soja ATCC 19111 (Vasilijević i sar., 2019). Slični rezultati, dobijeni sa drugim etarskim uljima, mogu se naći i u literaturi: kombinacija ulja *Origanum vulgare* i *Rosmarinus officinalis* ostvarila je sinergistički efekat prema *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* i *Aeromonas hydrophilla* ($FIC_i = 0,5$), što je pokazano u studiji De Azeredo i sar. (2011). Takođe, različite kombinacije ulja origana i timijana, origana sa mažuranom i timijana sa žalfijom ostvarile su sinergizam prema *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* i *L. monocytogenes* (Gutierrez i sar., 2008).

Dok je u ranijem tekstu antibakterijski efekat etarskog ulja kleke opsežno diskutovan, što se tiče Sm-EU, njegova aktivnost je očigledno povezana sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja, naročito karvakrola i timola (Bakkali i sar., 2008). Međutim, ni doprinos manje zastupljenih

komponenti ulja, kao ni interakcije između pojedinačnih komponenti ne treba isključiti (Burt, 2004). Na primer, zabeležen je sinergizam između karvakrola i njegovog prekursora *p*-cimena. Izgleda da *p*-cimen, za koga je pokazano da ima slab antimikrobni potencijal, tek u prisustvu karvakrola izaziva značajno oštećenje ćelijske membrane i na taj način omogućava lakši transport karvakrola u ćeliju (Ultee i sar., 2002). Neke studije potvrđuju da etarska ulja imaju bolju antimikrobnost u poređenju sa antimikrobnim potencijalom dominantnih komponenti u smeši, što ukazuje na značaj manje zastupljenih komponenti i sinergističke interakcije koje ostvaruju (Becerril i sar., 2007; Hyldgaard i sar., 2012; Tajkarimi i sar., 2010). Suprotno ovome, postoje i dokazi da komponente u tragovima mogu da deluju antagonistički, smanjujući antimikrobni efekat dominantnih komponenti (Tserennadmid i sar., 2011). Naime, karvakrol, dominantna komponenta ulja origana, bio je 1500 puta efikasniji u poređenju sa uljem origana u studiji Rao i sar. (2010). Takođe, α -pinen i limonen, dominantne komponente ulja *J. communis* i *Citrus lemon*, delovale su sinergistički, dok je kombinacija pomenutih ulja rezultovala indiferentnim efektom prema izolatima kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Međutim, detaljno poznavanje mehanizama delovanja moglo bi da rasvetli zašto kombinacije etarskih ulja sa jakim individualnim antimikrobnim potencijalom ne pokazuju sinergizam u međusobnim kombinacijama, dok kombinacije dva ulja sa pojedinačno umerenim potencijalom, kao što je to bio slučaj i u ovoj studiji, rezultuju pojačanim efektom u kombinaciji (Gutierrez i sar., 2008). Dodatno, kombinacija timola i karvakrola može poboljšati antimikrobnost ulja prema različitim patogenima uključujući *L. monocytogenes* (Bassolé i Juliani., 2012; Lambert i sar., 2001). Nazer i sar. (2005) tvrde da timol u kombinaciji sa drugim aromatičnim jedinjenjima bolje inhibira rast *S. Typhimurium*, ali jasan sinergistički efekat između komponenti nije pokazan. Generalno, zbog činjenice da su sva etarska ulja terpenskog sastava, neki autori smatraju da je efekat njihovih kombinacija češće aditivan nego sinergistički. S druge strane, kombinacije ulja sa jedinjenjima drugačijeg hemijskog sastava (neterpenskog) mogu značajno poboljšati njihovu efikasnost (Gutierrez i sar., 2008).

Budući da je krajnji cilj ovog dela istraživanja bilo ispitivanje antilisterijalnog efekta Jc-EU-K i Sm-EU na junećem mesu *in situ*, za dalja istraživanja odabrana su dva soja *L. monocytogenes*, referentni soj i izolat sa trupa govečeta. Ovaj soj je bio najpribližniji modelu junećeg mesa, a ujedno bio je i najrezistentniji od svih testiranih izolata. Inače, sojevi *L. monocytogenes* pokazuju razlike u virulenciji i epidemiološkom potencijalu, a jedan od najčešćih serotipova koji se povezuje sa kliničkim slučajevima listerioze kod ljudi jeste serotip 1/2a (Wang i sar., 2017), kojem pripadaju i naši odabrani sojevi.

U daljem toku istraživanja praćena je dinamika preživljavanja bakterija u prisustvu različitih koncentracija Jc-EU-K i Sm-EU, dodatih pojedinačno ili u kombinacijama, primenom *Time kill* testa (Vasilijević i sar., 2019). Osim toga što su rezultati ovog testa potvrdili rezultate dobijene metodom šahovske table (aditivni efekat u slučaju referentnog soja ATCC 19111 i sinergizam u slučaju LMB izolata), neočekivano je detektovana veća osetljivost sojeva u ovom testu nego u mikrodilucionoj *Checkerboard* metodi. Naime, inhibicija rasta u *Time kill* eseju postignuta je sa koncentracijama/kombinacijama koje su u mikrodilucionom testu bile sub-inhibitorne. U prilog ovom zapažanju jesu i različite MIK vrednosti, dobijene primenom ovih metoda. Naime, cMIK vrednosti dobijene u *Time kill* testu bile su značajno manje od MIK vrednosti dobijenih u mikrodilucionoj metodi, što je posebno bilo izraženo u slučaju Sm-EU. Veća osetljivost sojeva u *Time kill* testu je najverovatnije posledica različitih eksperimentalnih uslova; naime, u mikrodilucionim testovima vladali su hipoksični uslovi, za razliku od dobro aerisanih uslova u *Time-kill* testu. Dostupnost kiseonika je sigurno uzrokovala različitu metaboličku aktivnost bakterija, što se odrazilo i na njihovu osetljivost. U prilog ovoj hipotezi su podaci iz literature koji ukazuju na različitu osetljivost bakterija, uključujući i *L. monocytogenes* na prisustvo antimikrobnih agenasa u aerobnim i anaerobnim uslovima (DeMars i sar., 2016; Neanover, 2020).

Konačno, kada je izvršena analiza antimikrobnog potencijala etarskih ulja kleke i čubra *in vitro*, pristupilo se analizi njihovog efekta *in situ*. Ispitan je uticaj Jc-EU-K i Sm-EU, pojedinačno i u kombinaciji, na mikrobiološki status svežeg junećeg mesa, mariniranog na specifičan način koji je

karakterističan za pripremu crvenih mesa. Naime, marinada je pripremana od crvenog vina, uz dodatak uobičajenih začina, tj. kuhinjske soli, bibera i belog luka u prahu (Vasiljević i sar., 2019). Sličan sastav imale su i vinske marinade korišćene od strane Kargiotou i sar. (2011).

Pored brojnih bioloških aktivnosti koje etarska ulja imaju, treba imati u vidu da je njihova primena u hrani donekle ograničena. U zavisnosti od vrste biljke iz koje je ulje izolovano, njegovog hemijskog sastava i načina na koji se dodaju u neku namirnicu, ona mogu imati različit uticaj na organoleptičke osobine hrane (Hyldgaard i sar., 2012). I dok neki autori ističu pozitivan efekat ulja na senzorička svojstva, drugi pokazuju da je njihov uticaj na miris i ukus namirnica limitirajući faktor za njihovu upotrebu. Upravo zbog toga, bilo je neophodno najpre utvrditi maksimalne organoleptički prihvatljive koncentracije etarskih ulja Jc-EU-K i Sm-EU i njihovih kombinacija. Interesantan nalaz u ovom delu istraživanja je osobina etarskog ulja kleke da poveća senzornu prihvatljivost ulja čubra, koje je u istim koncentracijama bilo senzorno neprihvatljivo kada je primenjeno pojedinačno, ali prihvatljivo kada je primenjeno u kombinaciji. U literaturi su zabeleženi nešto drugačiji rezultati, koji sugerišu prihvatljivost mirisa i ukusa ulja *S. montana* u mlevenom junećem mesu (Djenane i sar., 2011) i ulja *Satureja horvatii* u svinjskom mesu (Bukvički i sar., 2014). Generalno, razlike u prihvatljivosti uzoraka nastaju kao posledica različitog hemijskog sastava ulja i koncentracija u kojima se ona dodaju. Na primer, intenzivni miris koji smo mi u našoj studiji uočili, verovatno potiče pre svega od prisustva karvakrola i timola, što potvrđuje hemijska analiza Sm-EU. Pokazano je da niži stepen oksidacije etarskog ulja utiče na prijatan miris i veću prihvatljivost mesa sa njegovim dodatkom (Tajkarimi i sar., 2010), što može objasniti veću prihvatljivost ulja kleke (manji udeo oksidovanih terpenoida) od ulja čubra (veći udeo oksidovanih terpenoida).

Jedan od načina na koji se može smanjiti koncentracija etarskih ulja u hrani, bez uticaja na antimikrobni potencijal, jeste njihova kombinovana primena, što je upravo strategija korišćena u ovom istraživanju. Naime, dodavanje sinergističkih kombinacija ulja u nižim koncentracijama, što omogućava smanjivanje negativnih efekata koje oni imaju na senzorne osobine (Hayouni i sar., 2008; Lv i sar., 2011), može uticati na mikrobiološki kvalitet mesa. Najbolji način da se smanji efekat ulja na senzorne osobine namirnica je nanoenkapsulacija ili aplikacija kroz specifične sisteme za pakovanje (Chen i sar., 2012). Takođe, u kombinaciji sa drugim metodama konzerviranja, uključujući i mariniranje, moguće je smanjiti negativan uticaj etarskih ulja, pre svega na miris i ukus mesa (Ultee i sar., 2002; Van Haute i sar., 2016). Upravo zbog toga u ovom istraživanju etarska ulja su dodavana u vinsku marinadu; ovakva strategija trebalo je da poveća antimikrobnu aktivnost, ali i da poboljša organoleptička svojstva uzoraka.

Kako bi se ispitao antimikrobni potencijal ulja, meso je bilo veštački inokulisano sa *L. monocytogenes*. Paralelno je praćen efekat ulja na mikrofloru koja je normalno zastupljena u mesu; određivan je ukupan broj AHMB, ENT i BMK (Vasiljević i sar., 2019), budući da sve pomenute grupe utiču na kvalitet sirovog mesa. Od ukupnog broja bakterija na svežem mesu, najveći udeo imaju mezofilne i psihrotolerantne bakterije (Motarjemi i sar., 2013). Broj mezofilnih bakterija jedan je od kriterijuma higijene u procesu proizvodnje i pokazatelj mikrobiološke kontaminacije i/ili početka kvarenja svežeg mesa (Ercolini i sar., 2006). Imajući u vidu da veliki broj patogenih bakterija pripada familiji Enterobacteriaceae, njihovo prisustvo u mesu i proizvodima od mesa je značajno sa bezbednosnog i higijenskog aspekta (El-Gendy i sar., 2014; Ercolini i sar., 2006). Bez obzira na to što su prisutne u manjem broju nego npr. BMK, sposobnost da metabolišu amino kiseline do isparljivih jedinjenja neprijatnog mirisa, svrstava ih u grupu značajnih kontaminanata hrane (Baylis, 2006). Sa druge strane, iako se BMK koriste za dobijanje željenog ukusa i u prezervaciji mesnih prerađevina, njihovo prisustvo u sirovom mesu nije poželjno (Kröckel i sar., 2013). Kvarljivosti mesa doprinose i osobine BMK koje im omogućavaju rast u uslovima sredine koji su nepovoljni za rast drugih bakterija (odsustvo kiseonika, prisustvo visokih koncentracija soli i nitrita i niske pH vrednosti). Pored toga, ove bakterije su i dobri kompetitori, a u uslovima modifikovane atmosfere ili na niskim temperaturama, kada je rast aerobnih bakterija inhibiran, BMK postaju dominantna populacija u mesu (Doulgeraki i sar., 2012).

Rast *L. monocytogenes*, kao i svih pomenutih grupa (AHMB, ENT i BMK) praćen je tokom dugog perioda skladištenja uzoraka mesa (15 dana) na 4 °C, koje je usledilo nakon mariniranja. Naravno, treba imati u vidu da mikrobiološki profil i inicijalni broj bakterija na početku utiču na održivost mesa tokom skladištenja (Blixt i Borch, 2002). Zato treba naglasiti da je analizom uzorka pre inokulacije pokazana njegova ispravnost, pri čemu su svi mikrobiološki kritrijumi propisani Pravilnikom o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl.glasnik RS 72/2010) bili zadovoljeni.

Dinamika inhibicije rasta *L. monocytogenes*, kao i ostalih grupa bakterija, imala je sličan trend tokom čitavog perioda skladištenja u frižideru. Naime, treba naglasiti da se broj bakterija, u svim uzorcima značajno smanjio tokom 24 h mariniranja (izrazit baktericidni efekat), a zatim je tokom petnaestodnevnog skladištenja na 4 °C veoma sporo rastao, ili se čak održavao na konstantnom nivou (pretežno bakteriostatički efekat). Ovaj trend je bio vidljiv u slučaju svih primenjenih marinada: veliki pad brojnosti bakterija, u odnosu na rastvor čiste kuhinjske soli – negativne kontrole, uočen je u slučaju osnovne vinske marinade VM, a primena pojedinačnih etarskih ulja kleke ili čubra, odnosno njihove kombinacije, dodatno je smanjivala broj bakterija (Vasilijević i sar., 2019). Činjenica da se brojnost bakterija održavala tokom veoma dugog perioda bila je pokazatelj da je meso bilo dobro konzervisano.

Antibakterijski efekat osnovne VM pripisuje se aktivnim komponentama crvenog vina, kao i korišćenim začinima. Relativno visok sadržaj etanola, organskih kiselina, kao i polifenola, utiče na inhibični potencijal različitih vina (Just i Daeschel, 2003; Vaquero i sar., 2007). Na primer, vinska marinada je bila efikasna prema kontaminantima junećeg mesa, uključujući *Pseudomonas* i BMK (Kargiotou i sar., 2011; Fernandes i sar., 2007) daju dokaze o antimikrobnom potencijalu različitih vina prema *L. innocua* i to u uslovima koji imitiraju realne u gastrointestinalnom traktu. Dodatno, aktivni sastojci belog luka i bibera, poput alicina (Fujisawa i sar., 2009; Hyldgaard i sar., 2012) i piperina (Zarai i sar., 2013), takođe doprinose ukupnom antimikrobnom potencijalu marinada. Ova studija ističe efekat marinada sa dodatkom etarskog ulja kleke ili čubra prema svim ispitivanim kontaminantima junećeg mesa, u poređenju sa osnovnom VM. Ovi rezultati su bili slični rezultatima prethodnih izveštaja (Kargiotou i sar., 2011; Rhoades i sar., 2013), s tim da je u vinske marinade tada bilo dodato ulje origana. Dok su podaci antibakterijskog potencijala etarskog ulja čubra, u svežem mesu i proizvodima od mesa, dostupni u literaturi (De Oliveira i sar., 2011; Djenane i sar., 2011), podaci o efikasnosti etarskog ulja kleke, u mesu ili bilo kom drugom prehrambenom proizvodu, gotovo da nisu poznati. Jedino studija Selim (2011) izveštava da je ulje kleke, pri najvećoj primenjenoj koncentraciji od 1 %, redukovalo broj vankomicin-rezistentnih enterokoka u mlevenom junećem mesu i to za oko 2 log CFU, pri kraju četrnaestodnevnog inkubacionog perioda.

Budući da su marinade sa dodatkom pojedinačnih ulja ostvarile značajan antibakterijski efekat, očekivano je bilo da će efekat njihove kombinacije biti najjači, međutim, osim u slučaju referentnog soja *L. monocytogenes* i AHMB, jasan sinergizam ovih ulja nije uočen. To se možda može objasniti činjenicom da struktura kao i nutrijenti iz hrane, u većoj meri deluju na antimikrobne agense i smanjuju njihovu aktivnost. To se pre svega pripisuje visokom procentu masti i/ili proteina u namirnicama, što štiti bakterije od delovanja etarskih ulja (Gutierrez i sar., 2008; Paparella i sar., 2016; Tajkarimi i sar., 2010). Ova činjenica ističe značaj *in situ* ispitivanja antimikrobnog potencijala. U skladu sa tim su i istraživanja koja pokazuju da etarska ulja u hrani imaju smanjenu antimikrobnu aktivnost, u poređenju sa onom koju su ostvarili u *in vitro* uslovima, odnosno u hranljivom medijumu (De Oliveira i sar., 2013; Hayouni i sar., 2008). Kako bi postigli antibakterijski efekat i u hrani, potrebno je primeniti nekoliko puta veću koncentraciju ulja, od one primenjene u *in vitro* uslovima (Selim, 2011). Na primer, neka istraživanja pokazuju da je potrebna dvostruko veća (Moreira i sar., 2007), ili čak deset puta veća koncentracija ulja (De Oliveira i sar., 2013). Međutim, postoje i studije koje potpuno negiraju postojanje antimikrobnog potencijala etarskih ulja u hrani. Tako studija Carraminana i sar. (2008) izveštava da etarsko ulje *Rosmarinus officinalis* nije bilo efikasno prema *L. monocytogenes* inokulisanoj na mleveno svinjsko meso. Slično, studija Firouzi i sar. (2007) izveštava da je postignut zanemarljiv antimikrobni efekat ulja

origana u piletini sa roštilja, inokulisanoj *Yersinia enterocolitica* ili *L. monocytogenes*. Razlog ovome može biti interakcija samih ulja, ali i bakterija, sa komponentama iz hrane. Objašnjenje ove pojave verovatno leži u činjenici da se etarska ulja, zbog svoje hidrofobnosti, rastvaraju u lipidnoj frakciji, čime se njihova efikasna koncentracija smanjuje, a samim tim se smanjuje i njihova antimikrobna aktivnost (Burt, 2004; Hayouni i sar., 2008). Sa druge strane, masti iz hrane formiraju zaštitni sloj oko bakterijske ćelije i na taj način je štite od delovanja antimikrobnih agenasa (Cutter, 2000).

Međutim, i pored gore pomenutih činjenica, rezultati našeg istraživanja na modelu junećeg mesa pokazuju da se rast *L. monocytogenes* i ostalih praćenih grupa može kontrolisati dodavanjem odgovarajućih koncentracija etarskih ulja. Imajući u vidu da na antimikrobni potencijal ulja utiču pH vrednost sredine, temperatura i nivo mikrobiološke kontaminacije (Hyldgaard i sar., 2012), smatramo da su ovi parametri svakako uticali na dobijene rezultate. Kako je najizraženiji efekat marinada ostvaren u slučaju dodatka oba ulja, moguća je interakcija njihovih aktivnih jedinjenja, kao i interakcija sa aktivnim komponentama vina i začina. Međutim, neophodne su dalje analize kako bi se mehanizmi uočenog antibakterijskog delovanja detaljnije rasvetlili, što bi pružilo brojne mogućnosti za pronalaženje moćnih antimikrobnih kombinacija koje mogu biti ključne u konzerviranju hrane, bez istovremenog negativnog organoleptičkog dejstva (Lv i sar., 2011).

Na kraju, ukoliko se osvrnemo na celokupni rad prikazan u ovoj doktorskoj disertaciji, možemo konstatovati da citotoksični i antimikrobni potencijal prirodnih proizvoda *J. communis*, etarskog ulja i postdestilacionog ostatka, pružaju mogućnost njihovog kombinovanja sa konvencionalnim medikamentima – hemioterapeuticima, antibioticima i antifungalnim agensima, ali i drugim prirodnim proizvodima, u cilju postizanja što snažnijeg efekta. Zahvaljujući tome, može se preporučiti njihovo dalje istraživanje u cilju potencijalne primene u formi dopunskih agenasa konvencionalnim terapijama malignih i infektivnih oboljenja. Uz to, etarsko ulje kleke je pokazalo dobru antimikrobnu aktivnost u matriksu hrane, što ukazuje na potencijal primene u formi prirodnog konzervansa.

ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima i dobijenim rezultatima, izvedeni su sledeći zaključci:

1. GC-MS analiza etarskog ulja *Juniperus communis* var. *saxatilis*, proizvedenog iz ženskih šišarki, pokazala je isključivo prisustvo terpenkih ugljovodonika i to monoterpena (40,7 %) i seskviterpena (59,3 %). Dominantni monoterpen bio je α -pinen (23,61 %), a seskviterpen δ -kadinen (10,71 %).
2. GC-FID analiza komercijalno nabavljenog etarskog ulja *Juniperus communis* ukazala je na dominantan sadržaj monoterpenkih ugljovodonika (82,89 %), a među njima najzastupljeniji je bio α -pinen (47,8 %). Seskviterpeni su bili prisutni u značajno manjem procentu (4,23 %). Za razliku od proizvedenog ulja kleke, ovo je sadržalo i oksidovane derivate – monoterpenoide (9,51 %) i seskviterpenoide (3,26 %).
3. GC-FID analiza etarskog ulja *Satureja montana* pokazala je visok sadržaj oksidovanih monoterpena (61,2 %), sa dominantnim učešćem karvakrola (30,7 %) i timola (18,0 %). Slede monoterpenki ugljovodonici (29,1 %) i ugljovodonični i oksidovani seskviterpeni (ukupno 9,71 %).
4. Kvalitativna i kvantitativna analiza postdestilacionog ostatka, primenom LC-MS/MS, potvrdila je sadržaj 25 jedinjenja, od ukupno 45 analiziranih, što predstavlja 3,2 % ukupnog sastava. Među identifikovanim jedinjenjima najzastupljeniji su bili hinska kiselina (11,09 mg/g suvog ekstrakta) i flavonoid rutin (12,25 mg/g suvog ekstrakta). Ukupan sadržaj flavonoida iznosio je 19,1 mg ekvivalenata kvercetina/g suvog ekstrakta.
5. Antioksidativni potencijal oba derivata kleke je određen primenom DPPH i TBA testova, dok je postdestilacioni ostatak dodatno analiziran i FRAP testom. Poređenje rezultata dobijenih za oba derivata je pokazalo bolju antioksidativnu aktivnost postdestilacionog ostatka (IC_{50} vrednosti u DPPH i TBA testu si iznosile 4,40 μ g/mL i 569,14 μ g/mL). U prilog dobrom antioksidativnom potencijalu postdestilacionog ostatka su i rezultati FRAP testa, kojim je utvrđen dvostruko veći redukcionni kapacitet (78,77 mg ekvivalenata askorbinske kis/g suvog ekstrakta) od model antioksidanta BHT (32,77 mg ekvivalenata askorbinske kis/g suvog ekstrakta).
6. Etarsko ulje i postdestilacioni ostatak su indukovali citotoksičnost na ćelijskim linijama kolorektalnog adenokarcinoma (HT-29 i HCT116), adenokarcinoma pluća (A549) i normalnim fibroblastima (MRC-5), na dozno-zavisan način, pri čemu je etarsko ulje pokazalo značajno veću citotoksičnost od postdestilacionog ostatka. Najosetljivija je bila ćelijska linija A549, gde su IC_{50} vrednosti etarskog ulja i postdestilacionog ostatka iznosile 69,4 μ g/mL, odnosno 1,3 mg/mL. Analiza indeksa selektivnosti prema kancerskim ćelijama je ukazala samo na selektivnost postdestilacionog ostatka i to prema A549 i HT-29 ćelijama.
7. Etarsko ulje i postdestilacioni ostatak, primenjeni u dozama koje su za normalne ćelije bile netoksične, senzibilisali su A549 kancerske ćelije i povećali njihovu osetljivost prema doksorubicinu. Analizom tipa interakcije potvrđen je sinergistički efekat u svim ispitivanim kombinacijama, pri čemu je sinergizam bio izraženiji u kancerskim A549 (CI u intervalu 0,12 – 0,54), nego u normalnim MRC-5 ćelijama (CI u intervalu 0,30 – 0,84).
8. Citometrijska analiza pokazala je da postdestilacioni ostatak indukuje ranu i kasnu apoptozu A549 ćelija i dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa u G_2/M fazi, dok je alkalni komet test ukazao na njegovu genotoksičnost. Sa druge strane, etarsko ulje karakterišu zanemarljivi efekti na apoptozu i distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, kao i odsustvo genotoksičnosti.

9. Minimalne inhibitorne i baktericidne/fungicidne koncentracije, određene u mikrodilucionom testu, ukazale su na bolji antimikrobni efekat postdestilacionog ostatka u poređenju sa etarskim uljem. Najosetljivija bakterija bila je *Listeria monocytogenes*, gde su MIK vrednosti postdestilacionog ostatka i ulja iznosile 0,39 odnosno 3,30 mg/mL, dok su MBK vrednosti bile 0,74 odnosno 6,25 mg/mL. Najosetljivija mikromiceta je bila *Aspergillus versicolor* sa detektovanim MIK vrednostima 0,250 mg/mL za postdestilacioni ostatak i 11,8 mg/mL za etarsko ulje. MFK je detektovana samo za postdestilacioni ostatak i iznosila je 0,119 mg/mL. Analiza selektivne toksičnosti agenasa prema mikroorganizmima, izražena preko indeksa SI_M , pokazala je jasnu selektivnost postdestilacionog ostatka prema gotovo svim testiranim mikromicetama i prema *Listeria monocytogenes*.
10. Metoda šahovske table je ukazala na sinergistički antilisterijalni efekat ulja i postdestilacionog ostatka sa streptomycinom i ampicilinom, dok je postdestilacioni ostatak pokazao dodatnu sposobnost da sinergistički pojača i dejstvo azitromicina. Pokazan je i sinergizam postdestilacionog ostatka sa fungicidom bifonazolom u slučaju *Candida albicans*.
11. U testu adhezivnosti postdestilacioni ostatak je značajno inhibirao adheziju *L. monocytogenes* na ćelijske linije kancera kolona (62 % na HCT116 i 29 % na HT-29 ćelije), dok je efekat ulja bio zanemarljiv. Suprotno, u slučaju *C. albicans* uočen je visok potencijal ulja da inhibira proces adhezije na HT-29 ćelije (60 %).
12. Mikrodilucioni test, primenjen sa komercijalno nabavljenim etarskim uljima *J. communis* i *S. montana*, ukazao je na uporediv antilisterijalni efekat oba ulja prema referentnom soju i primoizolatima *L. monocytogenes*. Primenom metode šahovske table uočen je sinergizam binarnih kombinacija ulja na svim testiranim primoizolatima, koji je *Time kill* testom potvrđen u slučaju izolata sa trupa govečeta.
13. U *in situ* uslovima na junećem mesu, pokazan je snažan antibakterijski efekat vinskih marinada sa dodatkom etarskih ulja ili njihovih kombinacija, kako na predstavnike prisutne mikroflore mesa (aerobne heterotrofne mezofilne bakterije, Enterobacteriaceae i bakterije mlečne kiseline), tako i na inokulisanu *L. monocytogenes*. Sve vinske marinade su tokom procesa mariniranja indukovale baktericidni efekat, a tokom daljeg skladištenja na 4 °C njihov efekat je bio pretežno bakteriostatički. Brojnost bakterija se održavala na niskom nivou tokom veoma dugog perioda (15 dana) što je pokazatelj da je meso bilo dobro konzervisano.
14. Imajući u vidu sve dobijene rezultate, etarsko ulje i postdestilacioni ostatak *Juniperus communis* poseduju antimikrobni i citotoksični potencijal i mogu se preporučiti za dalje istraživanje u cilju upotrebe u formi dopuna konvencionalnim antikancerskim i antimikrobnim terapijama. Uz to, etarsko ulje *J. communis* se pokazalo dobrim izborom prirodno aditiva koji bi se mogao primeniti u konzervaciji hrane.

LITERATURA

7. LITERATURA

- Aboody, M. S. A., & Mickymaray, S. (2020). Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics*, 9, 45.
- Adams, R. P. (2009). *Identification of essential oil compounds by gas chromatography and mass spectrometry* (4th ed.). Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Adams, R.P., 2014. Junipers of the world: the genus *Juniperus*, fourth ed. Trafford Publishing, Waco, USA.
- Adonizio, A., Kong, K. F., Mathee, K. (2008). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 198-203.
- Akins, R. A. (2005). An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med. Mycol. J.*, 43, 285-318.
- Akkol, E. K., Güvenç, A., & Yesilada, E. (2009). A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *J. Ethnopharmacol.*, 125, 330-336.
- Ambrož, M., Hanušová, V., Skarka, A., Boušová, I., Králová, V., Langhasová, L., Skálová, L. (2016). Essential oil from *Myrica rubra* leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. *Planta Med.*, 82, 89-96.
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M. T., Coroneo, V., Dessì, S., & Cabras, P. (2003). Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3073-3078.
- Araruna, M. K., Brito, S. A., Morais-Braga, M. F., Santos, K. K., Souza, T. M., Leite, T. R., Costa, J. G., & Coutinho, H. D. (2012). Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. *Indian J. Med. Res.*, 135, 252.
- Aydın, E., Türkez, H., & Geyikoğlu, F. (2013). Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of α -pinene on N2a neuroblastoma cells. *Biologia*, 68, 1004-1009.
- Azevedo, M. I., Pereira, A. F., Nogueira, R. B., Rolim, F. E., Brito, G. A., Wong, D. V. T., Lima-Júnior, R. C., Ribeiro, R. A., & Vale, M. L. (2013). The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol. pain*, 9, 1744-8069.
- Babich, H., Schuck, A. G., Weisburg, J. H., & Zuckerbraun, H. L. (2011). Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *J. Toxicol.*, 2011.
- Badisa, R. B., Darling-Reed, S. F., Joseph, P., Cooperwood, J. S., Latinwo, L. M., & Goodman, C. B. (2009). Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res.*, 29, 2993-2996.
- Bais, S., Gill, N. S., Rana, N., & Shandil, S. (2014). A phytopharmacological review on a medicinal plant: *Juniperus communis*. *Int. Sch. Res. Notices*, 2014.
- Bais, S., Gill, N. S., & Kumar, N. (2015). Neuroprotective effect of *Juniperus communis* on chlorpromazine induced Parkinson disease in animal model. *Chin. J. Biol.*, 2015.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 446-475.
- Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.*, 78, 431-441.
- Banerjee, S. A., Mukherjee, A. N., & Chatterjee, T. K. (2012). Evaluation of analgesic activities of methanolic extract of medicinal plant *Juniperus communis* Linn. *Int. J. Pharm. Pharm.*, 4, 547-550.

- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, *17*, 3989-4006.
- Bayala, B., Bassole, I. H., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J. M. A., & Simpire, J. (2014). Anticancer activity of essential oils and their chemical components-a review. *Am. J. Cancer Res.*, *4*, 591-607.
- Baylis, C. L., (2006). Enterobacteriaceae. In: Blackburn, C.W. (Ed.). *Food Spoilage Microorganisms* (pp. 213–286). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goni, P., López, P., & Nerín, C. (2007). Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Anal. Bioanal. Chem.*, *388*, 1003-1011.
- Bennett, J. W., (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. In: Machida, M., & Gomi, K. (Eds.). *Molecular Biology and Genomics* (pp. 1–17). Portland : Caizer Academic Press.
- Bensch, K., Tiralongo, J., Schmidt, K., Matthias, A., Bone, K. M., Lehmann, R., & Tiralongo, E. (2011). Investigations into the antiadhesive activity of herbal extracts against *Campylobacter jejuni*. *Phytothet. Res.*, *25*, 1125-1132.
- Benzina, S., Harquail, J., Jean, S., Beauregard, A. P., D Colquhoun, C., Carroll, M., Bos, A., Gray, C. A., & A Robichaud, G. (2015). Deoxypodophyllotoxin isolated from *Juniperus communis* induces apoptosis in breast cancer cells. *Anticancer Agents Med. Chem.*, *15*, 79-88.
- Bernard, F. X., Sable, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J. F., Crouzet, J., & Blanche, F. (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.*, *41*, 992-998.
- Beydokthi, S. S., Sendker, J., Brandt, S., & Hensel, A. (2017). Traditionally used medicinal plants against uncomplicated urinary tract infections: Hexadecyl coumaric acid ester from the rhizomes of *Agropyron repens* (L.) P. Beauv. with antiadhesive activity against uropathogenic *E. coli*. *Fitoterapia*, *117*, 22-27.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, *10*, 499-503.
- Bintsis, T. (2018). Microbial pollution and food safety. *AIMS microbiology*, *4*, 377-396.
- Blair, J.M., & Webber, M.A., (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, *13*, 42-51.
- Blixt, Y., & Borch, E. (2002). Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. *Meat Sci.*, *60*, 371-378.
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., & Uriarte, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem.*, *12*, 887-916.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, *68*, 394-424.
- Budzyńska, A., Sadowska, B., Więckowska-Szakiel, M., & Różalska, B. (2014). Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oils. *Acta Biochim. Pol.*, *61*, 115-121.
- Bukvički, D., Stojković, D., Soković, M., Vannini, L., Montanari, C., Pejin, B., Savić, A., Veljić, M., Grujić, S., & Marin, P. D. (2014). *Satureja horvatii* essential oil: In vitro antimicrobial and antiradical properties and in situ control of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *Meat Sci.*, *96*, 1355-1360.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.*, *94*, 223-253.
- Butkiene, R., Budiene, J., & Judzentiene, A. (2015). Variation of secondary metabolites (essential oils) in various plant organs of *Juniperus communis* L. wild growing in Lithuania. *Balt. For.*, *21*, 59-64.
- Cabral, C., Francisco, V., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Sales, F., Batista, M. T., & Salgueiro, L. (2012). Essential oil of *Juniperus communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak needles: chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Phytother. Res.*, *26*, 1352-1357.
- Carpenter, C. D., O'Neill, T., Picot, N., Johnson, J. A., Robichaud, G. A., Webster, D., & Gray, C. A. (2012). Anti-mycobacterial natural products from the Canadian medicinal plant *Juniperus communis*. *J. Ethnopharmacol.*, *143*, 695-700.
- Carraminana, J. J., Rota, C., Burillo, J., & Herrera, A. (2008). Antibacterial efficiency of Spanish *Satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. *J. Food Prot.*, *71*, 502-508.
- Carrillo-Munoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A., & Quindós, G. (2006). Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter.*, *19*, 130-139.
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr. Med. Chem.*, *16*, 3267-3285.
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Goncalves, M. J., & Salgueiro, L. (2006). Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J. Appl. Microbiol.*, *100*, 1333-1338.
- Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Bonorino Figueiredo, M. S. R., Folador, P., Damazio, R. G., Pizzolatti, M. G., & Barreto Silva, F. R. M. (2008). Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev Med Chem.*, *8*, 1429-1440.
- Cechinel Filho, V., Meyre-Silva, C., & Niero, R. (2009). Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chem. Biodivers.*, *6*, 313-327.
- Chakrabarti, A. (2011). Drug resistance in fungi—an emerging problem. *Regional Health Forum*, *15*, 97-103).
- Chang, A. (2011). Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung cancer*, *71*, 3-10.
- Chen, W., Liu, Y., Li, M., Mao, J., Zhang, L., Huang, R., Jin, X., & Ye, L. (2015). Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *J. Pharmacol. Sci.*, *127*, 332-338.
- Chen, Y., Jungsuwadee, P., Vore, M., Butterfield, D. A., & St Clair, D. K. (2007). Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol. Interv.*, *7*, 147-156.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, *4*, 58.
- Connor, T. H., & McDiarmid, M. A. (2006). Preventing occupational exposures to antineoplastic drugs in health care settings. *CA Cancer J. Clin.*, *56*, 354-365.
- Cruz-González, T., Cortez-Torres, E., Perez-Severiano, F., Espinosa, B., Guevara, J., Perez-Benitez, A., Melendez, F., Díaz, A., & Ramírez, R. E. (2016). Antioxidative stress effect of epicatechin and catechin induced by A β 25–35 in rats and use of the electrostatic potential and the Fukui function as a tool to elucidate specific sites of interaction. *Neuropeptides*, *59*, 89-95.
- Cunha, B. A. (2001). Antibiotic side effects. *Med. Clin. North Am.*, *85*, 149-185.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, *38*, 99-107.

- Cutter, C. N. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *J. Food Prot.*, *63*, 601-607.
- Da, X., Nishiyama, Y., Tie, D., Hein, K. Z., Yamamoto, O., & Morita, E. (2019). Antifungal activity and mechanism of action of Ou-gon (*Scutellaria* root extract) components against pathogenic fungi. *Sci. Rep.*, *9*, 1-12.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.*, *23*, 174-181.
- Dahmane, D., Dob, T., & Chelghoum, C. (2015). Chemical composition of essential oils of *Juniperus communis* L. obtained by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. *J. Mater. Environ. Sci.*, *6*, 1253-1259.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*, 7313-7352.
- Damia, G., & D'Incalci, M. (1998). Mechanisms of resistance to alkylating agents. *Cytotechnology*, *27*, 165-173.
- De Azeredo, G. A., Stamford, T. L. M., Nunes, P. C., Neto, N. J. G., De Oliveira, M. E. G., & De Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Res. Int.*, *44*, 1541-1548.
- De Oliveira, P. F., Munari, C. C., Nicolella, H. D., Veneziani, R. C. S., & Tavares, D. C. (2016). Manool, a *Salvia officinalis* diterpene, induces selective cytotoxicity in cancer cells. *Cytotechnology*, *68*, 2139-2143.
- De Oliveira, T. L. C., de Araújo Soares, R., & Piccoli, R. H. (2013). A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. *Meat Sci.*, *93*, 645-651.
- De Oliveira, T. L. C., de Araújo Soares, R., Ramos, E. M., das Graças Cardoso, M., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *Int. J. Food Microbiol.*, *144*, 546-555.
- DeMars, Z., Biswas, S., Amachawadi, R. G., Renter, D. G., & Volkova, V. V. (2016). Antimicrobial susceptibility of enteric gram negative facultative anaerobe bacilli in aerobic versus anaerobic conditions. *PLoS One*, *11*, e 0155599.
- Demirgan, R., Karagöz, A., Pekmez, M., Önay-Uçar, E., Artun, F. T., Güreç, Ç., & Mat, A. (2016). In vitro anticancer activity and cytotoxicity of some papaver alkaloids on cancer and normal cell lines. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, *13*, 22-26.
- Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V. S., & Singh, R. K. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, *35*, 211-235.
- Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., & Roncalés, P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, *22*, 1046-1053.
- Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, *88*, 308-316.
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, *157*, 130-141.

- Dowling, A., O'Dwyer, J., & Adley, C. (2017). Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.). *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* (pp. 536-545). Badajoz: *Formatex Research Center*.
- Džamić, A. M., Nikolić, B. J., Giweli, A. A., Mitić-Ćulafić, D. S., Soković, M. D., Ristić, M. S., Knežević-Vukčević, J., & Marin, P. D. (2015). Libyan *Thymus capitatus* essential oil: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties. *J. Appl. Microbiol.*, *119*, 389-399.
- Džidić, S., Šušковиć, J., & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol. Biotechnol.*, *46*, 11-21.
- Ehsani, E., Akbari, K., Teimouri, M., & Khadem, A. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of two *Juniperus* species essential oils. *Afr. J. Microbiol. Res.*, *6*, 6704-6710.
- El-Gendy, N. M., Ibrahim, H. A., Al-Shabasy, N. A., & Samaha, I. A. (2014). Enterobacteriaceae in beef products (Luncheon, Pasterma, Frankfurter and Minced meat) from Alexandria retail outlets. *Alex. J. Vet. Sci.*, *41*, 80-86.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., İrfan Küfrevioğlu, Ö., & Aboul-Enein, H. Y. (2006). A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Anal. Lett.*, *39*, 47-65.
- El-Sawi, S. A., Motawae, H. M., & Ali, A. M. (2007). Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, *4*, 417-426.
- Engelhart, S., Loock, A., Skutlarek, D., Sagunski, H., Lommel, A., Färber, H., & Exner, M. (2002). Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*, 3886-3890.
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci.*, *99*, 7687-7692.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F. (2006). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, *72*, 4663-4671.
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, *4*, 90-101.
- Falcão, S., Bacém, I., Igrejas, G., Rodrigues, P. J., Vilas-Boas, M., & Amaral, J. S. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of hydrodistilled oil from *Juniper* berries. *Ind. Crops Prod.*, *124*, 878-884.
- Farjon, A. (2001). Cupressaceae. World checklist and bibliography of conifers, second ed. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Fedorova, N. D., Badger, J. H., Robson, G. D., Wortman, J. R., & Nierman, W. C. (2005). Comparative analysis of programmed cell death pathways in filamentous fungi. *BMC Genomics*, *6*, 177.
- Fejér, J., Gruľová, D., Eliašová, A., Kron, I., & De Feo, V. (2018). Influence of environmental factors on content and composition of essential oil from common juniper ripe berry cones (*Juniperus communis* L.). *Plant Biosyst.*, *152*, 1227-1235.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, *136*, E359-E386.
- Fernandes, J., Gomes, F., Couto, J. A., & Hogg, T. (2007). The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. *Food Control*, *18*, 1477-1483.

- Fernandez, A., & Cock, I. E. (2016). The therapeutic properties of *Juniperus communis* L.: antioxidant capacity, bacterial growth inhibition, anticancer activity and toxicity. *Pharmacogn. J.*, 8, 273-280.
- Fierascu, I., Ungureanu, C., Avramescu, S. M., Cimpeanu, C., Georgescu, M. I., Fierascu, R. C., Ortan, A., Sutan, A.N., Anuta, V., Zandirescu, A., & Dinu-Pirvu, C. E. (2018). Genoprotective, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory evaluation of hydroalcoholic extract of wild-growing *Juniperus communis* L.(Cupressaceae) native to Romanian southern sub-Carpathian hills. *BMC Complement Altern. Med.*, 18, 3.
- Filipowicz, N., Kamiński, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., & Ochocka, J. R. (2003). Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytother. Res.*, 17, 227-231.
- Firouzi, R., Shekarforoush, S. S., Nazer, A. H. K., Borumand, Z., & Jooyandeh, A. R. (2007). Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. *J. Food Prot.*, 70, 2626-2630.
- Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325, 1089-1093.
- Foerster, S., Unemo, M., Hathaway, L. J., Low, N., & Althaus, C. L. (2016). Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiol.*, 16, 216.
- Freiesleben, S., & Jäger, A. (2014). Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms—a review. *Med. Aro. Plants*, 3, 1-6.
- Freshney, R.I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, fifth ed. WileyLiss, Hoboken, USA.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., & Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.*, 49, 201-242.
- Fujisawa, H., Watanabe, K., Suma, K., Origuchi, K., Matsufuji, H., Seki, T., & Ariga, T. (2009). Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 1948-1955.
- Gao, H. W., Huang, X. F., Yang, T. P., Chang, K. F., Yeh, L. W., Hsieh, M. C., Weng, J. C., & Tsai, N. M. (2019). *Juniperus communis* Suppresses Melanoma Tumorigenesis by Inhibiting Tumor Growth and Inducing Apoptosis. *Am. J. Chin. Med.*, 47, 1171-1191.
- Gao, M., Wang, H., & Zhu, L. (2016). Quercetin assists fluconazole to inhibit biofilm formations of fluconazole-resistant *Candida albicans* in *in vitro* and *in vivo* antifungal managements of vulvovaginal candidiasis. *Cell. Physiol. Biochem.*, 40, 727-742.
- Garriga, M., Rubio, R., Aymerich, T., & Ruas-Madiedo, P. (2015). Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonise the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Benef. Microbes*, 6, 337-343.
- Garvey, M. I., Rahman, M. M., Gibbons, S., & Piddock, L. J. (2011). Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 145-151.
- Gautam, N., Mantha, A. K., & Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *Biomed Res. Int.*, 2014, DOI:10.1155/2014/154106
- Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin-new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerg. Infect. Dis.*, 23(5), 849-853.
- Georgieva, S., Hadjieva, P., Chaney, C., & Arpadjan, S. (2014). Comparison of composition and antimicrobial activity of hydrodistilled and ethanol extracted essential oil of *Juniperus communis* L. *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 67, 635-340.

- Giménez, A., Ares, F., & Ares, G. (2012). Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. *Food Res. Int.*, *49*, 311-325.
- Glišić, S. B., Milojević, S. Ž., Dimitrijević, S. I., Orlović, A. M., & Skala, D. U. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. *J. Serbian Chem. Soc.*, *72*(4), 311-320.
- Golińska, E., Tomusiak, A., Gosiewski, T., Więcek, G., Machul, A., Mikołajczyk, D., Bulanda, M., Heczko, P. & Strus, M. (2013). Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, *19*, 3562-3572.
- Gömöri, C., Nacsá-Farkas, E., Kerekes, E. B., Kocsubé, S., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2013). Evaluation of five essential oils for the control of food-spoilage and mycotoxin producing fungi. *Acta Biol. Szeged.*, *57*, 113-116.
- Gordien, A. Y., Gray, A. I., Franzblau, S. G., & Seidel, V. (2009). Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L.(Cupressaceae). *J. Ethnopharmacol.*, *126*, 500-505.
- Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem. Rev.*, *18*, 241-272.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, *78*, 79-97.
- Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., & Leach, D. N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* *14*, 322-332.
- Gumral, N., Kumbul, D. D., Aylak, F., Saygin, M., & Savik, E. (2015). *Juniperus communis* Linn oil decreases oxidative stress and increases antioxidant enzymes in the heart of rats administered a diet rich in cholesterol. *Toxicol. Ind. Health*, *31*, 85-91.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol.*, *124*, 91-97.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C., (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, Oxford, England.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.*, *476*, 107-112.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, *53*, 1081-1085.
- Han, X., & Parker, T. L. (2017). Anti-inflammatory activity of *Juniper* (*Juniperus communis*) berry essential oil in human dermal fibroblasts. *Cogent Medicine*, *4*, 1306200.
- Han, Y. (2009). Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.*, *9*, 207-211.
- Hashemi, M., Nouri, L. M., Entezari, M., Nafisi, S., & Nowroozii, H. (2010). Anti-mutagenic and pro-apoptotic effects of apigenin on human chronic lymphocytic leukemia cells. *Acta Med. Iran.*, *48*, 283-288.
- Hashino, M., Tachibana, M., Nishida, T., Hara, H., Tsuchiya, K., Mitsuyama, M., Watanabe, K., Shimizu, T., & Watarai, M. (2015). Inactivation of the MAPK signaling pathway by *Listeria monocytogenes* infection promotes trophoblast giant cell death. *Front. Microbiol.*, *6*, 1145.
- Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., & Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int. J. Food Microbiol.*, *125*, 242-251.

- Höferl, M., Stoilova, I., Schmidt, E., Wanner, J., Jirovetz, L., Trifonova, D., Krastev, L., & Krastanov, A. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of *Juniper* berry (*Juniperus communis* L.) essential oil. Action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. *Antioxidants*, *3*, 81-98.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, *97*, 1027-1031.
- Holler, J. G., Christensen, S. B., Slotved, H. C., Rasmussen, H. B., Gúzman, A., Olsen, C. E., Petersen, B., & Mølgaard, P. (2012). Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. *J. Antimicrob. Chemother.*, *67*, 1138-1144.
- Hsu, C. C., Lai, W. L., Chuang, K. C., Lee, M. H., & Tsai, Y. C. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med. Mycol.*, *51*, 473-482.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.*, *3*, 12.
- Innocenti, M., Michelozzi, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Vincieri, F. F., & Mulinacci, N. (2007). Flavonoids and biflavonoids in tuscan berries of *Juniperus communis* L.: Detection and quantitation by hplc/dad/esi/ms. *J. Agric. Food Chem.*, *55*, 6596-6602.
- Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E. M., Kabała-Dzik, A., Azzimonti, B., Dziedzic, A., Rimondini, L., & Wojtyczka, R. D. (2017). Rutin, a quercetin glycoside, restores chemosensitivity in human breast cancer cells. *Phytother Res.*, *31*, 1529-1538.
- İşcan, G., İşcan, A., & Demirci, F. (2016). Anticandidal effects of thymoquinone: Mode of action determined by transmission electron microscopy (TEM). *Nat. Prod. Commun.*, *11*, 977-978.
- Ivanov M. (2019). Mehanizmi delovanja odabranih flavonoida, terpena i nitratnih estara heterocikličnih jedinjenja na izolate *Candida albicans* iz usne duplje čoveka. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., & Hube, B. (2012). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, *10*, 85-93.
- Jaradat, Z. W., Wampler, J. L., & Bhunia, A. K. (2003). A *Listeria* adhesion protein-deficient *Listeria monocytogenes* strain shows reduced adhesion primarily to intestinal cell lines. *Med. Microbiol. Immunol.*, *192*, 85-91.
- Jennison, A. V., & Verma, N. K. (2004). *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.*, *28*, 43-58.
- Johann, S., Mendes, B. G., Missau, F. C., Resende, M. A. D., & Pizzolatti, M. G. (2011). Antifungal activity of five species of *Polygala*. *Braz. J. Microbiol.*, *42*, 1065-1075.
- Just, J. R., & Daeschel, M. A. (2003). Antimicrobial effects of wine on *Escherichia coli*O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium in a model stomach system. *J. Food Sci.*, *68*, 285-290.
- Kafil, H. S., & Asgharzadeh, M. (2014). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from education hospital of iran. *Maedica*, *9*, 323-327.
- Kalemba, D. A., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, *10*, 813-829.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, *2*, 123-140.
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.*, *33*, 300-305.

- Kargiotou, C., Katsanidis, E., Rhoades, J., Kontominas, M., & Koutsoumanis, K. (2011). Efficacies of soy sauce and wine base marinades for controlling spoilage of raw beef. *Food Microbiol.* 28, 158-163.
- Karre, L., Lopez, K., & Getty, K. J. (2013). Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Sci.*, 94, 220-227.
- Klančnik, A., Šimunović, K., Sterniša, M., Ramić, D., Možina, S. S., & Bucar, F. (2020). Anti-adhesion activity of phytochemicals to prevent *Campylobacter jejuni* biofilm formation on abiotic surfaces. *Phytochem. Rev.*, 1-30.
- Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*, 5, 580-592.
- Kluza, J., Marchetti, P., Gallego, M. A., Lancel, S., Fournier, C., Loyens, A., Beauvillain, J.C., & Bailly, C. (2004). Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells. *Oncogene*, 23, 7018-7030.
- Kolarević, S., Milovanović, D., Avdović, M., Oalđe, M., Kostić, J., Sunjog, K., Nikolić, B., Knežević-Vukčević, J., & Vuković-Gaćić, B. (2016). Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Bot. Serb.*, 40, 29-36.
- Kovač, J., Šimunović, K., Wu, Z., Klančnik, A., Bucar, F., Zhang, Q., & Možina, S. S. (2015). Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)- α -pinene in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 10, e0122871.
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 6, a027029.
- Krishan, A. (1975). Rapid Flow Cytofluorometric Analysis of Mammalian Cell Cycle by Propidium Iodide Staining *J. Cell Biol.* 66, 188-193.
- Krockel, L. (2013). The role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products. In M. Kongo (Ed.). *Lactic acid bacteria-R&D for food, health and livestock purposes* (pp. 129–152). Rijeka: InTech.
- Kurek, A. N., Grudniak, A. M., Kraczkiewicz-Dowjat, A., & Wolska, K. I. (2011). New antibacterial therapeutics and strategies. *Pol. J. Microbiol.*, 60, 3-12.
- Kusuhara, M., Urakami, K., Masuda, Y., Zangiacomì, V., Ishii, H., Tai, S., Maruyama, K., & Yamaguchi, K. (2012). Fragrant environment with α -pinene decreases tumor growth in mice. *Biomed. Res.*, 33, 57-61.
- Kweon, M. H., Adhami, V. M., Lee, J. S., & Mukhtar, H. (2006). Constitutive over expression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J. Biol. Chem.*, 281, 33761-33772.
- Lagrouh, F., Dakka, N., & Bakri, Y. (2017). The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *J. Mycol. Med.*, 27, 303-311.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 453-462.
- Lantto, T. A., Laakso, I., Dorman, H. J., Mauriala, T., Hiltunen, R., Kõks, S., & Raasmaja, A. (2016). Cellular stress and p53-associated apoptosis by *Juniperus communis* L. Berry extract treatment in the human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 1113.
- Latgé, J. P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.*, 9, 382-389.
- Lee, H., Woo, E. R., & Lee, D. G. (2018). Apigenin induces cell shrinkage in *Candida albicans* by membrane perturbation. *FEMS Yeast Res.*, 18, foy003.
- Lesgards, J.F., Baldovini, N., Vidal, N., & Pietri, S., (2014). Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytother. Res.* 28, 1423–1446.

- Lesjak M. (2011). Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. (Cupresaceae). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad.
- Lesjak, M.M., Beara, I.N., Orčić, D.Z., Anačkov, G.T., Balog, K.J., Francisković, M.M., Mimica-Dukić, N.M., 2011. *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chem.* 124, 850-856.
- Lesjak, M.M., Beara, I.N., Orčić, D.Z., Ristić, J.D., Anačkov, G.T., Božin, B.N., Mimica-Dukić, N.M., 2013. Chemical characterization and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT-Food Sci. Technol.* 53, 530–539.
- Li, L., Lu, Q., Shen, Y., & Hu, X. (2006). Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells. *Biochemical pharmacology*, 71(5), 584-595.
- Li, N., & Zong, M. H. (2010). Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, 66, 43-54.
- Li, X., Yan, Z., & Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149, 353-362.
- Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205, 275-292.
- Lopes, M. D. F. S., Simões, A. P., Tenreiro, R., Marques, J. J. F., & Crespo, M. T. B. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int. J. Food Microbiol.*, 112, 208-214.
- Ložienė, K., & Labokas, J. (2012). Effects of abiotic environmental conditions on amount and enantiomeric composition of α -pinene in *Juniperus communis* L. *Biochem. Syst. Ecol.*, 44, 36-43.
- Ložienė, K., & Venskutonis, P. R. (2016). Juniper (*Juniperus communis* L.) oils. In: Preedy, V. R. (Ed.). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 495-500). London: Academic Press.
- Łuczaj, Ł., & Szymański, W. M. (2007). Wild vascular plants gathered for consumption in the Polish countryside: a review. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 3, 17.
- Łuczaj, L., Pieroni, A., Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., Sõukand, R., Svanberg, I., & Kalle, R. (2012). Wild food plant use in 21 st century Europe, the disappearance of old traditions and the search for new cuisines involving wild edibles. *Acta Soc. Bot. Pol.* , 81.
- Luo, G., & Samaranyake, L. P. (2002). *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *Apmis*, 110, 601-610.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Int.*, 44, 3057-3064.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.*, 2, 1051-1060.
- Maeda, R. N., Barcelos, C. A., Santa Anna, L. M. M., & Pereira Jr, N. (2013). Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *J. Biotechnol.* 163, 38-44.
- Mahbub, A.A., Le Maitre, C.L., Haywood-Small, S.L., Cross, N.A., & Jordan-Mahy, N. (2015). Polyphenols act synergistically with doxorubicin and etoposide in leukaemia celllines. *Cell Death Discov.* 1, 15043.
- Majewska, E., Kozłowska, M., Kowalska, D., & Gruczyńska, E. (2017). Characterization of the essential oil from cone-berries of *Juniperus communis* L.(Cupressaceae). *Herba Pol.*, 63, 48-55.

- Manoharan, R. K., Lee, J. H., & Lee, J. (2017). Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* 8, 1476.
- Marcarini, J.C., Tsuboy, M.S.F., Luiz, R.C., Ribeiro, L.R., Hoffmann-Campo, C.B., & Mantovani, M.S., (2011). Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 63, 459–465.
- Martz, F., Peltola, R., Fontanay, S., Duval, R. E., Julkunen-Tiitto, R., & Stark, S. (2009). Effect of latitude and altitude on the terpenoid and soluble phenolic composition of juniper (*Juniperus communis*) needles and evaluation of their antibacterial activity in the boreal zone. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9575-9584.
- Masuoka, J., & Hazen, K. C. (2004). Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. *Infect. Immun.*, 72, 6230-6236.
- Matias, E. F., Alves, E. F., Silva, M. K., Carvalho, V. R., Figueredo, F. G., Ferreira, J. V., Coutinho, H. D., Silva, J.M., Ribeiro-Filho, ., & Costa, J. G. (2016). Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (*Boraginaceae*) and the sabinene. *Ind. Crops. Prod.*, 87, 45-53.
- Matsuo, A. L., Figueiredo, C. R., Arruda, D. C., Pereira, F. V., Scutti, J. A. B., Massaoka, M. H., Travassos, L. R., Sartorelli, P., & Lago, J. H. (2011). α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 411, 449-454.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4, 119-128.
- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Compagnone D., & Serio, A. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794-803.
- Meng, G., Chai, K., Li, X., Zhu, Y., & Huang, W. (2016a). Luteolin exerts pro-apoptotic effect and anti-migration effects on A549 lung adenocarcinoma cells through the activation of MEK/ERK signaling pathway. *Chem. Biol. Interact.*, 257, 26-34.
- Meng, X., Li, D., Zhou, D., Wang, D., Liu, Q., & Fan, S. (2016b). Chemical composition, antibacterial activity and related mechanism of the essential oil from the leaves of *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Ethnopharmacol.*, 194, 698-705.
- Miceli, N., Marino, A., Köroğlu, A., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., & Taviano, M. F. (2020). Comparative study of the phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts of five *Juniperus* L.(Cupressaceae) taxa growing in Turkey. *Nat. Prod. Res.*, 34, 1636-1641.
- Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Bellinghieri, V., La Barbera, T.M., Güvenç, A. & Taviano, M. F. (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6570-6577.
- Miladi, H., Mili, D., Slama, R. B., Zouari, S., Ammar, E., & Bakhrouf, A. (2016). Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microb. Pathog.*, 93, 22-31.
- Milenković, M., Stošović, J., & Slavkowska, V. (2018). Synergy between essential oils of *Calamintha* species (*Lamiaceae*) and antibiotics. *Nat. Prod. Commun.* 13, 371-374.
- Milohanic, E., Jonquière, R., Cossart, P., Berche, P., & Gaillard, J. L. (2001). The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol. Microbiol.*, 39, 1212-1224.

- Milohanic, E., Pron, B., Berche, P., Gaillard, J. L., & European *Listeria* Genome Consortium. (2000). Identification of new loci involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells. European *Listeria* Genome Consortium. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 146, 731-739.
- Mišković, K., Bujak, M., Lončar, M. B., & Glavaš-Obrovac, L. (2013). Antineoplastic DNA-binding compounds: Intercalating and minor groove binding drugs. *Arh. Hig. Toksikol.*, 64, 593-602.
- Mitić-Ćulafić, D., Žegura, B., Nikolić, B., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., & Filipič, M. (2009). Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 260-266.
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., & Kawanishi, S. (2005). Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 76, 1439-1453.
- Mo, J. S., Alam, K. J., Kim, H. S., Lee, Y. M., Yun, K. J., & Chae, S. C. (2016). MicroRNA 429 regulates mucin gene expression and secretion in murine model of colitis. *J. Crohns. Colitis*, 10, 837-849.
- Modnicki, D., & Łabędzka, J., (2009). Estimation of the total phenolic compounds in juniper sprouts (*Juniperus communis*, Cupressaceae) from different places at the kujawsko-pomorskie province. *Herba Pol.*, 55, 127-132.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Sci. Technol.*, 38, 565-570.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2007). Effects of clove and tea tree oils on *Escherichia coli* O157: H7 in blanched spinach and minced cooked beef. *J. Food Process. Preserv.*, 31, 379-391.
- Morimoto, Y., Baba, T., Sasaki, T., & Hiramatsu, K. (2015). Apigenin as an anti-quinolone-resistance antibiotic. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 46, 666-673.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Motarjemi, Y., Moy, G., & Todd, E. (2013). *Encyclopedia of food safety*, first ed. Academic Press, London, UK.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17, 1061-1066.
- Na, H. J., Koo, H. N., Lee, G. G., Yoo, S. J., Park, J. H., Lyu, Y. S., & Kim, H. M. (2001). Juniper oil inhibits the heat shock-induced apoptosis via preventing the caspase-3 activation in human astrocytes CCF-STTG1 cells. *Clin. Chim. Acta*, 314, 215-220.
- Navasaitis, M. (2004). Dendrologija [Dendrology]. *Vilnius, Margi raštai, Lithuania*.
- Nazer, A. I., Kobilinsky, A., Tholozan, J. L., & Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Typhimurium*: a synergistic effect? *Food Microbiol.*, 22, 391-398.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. D. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10, 86.
- Neanover, S. (2020). Effects of Oxygen Levels and Short Chain Fatty Acid Exposure on Antibiotic Susceptibility in *Listeria monocytogenes*. *Honors Theses*. 270.
- Nikolić, B., Vasiljević, B., Ćirić, A., Mitić-Ćulafić, D., Cvetković, S., Džamić, A., Knežević-Vukčević, J. (2019). Bioactivity of *Juniperus communis* essential oil and post-distillation waste: assessment of selective toxicity against food contaminants. *Arch. Biol. Sci*, 71, 235-244.

- Nobakht, M., Trueman, S. J., Wallace, H. M., Brooks, P. R., Streeter, K. J., & Katouli, M. (2017). Antibacterial properties of flavonoids from kino of the eucalypt tree, *Corymbia torelliana*. *Plants*, *6*, 39.
- Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.*, *11*, 272-279.
- Orav, A., Koel, M., Kailas, T., & Müürisepp, M. (2010). Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries and needles of Estonian juniper (*Juniperus communis* L.). *Procedia Chem.*, *2*, 161-167.
- Orčić, D. Z., Mimica-Dukić, N. M., Francišković, M. M., Petrović, S. S., & Jovin, E. Đ. (2011). Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chem. Cent. J.*, *5*, 34.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., & Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.*, *143*, 48-53.
- Orhan, D. D., Özçelik, B., Özgen, S., & Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.*, *165*, 496-504.
- Orhan, N., Orhan, I. E., & Ergun, F. (2011). Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species. *Food Chem. Toxicol.*, *49*, 2305-2312.
- Osanai, A., Li, S. J., Asano, K., Sashinami, H., Hu, D. L., & Nakane, A. (2013). Fibronectin-binding protein, FbpA, is the adhesin responsible for pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol. Immunol.*, *57*, 253-262.
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.*, *17*, 32-37.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*, *18*, 414-420.
- Oyedemi, S. O., Okoh, A. I., Mabinya, L. V., Pirochenva, G., & Afolayan, A. J. (2009). The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and g-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Biotechnol.*, *8*, 1280-1286.
- Panagoda, G. J., Ellepola, A. N. B., & Samaranyake, L. P. (2001). Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*, *44*, 29-35.
- Paparella, A., Mazzarrino, G., Chaves-López, C., Rossi, C., Sacchetti, G., Guerrieri, O., & Serio, A. (2016). Chitosan boosts the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil in modified atmosphere packaged pork. *Food Microbiol.*, *59*, 23-31.
- Park, J. H., Lee, Y. S., Lim, Y. K., Kwon, S. H., Lee, C. U., & Yoon, B. S. (2000). Specific binding of recombinant *Listeria monocytogenes* p60 protein to Caco-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, *186*, 35-40.
- Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M. T., & Vázquez, C. (2005). PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *Int. J. Food Microbiol.*, *104*, 207-214.
- Pentecost, M., Kumaran, J., Ghosh, P., & Amieva, M. R. (2010). *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. *PLoS Pathog.*, *6*, e1000900.
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kalodjera, Z., & Blažević, N. (2005). Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharm.*, *55*, 417-422.
- Perk, A. A., Shatynska-Mytsyk, I., Gerçek, Y. C., Boztaş, K., Yazgan, M., Fayyaz, S., Farooqi, A. A., 2014. Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells. *Cancer Cell Int.* *14*, 124.

- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect. Dis.*, *17*, e383-e392.
- Peruč, D., Gobin, I., Abram, M., Broznić, D., Svalina, T., Štifter, S., Staver, M. M., & Tićac, B. (2018). Antimycobacterial potential of the juniper berry essential oil in tap water. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, *69*, 46-54.
- Peruč, D., Tićac, B., Abram, M., Broznić, D., Štifter, S., Staver, M. M., & Gobin, I. (2019). Synergistic potential of *Juniperus communis* and *Helichrysum italicum* essential oils against nontuberculous mycobacteria. *J. Med. Microbiol.*, *68*, 703-710.
- Peters, G. J. (2014). Novel developments in the use of antimetabolites. *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids*, *33*, 358-374.
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.*, *6*, 1-5.
- Pezzani, R., Salehi, B., Vitalini, S., Iriti, M., Zuñiga, F. A., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., & Martins, N. (2019). Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: An update on the cancer perspective. *Medicina*, *55*, 110.
- Polaquini, S. R., Svidzinski, T. I., Kemmelmeier, C., & Gasparetto, A. (2006). Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. *Arch. Oral Biol.*, *51*, 482-490.
- Priyadarsini, R. V., Murugan, R. S., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunagaran, D., & Nagini, S. (2010). The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-κB inhibition. *European journal of pharmacology*, *649*(1-3), 84-91.
- Raasmaja, A., Stenius, U., & Ghalali, A. (2019). The Water Extract of *Juniperus communis* L. Induces Cell Death and Sensitizes Cancer Cells to Cytostatic Drugs through p53 and PI3K/Akt Pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, *20*, 2054.
- Rajčević N. (2015). Diferencijacija vrsta iz sekcije *Juniperus* roda *Juniperus* L. (Cupresaceae) sa Balkanskog poluostrva, korišćenjem fitohemijskih i molekularnih karaktera. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., & Rao, R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob Agents Chemother.*, *54*, 5062-5069.
- Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., & O'Neal, J. M. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.*, *20*, 522-531.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, *39*, 603-613.
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod.*, *62*, 250-264.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—anoverview. *J. Complement. Med. Res.* *16*, 79-90.
- Rhoades, J., Kargiotou, C., Katsanidis, E., & Koutsoumanis, K. P. (2013). Use of marination for controlling *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in raw beef. *Food Microbiol.*, *36*, 248-253.
- Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A., & Møretro, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, *116*, 372-383.

- Russo, R., Cassiano, M. G. V., Ciociaro, A., Adornetto, A., Varano, G. P., Chiappini, C., Berliocchi, L., Tassorelli, C., Bagetta, G., & Corasaniti, M. T. (2014). Role of D-limonene in autophagy induced by bergamot essential oil in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *PLoS one*, *9*, e113682.
- Sadeghi-Ghadi, Z., Vaezi, A., Ahangarkani, F., Ilkit, M., Ebrahimnejad, P., & Badali, H. (2020). Potent in vitro activity of curcumin and quercetin co-encapsulated in nanovesicles without hyaluronan against *Aspergillus* and *Candida* isolates. *J. Mycol. Med.*, *30*, 101014.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., & Jabbar, A. (2010). Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.*, *27*, 238-254.
- Samsonowicz, M., Kamińska, I., Kalinowska, M., & Lewandowski, W. (2015). Alkali metal salts of rutin–Synthesis, spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV–VIS), antioxidant and antimicrobial studies. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, *151*, 926-938.
- Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., & Gómez-Duarte, O. G. (2011). *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med. Infect. Dis.* *9*, 263-277.
- Sati, S. C., & Joshi, S. (2010). Antibacterial potential of leaf extracts of *Juniperus communis* L. from Kumaun Himalaya. *Afr. J. Microbiol. Res.*, *4*, 1291-1294.
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.*, *7*, 979-990.
- Sawant, B., & Khan, T. (2017). Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. *Biomed. Pharmacother.*, *96*, 1478-1490.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & Van Dijck, P. W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *59*, 426-435.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, *54*, 9329-9339.
- Seleem, D., Pardi, V., & Murata, R. M. (2017). Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. *Arch. Oral Biol.*, *76*, 76-83.
- Selim, S. (2011). Antimicrobial activity of essential oils against Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) and *Escherichia coli* O157: H7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Braz. J. Microbiol.*, *42*, 187-196.
- Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: future source of new drugs. *Int. J. Herb. Med.*, *4*, 59-64.
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol. Res.*, *163*, 337-344.
- Sharma, P., Kumar, V., Ramesh, R., Saravanan, K., Deep, S., Sharma, M., Mahesh, S., & Dinesh, S. (2011). Biocontrol genes from *Trichoderma* species: a review. *Afr. J. Biotechnol.*, *10*, 19898-19907.
- Shedbalkar, U., & Jadhav, J. P. (2011). Detoxification of malachite green and textile industrial effluent by *Penicillium ochrochloron*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, *16*, 196-204.
- Shen, Q., Zhou, W., Li, H., Hu, L., & Mo, H. (2016). ROS involves the fungicidal actions of thymol against spores of *Aspergillus flavus* via the induction of nitric oxide. *PLoS one*, *11*, e0155647.
- Silva-Dias, A., Miranda, I. M., Branco, J., Monteiro-Soares, M., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. G. (2015). Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front. Microbiol.*, *6*, DOI: 10.3389/fmicb.2015.00205.

- Simić, V., Kolarević, S., Brčeski, I., Jeremić, D., & Vuković-Gačić, B. (2015). Cytotoxicity and antiviral activity of palladium (ii) and platinum (ii) complexes 1 with 2-(diphenylphosphino) benzaldehyde 1-adamantoylhydrazone. *Turk. J. Biol.* DOI: 10.3906/biy-1503-23.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1734-1740.
- Sitheequ, M. A. M., Panagoda, G. J., Yau, J., Amarakoon, A. M. T., Udagama, U. R. N., & Samaranayake, L. P. (2009). Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against *Candida* species. *Chemotherapy*, 55, 189-196.
- Sl.glasnik RS 72/2010: Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa.
- Sonboli, A., Babakhani, B., & Mehrabian, A. R. (2006). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z. Naturforsch.*, 61, 160-164.
- Srdic-Rajic, T., Tisma-Miletic, N., Cavic, M., Kanjer, K., Savikin, K., Galun, D., Konic-Ristic, A., & Zoranovic, T. (2016). Sensitization of K562 leukemia cells to doxorubicin by the *Viscum album* extract. *Phytother Res*, 30, 485-495.
- Sudjana, A. N., Carson, C. F., Carson, K. C., Riley, T. V., & Hammer, K. A. (2012). *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Med. Mycol.*, 50, 863-870.
- Sun, L., Liao, K., & Wang, D. (2015). Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PLoS One*, 10, e0117695.
- Šiler, B., Živković, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Živković, J. N., Ćirić, A., Soković, M., & Mišić, D. (2014). Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chem.*, 147, 367-376.
- Šimunović, K., Ramić, D., Xu, C., & Smole Možina, S. (2020). Modulation of *Campylobacter jejuni* Motility, Adhesion to Polystyrene Surfaces, and Invasion of INT407 Cells by Quorum-Sensing Inhibition. *Microorganisms*, 8, 104.
- Šojić, B., Tomović, V., Jakanović, M., Ikonić, P., Džinić, N., Kocić-Tanackov, S., S., Popović, L., Tasić, T., Savanović, J. & Šojić, N. Ž. (2017). Antioxidant activity of *Juniperus communis* L. essential oil in cooked pork sausages. *Czech J. Food Sci.*, 35, 189-193.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Tao, N., Jia, L., & Zhou, H. (2014). Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chem.*, 153, 265-271.
- Taviano, M. F., Marino, A., Trovato, A., Bellinghieri, V., Melchini, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Mondello, L., Güvenç, A. & De Pasquale, R. (2013). *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food. Chem. Toxicol.*, 58, 22-29.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med. Title*, 119, S3-S10.
- Tiwari, S., Gupta, N., Malairaman, U., & Shankar, J. (2017). Anti-aspergillus properties of phytochemicals against aflatoxin producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Natl. Acad. Sci. Lett.*, 40, 267-271.

- Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S., & Toba, T. (2001). Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J. Appl. Microbiol.*, *91*, 154-159.
- Tong, N., Zhang, J. I. E., Chen, Y., Li, Z., Luo, Y., Zuo, H. U. A., & Zhao, X. (2012). Berberine sensitizes multiple human cancer cells to the anticancer effects of doxorubicin *in vitro*. *Oncol. Lett.* *3*, 1263-1267.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, H.K., & Harris, C.C., (2004). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart, IARC Press, Lyon, France.
- Tsai, W. C., Tsai, N. M., Chang, K. F., & Wang, J. C. (2018). *Juniperus communis* extract exerts antitumor effects in human glioblastomas through blood-brain barrier. *Cell. Physiol. Biochem.*, *49*, 2443-2462.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K. & Krisch, J. (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int. J. Food Microbiol.*, *144*, 480-486.
- Tumen, I., Süntar, I., Keleş, H., & Küpeli Akkol, E. (2012). A therapeutic approach for wound healing by using essential oils of *Cupressus* and *Juniperus* species growing in Turkey. *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, *2012*, DOI:10.1155/2012/728281
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. J. A. E. M. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*, 1561-1568.
- Upadhyay, A., Johny, A. K., Amalaradjou, M. A. R., Baskaran, S. A., Kim, K. S., & Venkitanarayanan, K. (2012). Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes* virulence factors *in vitro*, and down-regulate expression of virulence genes. *Int. J. Food Microbiol.*, *157*, 88-94.
- Vaičiulytė, V., & Ložienė, K. (2013). Variation of chemical and morphological characters of leaves and unripe cones in *Juniperus communis*. *Bot Lith.*, *19*, 37-47.
- Van Haute, S., Raes, K., Van der Meeren, P., & Sampers, I. (2016). The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*, *68*, 30-39.
- Van Tyne, D., Martin, M. J., & Gilmore, M. S. (2013). Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, *5*, 895-911.
- Vaquero, M. R., Alberto, M. R., & de Nadra, M. M. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, *18*, 93-101.
- Varela-López, A., Battino, M., Navarro-Hortal, M. D., Giampieri, F., Forbes-Hernández, T. Y., Romero-Márquez, J. M., Collado, R., & Quiles, J. L. (2019). An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. *Food Chem. Toxicol.*, *134*, 110834.
- Vasilijević, B., Knežević-Vukčević, J., Mitić-Ćulafić, D., Orčić, D., Francišković, M., Srdic-Rajic, T., Jovanović, M., Nikolić, B. (2018). Chemical characterization, antioxidant, genotoxic and *in vitro* cytotoxic activity assessment of *Juniperus communis* var. *saxatilis*. *Food Chem. Toxicol.*, *112*, 118-125.
- Vasilijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Djekic, I., Marković, T., Knežević-Vukčević, J., Tomasevic, I., Velebit, B., Nikolić, B. (2019). Antibacterial effect of *Juniperus communis* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes in vitro* and in wine marinated beef. *Food control*, *100*, 247-256.
- Vazquez-Armenta, F. J., Bernal-Mercado, A. T., Lizardi-Mendoza, J., Silva-Espinoza, B. A., Cruz-Valenzuela, M. R., Gonzalez-Aguilar, G. A., Nazzaro, F., Fratianni, F., & Ayala-Zavala, J. F.

- (2018). Phenolic extracts from grape stems inhibit *Listeria monocytogenes* motility and adhesion to food contact surfaces. *J. Adhes. Sci. Technol.*, *32*, 889-907.
- Vazquez-Armenta, F. J., Hernandez-Onate, M. A., Martinez-Tellez, M. A., Lopez-Zavala, A. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Gutierrez-Pacheco, M. M., & Ayala-Zavala, J. F. (2020). Quercetin repressed the stress response factor (sigB) and virulence genes (prfA, actA, inlA, and inlC), lower the adhesion, and biofilm development of *L. monocytogenes*. *Food Microbiol.*, *87*, 103377.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.*, *14*, 584-640.
- Vichi, S., Riu-Aumatell, M., Mora-Pons, M., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2005). Characterization of volatiles in different dry gins. *J. Agric. Food Chem.*, *53*, 10154-10160.
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, *408*, 307-310.
- Wang, G., Zhang, J., Liu, L., Sharma, S., & Dong, Q. (2012). Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. *PloS One*, *7*, e51764.
- Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., & Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms intermediacy of H₂O₂-and p53-dependent pathways. *J. Biol. Chem.*, *279*, 25535-25543.
- Wang, W., Zhou, X., Suo, Y., Deng, X., Cheng, M., Shi, C., & Shi, X. (2017). Prevalence, serotype diversity, biofilm-forming ability and eradication of *Listeria monocytogenes* isolated from diverse foods in Shanghai, China. *Food Control*, *73*, 1068-1073.
- Wang, X. S., Yang, W., Tao, S. J., Li, K., Li, M., Dong, J. H., & Wang, M. W. (2006). The effect of δ -elemene on hela cell lines by apoptosis induction. *Yakugaku Zasshi*, *126*(10), 979-990.
- Wanner, J., Schmidt, E., Bail, S., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Gochev, V., Girova, T., Atanasova, T., & Stoyanova, A. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of selected essential oils and some of their main compounds. *Nat. Prod. Commun.*, *5*, 1359-1364.
- Wei, A., & Shibamoto, T. (2007). Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, *55*, 1737-1742.
- White, T. C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L. F., & Stevens, D. A. (2002). Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, *46*, 1704-1713.
- WHO (2014). Fact Sheet N°310. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. (2005). β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.*, *8*, 525-533.
- Wright, M. L., Pendarvis, K., Nanduri, B., Edelmann, M. J., Jenkins, H. N., Reddy, J. S., et al. (2016). The effect of oxygen on bile resistance in *Listeria monocytogenes*. *J. Proteom. Bioinform.*, *9*, 107-111.
- Yaglioglu, A. S., & Eser, F. (2017). Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. *S. Afr. J. Bot.*, *113*, 29-33.
- Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Sci. Technol.*, *41*, 1060-1066.
- Yoneyama, H., & Katsumata, R. (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *70*, 1060-1075.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, *21*, 559-577.
- Yun, J., Lee, H., Ko, H. J., Woo, E. R., & Lee, D. G. (2015). Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, *1848*, 695-701.

- Zanetti, S., Cannas, S., Molicotti, P., Bua, A., Cubeddu, M., Porcedda, S., Marongiu, B. & Sechi, L. A. (2010). Evaluation of the Antimicrobial Properties of the Essential Oil of *Myrtus communis* L. against Clinical Strains of *Mycobacterium* spp. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2010, 1-3.
- Zarai, Z., Boujelbene, E., Salem, N. B., Gargouri, Y., & Sayari, A. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT-Food Sci. Technol.*, 50, 634–641.
- Zawirska-Wojtasiak, R. (2006). Chirality and the nature of food authenticity of aroma. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 5, 21-36.
- Zhang, D., Gan, R. Y., Zhang, J. R., Farha, A. K., Li, H. B., Zhu, F., Wang, X. H., & Corke, H. (2020). Antivirulence properties and related mechanisms of spice essential oils: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 19, 1018-1055.
- Zhang, X. Z., Wang, L., Liu, D. W., Tang, G. Y., & Zhang, H. Y. (2014). Synergistic inhibitory effect of berberine and d-limonene on human gastric carcinoma cell line MGC803. *J. Med. Food*, 17, 955-962.
- Zhang, Y., Seeram, N. P., Lee, R., Feng, L., & Heber, D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 670-675.
- Zhang, Y., Wu, D., Kuang, S., Qing, M., Ma, Y., Yang, T., Wang, T., & Li, D. (2019). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and cholinesterase inhibitory activities of three *Juniperus* species. *Nat. Prod. Res.*, DOI: 10.1080/14786419.2019.1579811.
- Zhao, J., Kim, J. E., Reed, E., & Li, Q. Q. (2005). Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 27, 247-256.
- Zhao, L., Wientjes, M. G., & Au, J. L. (2004). Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin. Cancer Res.*, 10, 7994-8004.
- Zheljazkov, V. D., Semerdjieva, I. B., Dincheva, I., Kacaniova, M., Astatkie, T., Radoukova, T., & Schlegel, V. (2017). Antimicrobial and antioxidant activity of *Juniper galbuli* essential oil constituents eluted at different times. *Ind. Crops Prod.*, 109, 529-537.
- Zheng, H. C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8, 59950-59964.

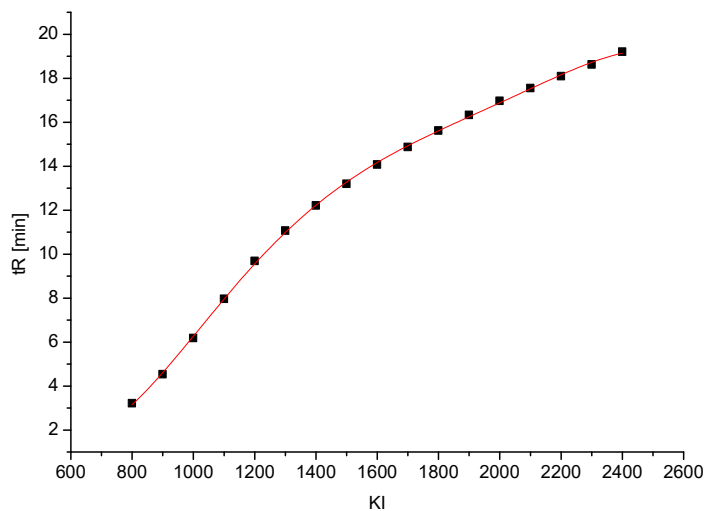
PRILOZI

8. PRILOZI

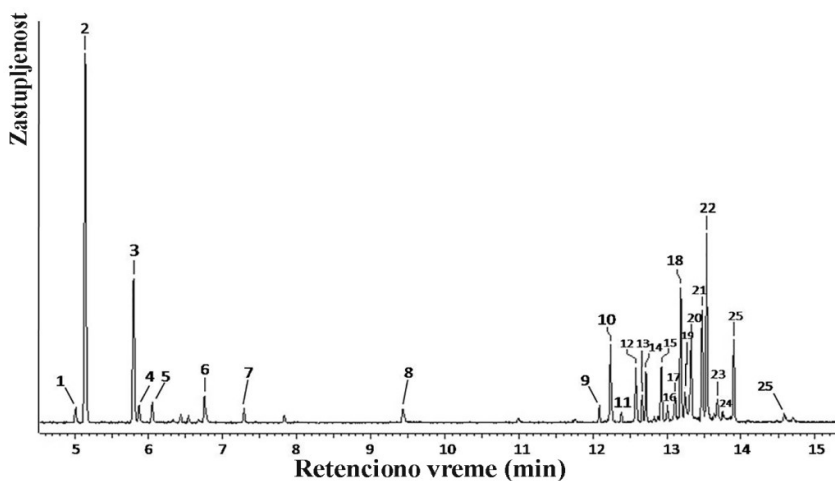
8.1. GC-MS analiza

Tabela 8.1. Kalibracija za linearne retencione indekse

jedinjenje	LRI	t_R [min]
oktan	800	3,213
nonan	900	4,533
dekan	1000	6,18
undekan	1100	7,966
dodekan	1200	9,689
tridekan	1300	11,069
tetradekan	1400	12,209
pentadekan	1500	13,193
heksadekan	1600	14,073
heptadekan	1700	14,876
oktadekan	1800	15,625
nonadekan	1900	16,327
ikozan	2000	16,967
heneikozan	2100	17,553
dokozan	2200	18,091
trikozan	2300	18,624
tetrakozan	2400	19,206

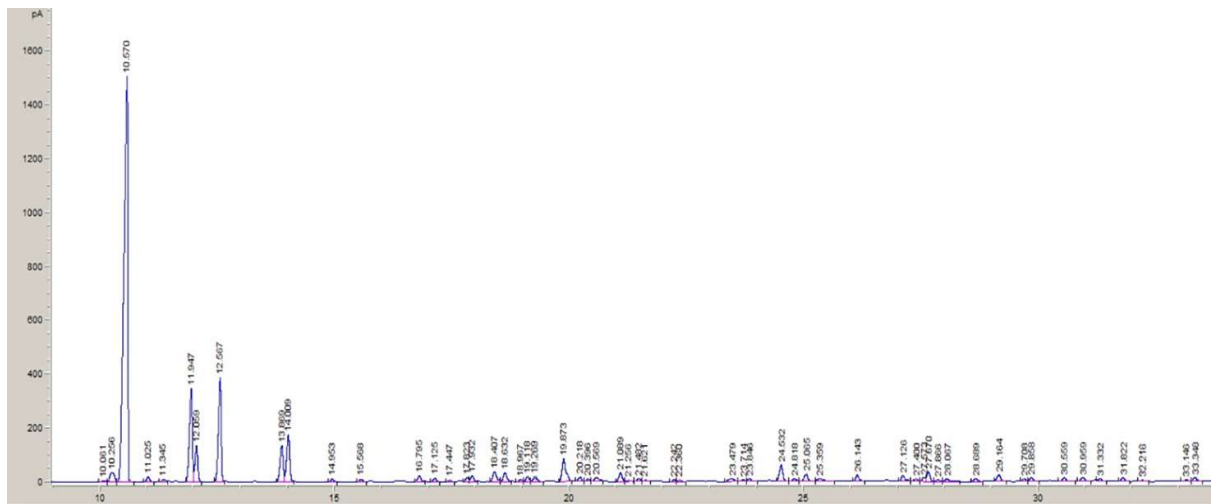


Slika 8.1. Kalibracija za linearne retencione indekse

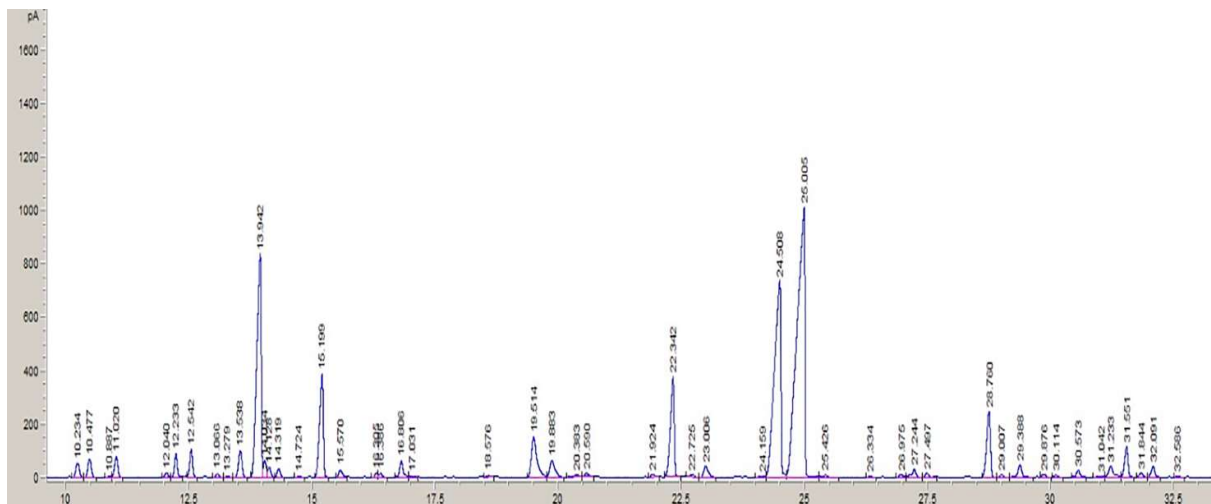


Slika 8.2. GC-MS analiza etarskog ulja *Juniperus communis* var. *saxatilis* (Jc-EU-P):

1 – α -tujen, 2 – α -pinen, 3 – sabinen, 4 – β -pinen, 5 – β -mircen, 6 – limonen, 7 – γ -terpinen, 8 – 4-terpineol, 9 – α -kopaen, 10 – β -elemen, 11 – (seskviterpen), 12 – β -kariofilen, 13 – γ -elemen, 14 – vidren (tujopsen), 15 – α -humulen, 16 – *cis*-muurola-4(14),5-dien, 17 – (seskviterpen), 18 – germakren D, 19 – (koeluirajući seskviterpeni), 20 – α -murolen, 21 – γ -kadinen, 22 – δ -kadinen, 23 – α -kadinen, 24 – (seskviterpen), 25 – germakren B, 26 – (seskviterpen).

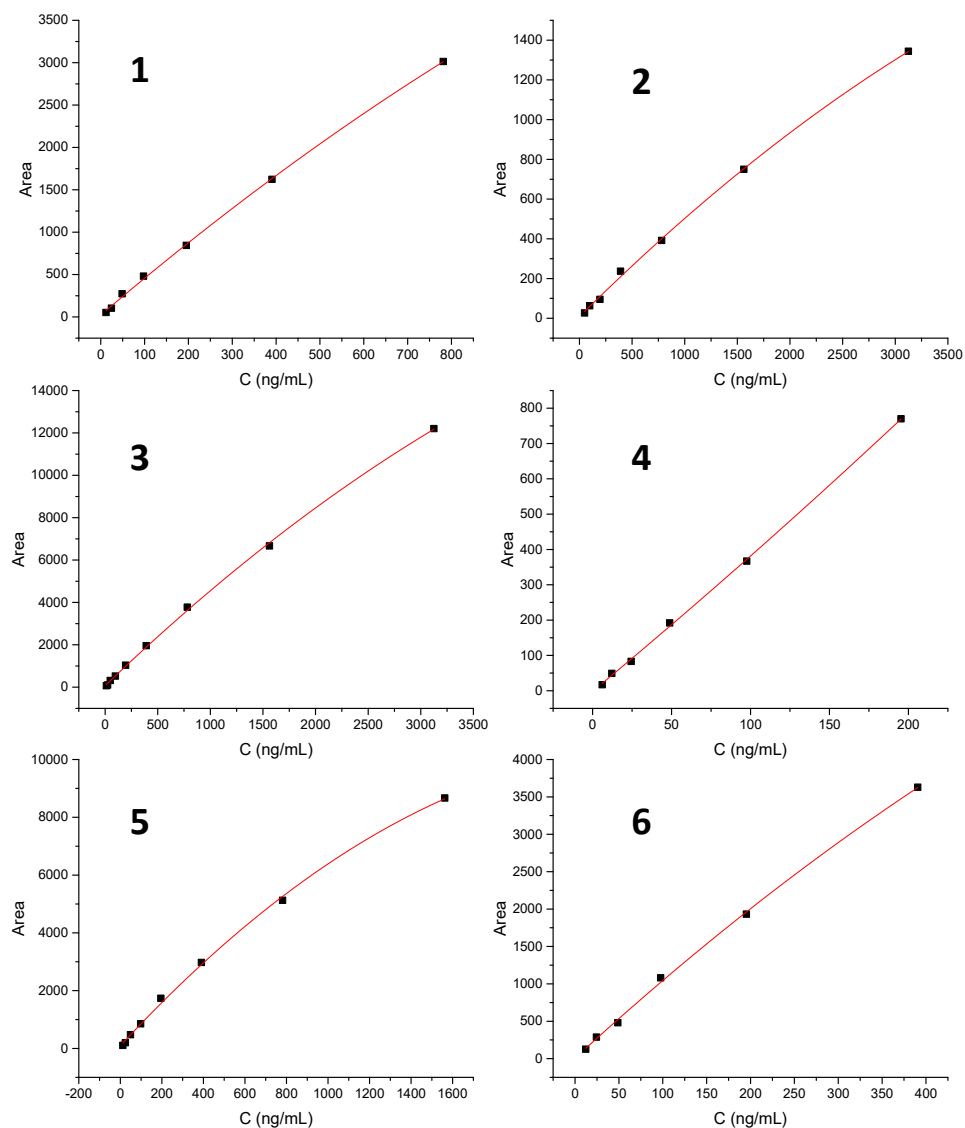


Slika 8.3. GC-MS hromatogram analize etarskog ulja *Juniperus communis* (Jc-EU-K).

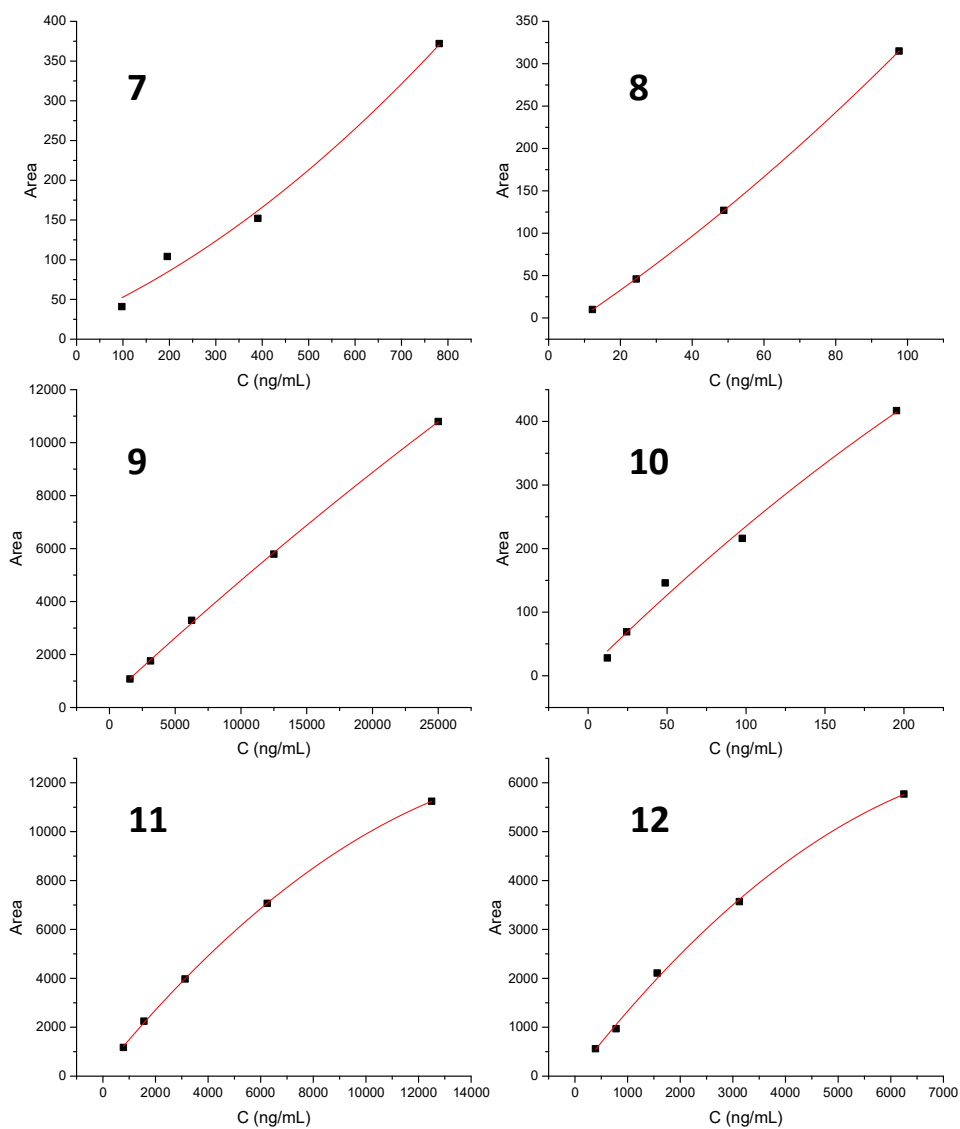


Slika 8.4. GC-MS hromatogram analize etarskog ulja *Satureja montana* (Sm-EU).

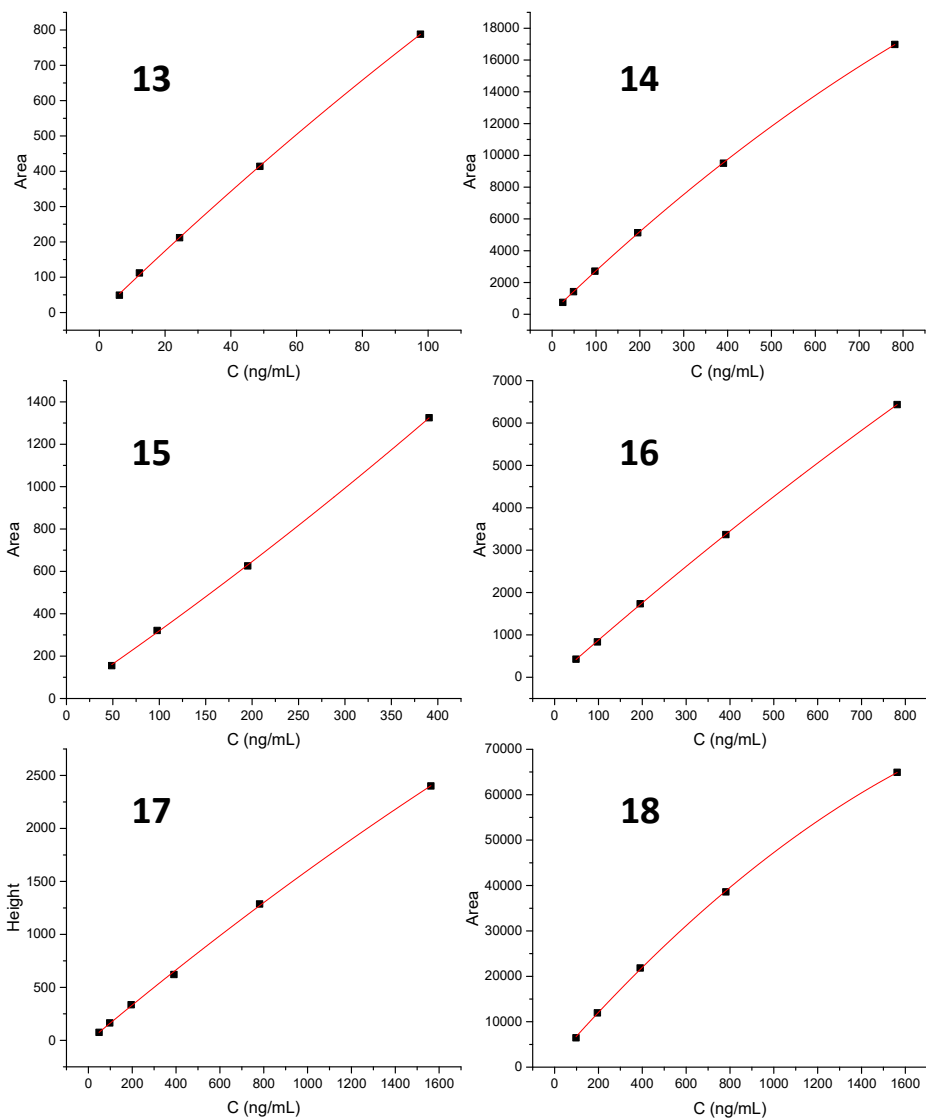
8.2. LC-MS-MS analiza



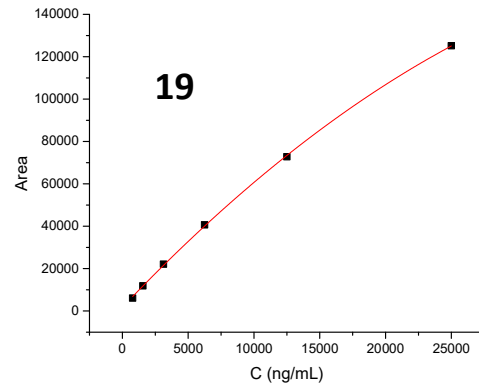
Slika 8.5. Kalibracione krive standardnih jedinjanja: **1** – *p*-hidroksibenzoeva kiselina (12,2 – 781 ng/mL), **2** – cimetna kiselina (48,8 – 3125 ng/mL), **3** – protokatehinska kiselina (12,2 – 3125 ng/mL), **4** – gentizinska kiselina (6,10 – 195 ng/mL), **5** – umbeliferon (12,2 – 1562 ng/mL), **6**- *p*-kumarinska kiselina (12,2–391 ng/mL).



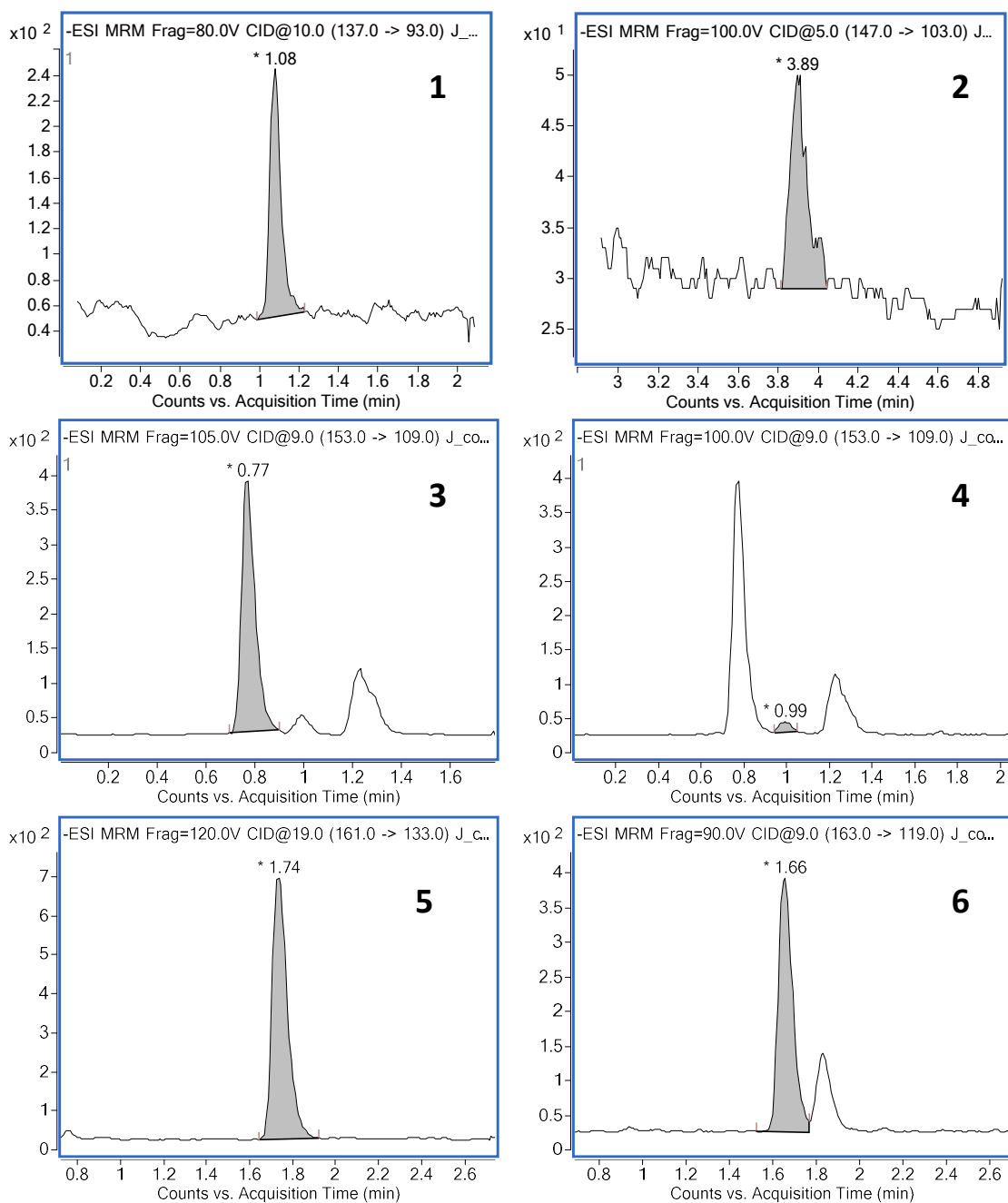
Slika 8.6. Kalibracione krive standardnih jedinjenja: **7** – vanilinska kiselina (97,7 – 781 ng/mL), **8** – galna kiselina (12,2 – 97,7 ng/mL), **9** – hinska kiselina (1562 – 25000 ng/mL), **10** – ferulna kiselina (12,2 – 195 ng/mL), **11** – katehin (781 – 12500 ng/mL), **12** – epikatehin (391 – 6250 ng/mL).



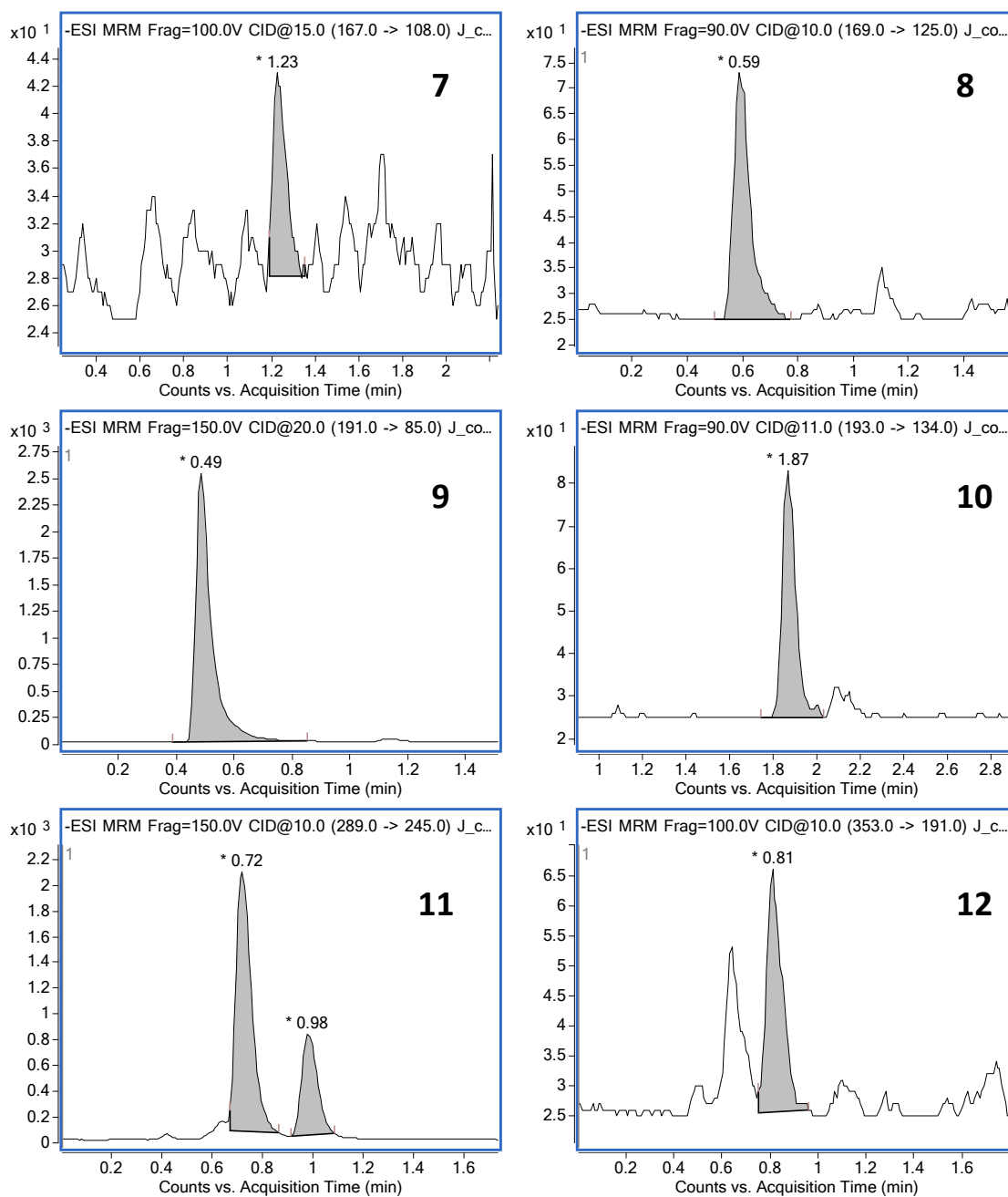
Slika 8.7. Kalibracione krive standardnih jedinjenja: **13** - 5-*O*-kafeoilhinska kiselina (6,10 – 97,7 ng/mL), **14** – apigenin-7-*O*-glukozid (24,4 – 781 ng/mL), **15** – kemferol-3-*O*-glukozid (48,8 – 391 ng/mL), **16** – kvercetin-3-*O*-ramnozid (48,8 – 781 ng/mL), **17** – kvercetin-3-*O*-glukozid (48,8 – 1562 ng/mL), **18** – amentoflavon (97,7 – 1562 ng/mL).



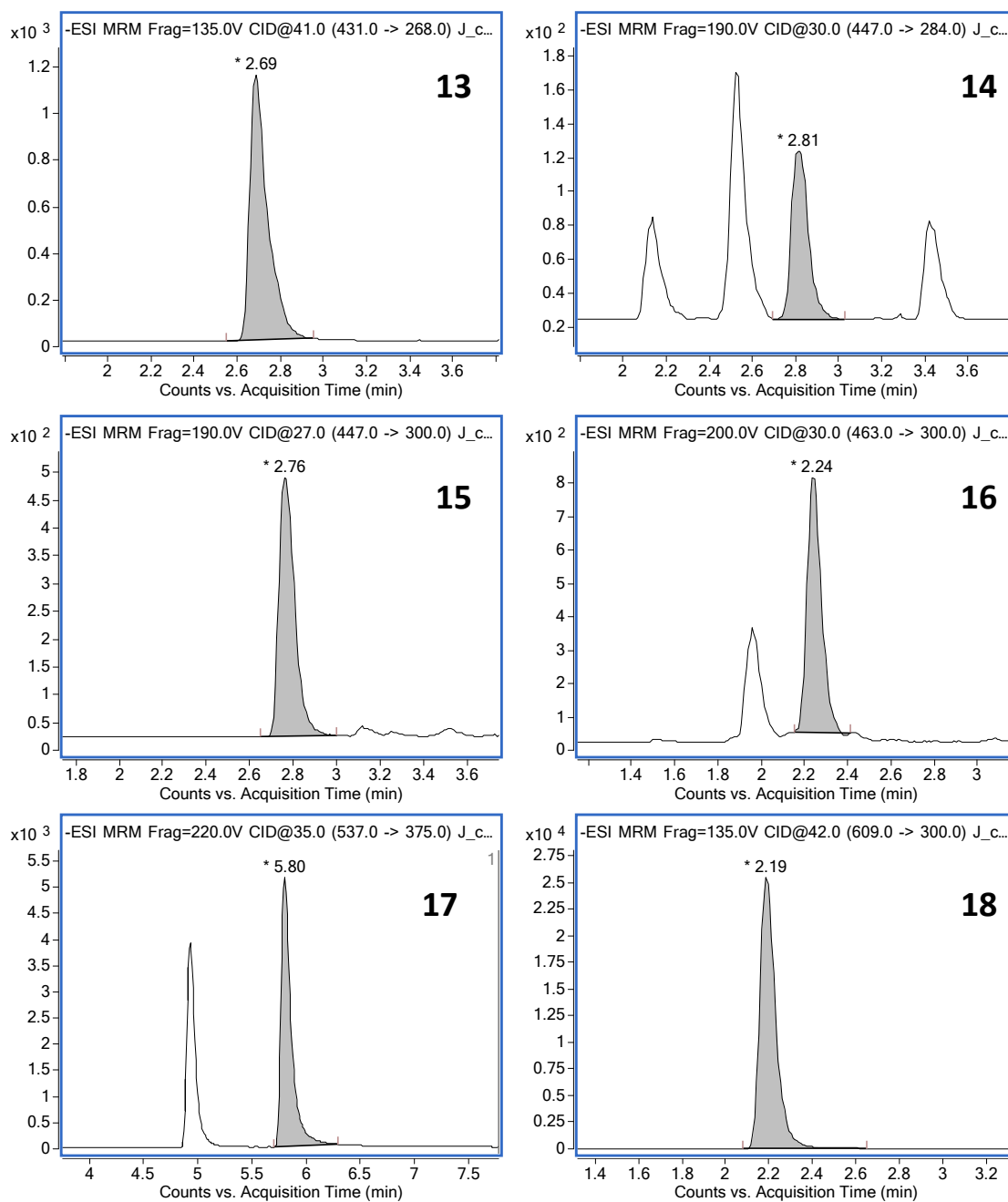
Slika 8.8. Kalibraciona kriva standardnog jedinjenja: 19 – kvercetin-3-*O*-ramnozid (781–25000 ng/mL).



Slika 8.9. SRM hromatogrami detektovanih jedinjenja u PDO: **1** – *p*-hidroksibenzoeva kiselina, **2** – cimetna kiselina, **3** – protokatehinska kiselina, **4** – gentizinska kiselina, **5** – umbeliferon, **6**– *p*-kumarinska kiselina.



Slika 8.10. SRM hromatogrami detektovanih jedinjenja u PDO: **7** – vanilinska kiselina, **8** – galna kiselina, **9** – hinska kiselina, **10** – ferulna kiselina, **11** – katehin i epikatehin **12** – 5-O-kafeoilhinska kiselina.



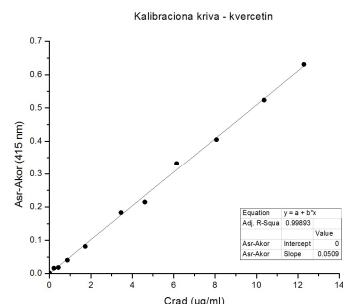
Slika 8.11. SRM hromatogrami detektovanih jedinjenja u PDO: **13** – apigenin-7-*O*-glukozid, **14** – kemferol-3-*O*-glukozid, **15** – kvercetin-3-*O*-ramnozid, **16** – kvercetin-3-*O*-glukozid, **17** – amentoflavon, **18** – kvercetin-3-*O*-ramnozid.

Tabela 8.2. Sadržaj ukupnih flavonoida izražen kao mg ekv. kvercetina/g SE

Koncentracija $\mu\text{g/mL}$	Apsorbancija						μg kvercetina sa grafika	mg ekv. kvercetina/g SE	
	A1	A2	A3	Asr	$A_{\text{korekcija}}$	A			
400	0,694	0,708	0,694	0,699	0,240	0,458	8,992	22,48	
200	0,331	0,346	0,328	0,335	0,170	0,165	3,239	16,20	19,11 \pm 3,17
100	0,195	0,183	0,195	0,191	0,096	0,095	1,865	18,65	

Tabela 8.3. Kalibracija kvercetina

Kalibraciona (kvercetin)									
Cpoč ($\mu\text{g/ml}$)	Cfin ($\mu\text{g/ml}$)	A (415 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor		
1	2	3	Asr	Akor	Asr-Akor				
122,9	12,29	0,864	0,866	0,818	0,849	0,218	0,631		
103,7	10,37	0,689	0,768	0,704	0,720	0,196	0,524		
80,68	8,068	0,572	0,562	0,553	0,562	0,157	0,405		
61,45	6,145	0,484	0,477	0,460	0,474	0,141	0,333		
46,1	4,61	0,326	0,332	0,319	0,326	0,111	0,215		
34,58	3,458	0,251	0,248	0,246	0,249	0,065	0,183		
17,29	1,729	0,150	0,149	0,145	0,148	0,066	0,082		
8,64	0,864	0,095	0,099	0,092	0,095	0,055	0,040		
4,32	0,432	0,067	0,064	0,065	0,065	0,047	0,018		
2,16	0,216	0,062	0,056	0,053	0,057	0,040	0,016		
0	0	0,040	0,046	0,040	0,042	0,040	0,002		



Slika 8.12. Kalibraciona kriva kvercetina

8.3. Antioksidativna aktivnost

8.4. Neutralizacija DPPH radikala

Koncentracija $\mu\text{g/mL}$	Apsorbancija				RSC _{DPPH} (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	Akor	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
66,67	0,049	0,050	0,074	0,039	95,25	94,77	83,36	95,01
33,33	0,049	0,051	0,050	0,038	94,77	93,82	94,29	94,29
16,67	0,049	0,050	0,050	0,038	94,77	94,29	94,29	94,45
8,333	0,085	0,103	0,101	0,052	84,31	75,75	76,70	78,92
4,167	0,136	0,160	0,149	0,035	51,98	40,57	45,80	46,12
2,083	0,168	0,185	0,178	0,036	37,24	29,16	32,49	32,96
0,521	0,188	0,206	0,204	0,037	28,21	19,65	20,60	22,82
kontrola	0,196	0,223	0,212	0,036				
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					3,85	4,98	4,41	4,40

*Markirane vrednosti predstavljaju eksperimentalnu grešku i nisu uzete u razmatranje

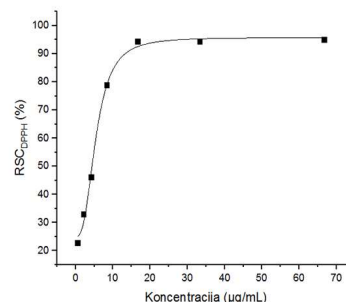
Slika 8.13. Kriva zavisnosti RSC_{DPPH} (%) od koncentracije PDO

Tabela 8.5. Neutralizacija DPPH radikala – Jc-EU-P

Koncentracija mg/mL	Apsorbancija				RSC _{DPPH} (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	Akor	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
15	0,063*	0,181	0,08	0,0465	93,02	43,09	85,83	64,46
7,5	0,704	0,06	0,058	0,044	-179,27	93,23	94,08	93,65
3,75	0,064	0,065	0,064	0,044	91,54	91,11	91,54	91,40
1,87	0,151	0,154	0,144	0,057	60,23	58,96	63,19	60,79
0,94	0,187	0,202	0,19	0,045	39,92	33,57	38,65	37,38
0,47	0,198	0,205	0,209	0,044	34,84	31,88	30,18	32,30
0,23	0,211	0,215	0,224	0,045	29,76	28,07	24,26	27,36
kontrola	0,225	0,238	0,246	0,049				
IC ₅₀ (mg/mL)					1,39	1,62	1,35	1,48

*Markirane vrednosti predstavljaju eksperimentalnu grešku i nisu uzete u razmatranje

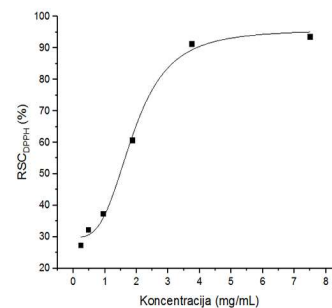
Slika 8.14. Kriva zavisnosti RSC_{DPPH} (%) od koncentracije Jc-EU-P

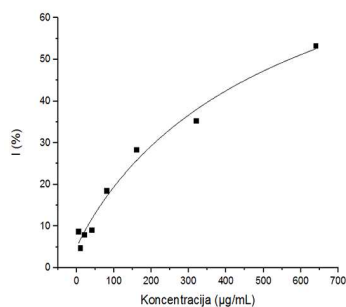
Tabela 8.6. Inhibicija lipidne peroksidacije – PDO

Koncentracija µg/mL	Apsorbancija							I (%)						Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	Akor	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	
640	0,609	0,619	0,635	0,655	0,553	0,576	0,131	53,15	52,17	50,60	48,64	58,64	56,39	53,27
320	0,780	0,747	0,830	0,694	0,771	0,675	0,089	32,28	35,51	27,38	40,71	33,16	42,57	35,27
160	0,898	0,795	0,960	0,941	0,772	0,394	0,062	18,07	28,16	11,99	13,85	30,41	67,46	28,32
80	0,821	0,950	0,920	0,961	0,822	0,780	0,044	23,85	11,21	14,15	10,13	23,75	27,87	18,49
40	0,905	0,998	0,969	0,968	0,939	1,038	0,042	15,42	6,31	9,15	9,25	12,09	2,38	9,10
20	0,985	0,991	1,025	0,936	0,880	0,565	0,024	5,82	5,23	1,89	10,62	16,11	46,98	7,93
10	0,978	1,074	1,003	0,900	1,032	0,977	0,022	6,31	-3,10	3,85	13,95	1,01	6,40	4,74
5	0,991	1,049	1,097	0,946	1,008	0,951	0,020	4,84	0,68	-5,55	9,25	3,17	8,76	8,76
kontrola	1,097	1,036	0,941	1,128	0,981	0,939	0,931							
IC ₅₀ (µg/mL)								607,6	588,8	-	-	509,8	453,9	569,14

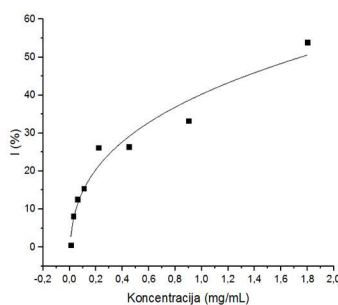
*Markirane vrednosti predstavljaju eksperimentalnu grešku i nisu uzete u razmatranje

Tabela 8.7. Inhibicija lipidne peroksidacije – Jc-EU-P

Koncentracija µg/mL	Apsorbancija							I (%)						Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	Akor	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	
1,80	0,496	0,533	0,597	0,561	0,579	0,583	0,069	53,61	51,59	48,64	52,55	56,60	60,16	53,86
0,90	0,723	0,598	0,600	0,685	0,704	0,720	0,057	27,65	41,23	41,01	31,78	29,71	27,97	33,22
0,45	0,679	0,684	0,680	0,710	0,788	0,792	0,045	31,12	30,58	31,02	27,76	19,28	18,85	26,43
0,22	0,667	0,675	0,671	0,708	0,720	0,870	0,039	31,78	30,91	31,34	27,32	26,02	9,72	26,18
0,11	0,683	0,752	0,880	0,836	0,838	0,844	0,027	28,73	21,24	7,33	12,11	11,90	11,24	15,43
0,06	0,763	0,807	0,723	0,887	0,939	0,854	0,024	19,72	14,94	24,06	6,25	0,60	9,83	12,57
0,03	0,834	0,837	0,877	0,904	0,878	0,877	0,022	11,79	11,46	7,12	4,18	7,01	7,12	8,11
0,01	0,871	0,854	0,901	1,018	1,014	0,955	0,020	7,55	9,40	4,29	-8,42	-7,98	-1,58	0,54
kontrola	0,878	0,889	0,963	0,900	0,983	0,910	0,907							
IC ₅₀ (mg/mL)								-	1,67	-	-	1,67	1,51	1,75



Slika 8.15. Kriva zavisnosti I (%) od koncentracije PDO



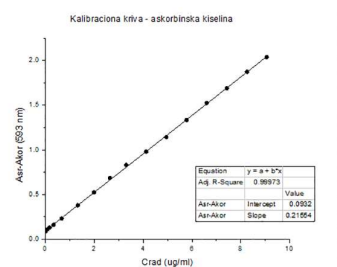
Slika 8.16. Kriva zavisnosti I (%) od koncentracije Jc-EU-

Tabela 8.8. Određivanje redukcionog potencijala PDO – FRAP test

Koncentracija µg/mL	Apsorbancija					µg ask.kis. sa grafika		mg ekv.ask.kis./g s.e	
	A1	A2	A3	Asr	A _{korekcija}	A			
32	0,951	0,978	0,975	0,968	0,042	0,926	2,319	71,89	
16	0,621	0,587	0,587	0,599	0,043	0,556	1,286	79,73	78,77 ± 6.46
8	0,382	0,389	0,373	0,382	0,042	0,340	0,683	84,69	

Tabela 8.9. Kalibracija askorbinske kiseline

Kalibraciona (askorbinska kiselina)							
Cpoč	Cfin	A (593 nm)			Asr	Akor	Asr-Akor
(µg/ml)	(µg/ml)	1	2	3			
281,0	9,065	2,146	2,080	2,052	2,093	0,052	2,041
256,0	8,258	1,960	1,923	1,912	1,932	0,057	1,875
230,4	7,432	1,701	1,779	1,739	1,740	0,050	1,690
204,8	6,606	1,606	1,611	1,549	1,589	0,062	1,527
179,2	5,781	1,427	1,372	1,364	1,388	0,054	1,334
153,6	4,955	1,177	1,166	1,202	1,182	0,037	1,144
128,0	4,129	1,009	1,015	1,020	1,015	0,035	0,980
102,4	3,303	0,868	0,874	0,862	0,868	0,037	0,831
81,80	2,639	0,712	0,725	0,718	0,718	0,035	0,683
61,44	1,982	0,570	0,561	0,562	0,564	0,042	0,522
40,90	1,319	0,413	0,409	0,417	0,413	0,035	0,378
20,45	0,660	0,261	0,266	0,262	0,263	0,035	0,228
10,23	0,330	0,195	0,193	0,194	0,194	0,035	0,159
5,11	0,165	0,161	0,162	0,166	0,163	0,034	0,128
2,56	0,083	0,144	0,144	0,142	0,143	0,034	0,110
0,00	0,00	0,126	0,126	0,125	0,126	0,042	0,084



Slika 8.17. Kalibraciona kriva askorbinske kiseline

8.4. Određivanje citotoksičnog potencijala

Tabela 8.10. Efekat različitih koncentracija Jc-EU-P, PDO i cistostatika DOX na preživljavanje MRC-5 ćelija

MRC-5					
Jc-EU-P		PDO		DOX	
Konc. (mg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (mg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)
Kontrola	100,00 ± 9,44	Kontrola	100,00 ± 9,76	Kontrola	100,00 ± 7,01
0,008	102,92 ± 7,19	0,078	87,17 ± 9,00	0,313	81,40 ± 7,35
0,016	97,93 ± 9,55	0,156	84,38 ± 8,21	0,625	77,04 ± 7,48
0,031	94,53 ± 9,13	0,313	77,15 ± 7,41	1,25	61,84 ± 7,05
0,062	76,42 ± 8,45	0,625	74,04 ± 8,29	2,5	48,02 ± 5,56
0,125	48,01 ± 6,11	1,25	72,25 ± 9,01	5	24,62 ± 4,33
0,25	2,64 ± 1,94	2,5	57,54 ± 8,47	10	23,94 ± 3,00
		5	30,38 ± 4,89	20	23,65 ± 2,24
		10	18,83 ± 3,16		

Tabela 8.11. Efekat različitih koncentracija Jc-EU-P, PDO i cistostatika DOX na preživljavanje A549 ćelija

A549					
Jc-EU-P		PDO		DOX	
Konc. (mg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (mg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)
Kontrola	100,00 ± 9,87	Kontrola	100,00 ± 11,76	Kontrola	100,00 ± 10,98
0,008	87,66 ± 4,32	0,078	85,15 ± 9,21	0,313	83,08 ± 9,71
0,016	76,85 ± 4,69	0,156	79,55 ± 8,55	0,625	80,48 ± 9,63
0,031	70,41 ± 8,20	0,313	70,25 ± 8,85	1,25	75,07 ± 7,67
0,062	64,19 ± 7,65	0,625	64,27 ± 8,16	2,5	61,43 ± 6,90
0,125	18,18 ± 2,49	1,25	44,74 ± 6,57	5	54,80 ± 6,55
0,25	1,30 ± 0,35	2,5	39,00 ± 6,02	10	47,32 ± 4,20
		5	20,31 ± 2,61	20	46,77 ± 3,31
		10	7,81 ± 1,67		

Tabela 8.12. Efekat različitih koncentracija Jc-EU-P, PDO i cistostatika 5-FU na preživljavanje HT-29 ćelija

HT-29					
Jc-EU-P		PDO		5-FU	
Konc. (mg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (mg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)
Kontrola	100,00 ± 11,56	Kontrola	100,00 ± 7,79	Kontrola	100,00 ± 8,05
0,016	90,74 ± 10,08	0,313	92,73 ± 11,32	12	90,12 ± 6,82
0,031	92,16 ± 11,74	0,625	81,09 ± 7,44	25	84,05 ± 8,14
0,062	84,41 ± 11,24	1,25	55,39 ± 5,10	50	66,13 ± 8,99
0,125	19,58 ± 4,24	2,5	25,09 ± 4,22	100	31,93 ± 4,25
0,25	1,19 ± 0,29	5	11,46 ± 3,31	200	10,75 ± 2,29
0,5	1,31 ± 0,43	10	9,89 ± 2,01	400	4,73 ± 1,05
		20	11,78 ± 4,41		

Tabela 8.13. Efekat različitih koncentracija Jc-EU-P, PDO i cistostatika 5-FU na preživljavanje HCT116 ćelija

HCT116					
Jc-EU-P		PDO		5-FU	
Konc. (mg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (mg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)
Kontrola	100,00 ± 9,68	Kontrola	100,00 ± 7,52	Kontrola	100,00 ± 8,32
0,016	92,03 ± 8,52	0,313	93,93 ± 7,57	12	96,81 ± 9,94
0,031	83,88 ± 9,14	0,625	90,89 ± 8,76	25	82,92 ± 6,42
0,062	77,10 ± 9,64	1,25	85,77 ± 7,09	50	79,21 ± 7,40
0,125	73,18 ± 7,80	2,5	83,26 ± 8,14	100	51,93 ± 8,91
0,25	17,43 ± 3,97	5	60,49 ± 8,37	200	15,18 ± 6,56
0,5	7,25 ± 1,24	10	37,66 ± 5,44	400	4,97 ± 1,71
		20	18,24 ± 5,26		

Tabela 8.14. Efekat različitih kombinacija Jc-EU-P, PDO i cistostatika DOX na preživljavanje A549 ćelija

A549					
Jc-EU-P + DOX 0,312		PDO + DOX 0,312		PDO + Jc-EU-P 15,62	
Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)
Kontrola	106,42 ± 9,35	Kontrola	100,00 ± 9,24	Kontrola	94,34 ± 10,12
DMSO	100,00 ± 8,39	0 + 0,312	83,08 ± 11,71	DMSO	100,00 ± 8,28
0 + 0,312	83,08 ± 11,71	78 + 0,312	51,75 ± 7,73	0 + 15,62	76,85 ± 3,69
7,81 + 0,312	49,89 ± 6,76	156 + 0,312	33,50 ± 5,77	313 + 15,62	36,23 ± 5,05
15,62 + 0,312	24,66 ± 5,73	313 + 0,312	19,88 ± 8,94	625 + 15,62	29,69 ± 4,56
32,25 + 0,312	11,74 ± 3,88	625 + 0,312	13,60 ± 5,99	1250 + 15,62	20,02 ± 2,90
62,5 + 0,312	6,96 ± 3,02				
Jc-EU-P + DOX 0,625		PDO + DOX 0,625		PDO + Jc-EU-P 31,25	
Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)
Kontrola	106,42 ± 9,35	Kontrola	100,00 ± 10,33	Kontrola	94,34 ± 10,12
DMSO	100,00 ± 8,39	0 + 0,625	80,48 ± 11,63	DMSO	100,00 ± 8,28
0 + 0,625	80,48 ± 11,63	78 + 0,625	36,17 ± 9,71	0 + 31,25	70,41 ± 11,20
7,81 + 0,625	41,72 ± 7,97	156 + 0,625	22,11 ± 6,03	313 + 31,25	25,66 ± 4,23
15,62 + 0,625	19,91 ± 4,17	313 + 0,625	15,58 ± 3,19	625 + 31,25	22,80 ± 3,36
32,25 + 0,625	9,10 ± 1,86	625 + 0,625	13,50 ± 6,99	1250 + 31,25	11,40 ± 2,04
62,5 + 0,625	6,86 ± 1,80				

Tabela 8.15. Efekat različitih kombinacija Jc-EU-P, PDO i cistostatika DOX na preživljavanje MRC-5 ćelija

MRC-5					
Jc-EU-P + DOX 0,312		PDO + DOX 0,312		PDO + Jc-EU-P 15,62	
Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)
Kontrola	104,46 ± 8,39	Kontrola	100,00 ± 9,24	Kontrola	98,11 ± 5,97
DMSO	100,00 ± 5,28	0 + 0,312	71,40 ± 8,20	DMSO	100,00 ± 6,18
0 + 0, 312	81,40 ± 6,45	78 + 0,312	70,80 ± 6,82	0 + 15,62	97,93 ± 6,28
7,81 + 0,312	95,63 ± 4,92	156 + 0,312	74,99 ± 7,43	313 + 15,62	80,33 ± 8,79
15,62 + 0,312	94,89 ± 7,66	313 + 0,312	59,60 ± 7,79	625 + 15,62	73,23 ± 8,60
32,25 + 0,312	94,29 ± 6,30	625 + 0,312	36,76 ± 5,32	1250 + 15,62	31,06 ± 3,90
62,5 + 0,312	56,80 ± 4,80				
Jc-EU-P + DOX 0,625		PDO + DOX 0,625		PDO + Jc-EU-P 31,25	
Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)	Konc. (µg/mL)	Preživljavanje (%)
Kontrola	104,46 ± 8,39	Kontrola	100,00 ± 9,24	Kontrola	98,11 ± 5,97
DMSO	100,00 ± 5,28	0 + 0,625	77,04 ± 9,32	DMSO	100,00 ± 6,18
0 + 0, 625	77,04 ± 5,77	78 + 0,625	66,27 ± 7,15	0 + 31,25	94,53 ± 6,41
7,81 + 0,625	84,71 ± 4,86	156 + 0,625	66,93 ± 8,02	313 + 31,25	80,33 ± 9,45
15,62 + 0,625	94,41 ± 5,65	313 + 0,625	47,77 ± 4,28	625 + 31,25	73,23 ± 6,41
32,25 + 0,625	88,23 ± 7,69	625 + 0,625	35,25 ± 3,68	1250 + 31,25	31,06 ± 2,45
62,5 + 0,625	46,21 ± 3,18				

8.5. Određivanje genotoksičnog potencijala

Tabela 8.16. Rezultati komet testa za Jc-EU-P i PDO na A549 ćelijama

Redni br.	K		DMSO			PDO			Jc-EU-P		DOX	
	0	0	0	75	150	300	5	10	20	0,25	0,5	1
	$\mu\text{g/mL}$											
							TI (%)					
1	5,183	0,183	0,059	8,955	13,099	0,004	0,223	8,188	0,085	0,308	1,311	
2	3,618	1,222	0,000	9,172	19,540	4,287	0,000	7,259	2,745	0,000	0,485	
3	0,432	0,146	7,358	0,803	1,098	32,327	0,000	0,000	8,872	0,383	0,136	
4	4,747	4,829	6,728	1,107	32,120	0,029	0,074	15,083	8,286	10,873	14,825	
5	0,616	0,785	23,430	13,535	21,924	2,069	1,359	0,000	6,285	0,069	0,000	
6	0,096	0,000	0,000	0,178	10,259	11,624	11,301	0,611	6,620	0,000	0,223	
7	0,050	13,781	0,000	0,069	2,039	0,222	1,123	0,079	13,056	5,111	0,121	
8	0,414	0,037	7,325	0,220	0,025	20,908	0,609	0,076	0,104	4,938	10,219	
9	0,049	5,099	0,000	0,121	3,573	27,184	0,669	1,767	0,626	2,668	20,532	
10	0,873	6,659	8,238	0,000	0,224	17,408	0,036	0,275	42,789	14,031	2,157	
11	1,947	4,182	0,242	0,330	4,155	0,261	0,000	0,061	4,831	0,167	5,196	
12	0,084	9,035	0,000	0,000	3,041	0,000	0,000	0,976	0,150	3,444	13,027	
13	0,081	1,951	0,000	0,000	7,238	36,498	0,281	0,000	4,915	2,328	30,100	
14	5,776	0,014	0,136	11,762	0,000	0,000	1,002	0,000	0,055	0,752	1,826	
15	4,245	6,056	5,756	0,070	10,185	21,641	0,034	0,244	10,969	0,438	6,437	
16	0,142	0,000	1,097	0,003	10,432	0,028	0,000	0,325	0,074	0,074	20,885	
17	0,074	7,394	0,024	0,236	0,029	11,943	0,020	3,895	10,891	43,365	29,016	
18	11,664	0,033	0,018	5,379	0,463	8,472	2,101	0,778	0,025	99,771	40,680	
19	0,000	14,427	0,607	0,000	10,490	0,022	1,714	0,097	7,292	0,080	30,623	
20	4,527	36,103	0,000	2,658	0,583	0,220	0,025	0,125	0,000	0,764	0,000	
21	8,179	21,735	4,692	0,015	0,168	0,555	100,000	3,673	0,000	11,304	13,607	
22	1,159	2,018	4,883	1,770	5,101	39,566	2,103	0,099	0,084	0,067	10,151	
23	3,958	12,870	9,084	0,180	3,601	22,289	0,000	0,022	0,584	8,386	39,684	
24	0,000	0,077	0,009	20,454	0,023	1,995	0,000	0,000	0,075	0,284	6,350	
25	0,000	0,000	0,286	0,036	1,052	0,104	0,249	0,880	0,025	1,585	30,850	
26	1,008	0,010	1,837	2,233	95,085	3,214	6,536	0,000	0,230	16,172	37,667	
27	5,001	0,000	0,408	0,140	40,008	1,748	9,417	0,000	0,906	1,796	40,913	
28	7,086	0,000	0,776	27,160	56,384	0,000	0,541	0,000	0,020	2,545	39,980	
29	1,233	0,234	3,438	4,122	0,000	6,452	0,017	0,215	1,151	6,623	0,000	
30	0,050	0,000	5,197	1,638	0,000	0,000	0,000	0,013	0,339	3,219	0,037	
31	0,018	9,885	0,000	34,660	0,000	12,620	0,116	0,225	0,026	2,827	7,298	
32	0,001	5,436	6,652	0,872	30,056	20,739	1,472	3,381	0,215	1,097	18,098	
33	0,129	0,277	0,000	7,863	0,000	0,067	0,080	7,369	0,238	0,183	32,125	
34	0,030	0,014	9,492	4,489	23,025	2,706	2,569	0,336	0,999	3,382	8,876	
35	0,000	0,034	0,666	10,385	26,059	27,872	0,000	28,209	0,167	1,712	0,000	
36	0,000	0,028	0,015	2,691	0,230	4,472	0,000	12,770	0,384	0,170	0,000	
37	2,257	0,000	3,110	0,008	0,614	6,522	1,295	0,318	1,002	2,568	10,167	
38	0,112	2,116	8,253	0,344	0,119	0,022	0,080	1,243	0,456	0,000	2,207	
39	0,022	9,185	27,308	6,855	0,027	0,805	0,000	0,000	4,498	57,196	19,095	
40	0,000	0,094	15,156	18,262	15,098	6,701	1,511	6,725	0,109	12,874	10,384	
41	0,000	0,134	0,000	8,599	0,011	0,495	0,000	0,000	2,261	6,811	29,257	
42	0,000	8,040	0,195	0,031	6,626	0,349	0,285	1,013	12,672	0,491	24,372	
43	0,261	19,808	0,000	5,525	0,027	0,049	0,099	0,000	1,104	2,927	5,279	
44	1,839	0,056	1,653	12,200	5,793	4,316	0,081	0,723	20,016	0,376	18,088	
45	0,000	0,226	0,234	0,049	7,484	10,465	0,031	5,345	5,956	8,989	25,577	
46	2,406	10,341	0,225	0,040	0,084	0,252	0,806	0,018	13,649	0,012	0,263	
47	3,054	0,699	0,000	6,463	0,000	18,818	0,000	0,198	0,100	7,283	2,594	
48	0,000	12,509	0,000	0,119	13,635	5,173	0,246	0,031	0,126	0,000	13,094	
49	0,000	0,016	0,000	0,074	0,080	0,049	0,834	0,049	0,000	0,096	1,539	

Prilozi

50	0,000	0,130	0,191	0,186	10,055	0,056	0,000	0,001	7,550	0,288	0,046
51			4,556	0,010	14,720	0,952	2,448	0,112	36,429	12,355	0,022
52			15,855	26,417	1,454	2,829	0,272	0,273	0,570	12,340	1,093
53			0,011	20,129	26,672	0,165	5,279	4,265	16,399	16,943	4,732
54			2,849	1,742	1,224	9,732	17,689	5,996	24,604	0,793	1,452
55			16,714	0,769	27,112	0,109	0,815	4,766	2,449	6,348	4,447
56			4,856	0,325	0,072	0,626	0,000	0,603	8,669	27,679	4,726
57			0,430	18,421	8,945	18,656	1,067	9,670	32,317	7,921	1,524
58			0,146	0,029	28,533	16,849	7,131	0,269	1,029	2,338	9,721
59			8,853	1,873	38,542	2,786	8,306	0,417	20,376	32,045	3,352
60			16,166	8,014	1,697	1,903	22,690	20,201	12,773	5,193	19,296
61			11,211	10,676	14,050	0,371	17,132	0,043	19,574	20,228	96,100
62			1,321	8,118	2,748	5,929	17,132	10,011	0,230	9,088	0,801
63			35,043	0,000	2,506	17,429	4,093	23,313	44,198	26,842	16,154
64			5,283	7,932	0,024	0,104	19,349	3,830	5,429	3,008	2,334
65			0,376	9,568	0,000	0,034	1,285	0,405	0,231	5,404	12,825
66			32,614	6,621	3,038	4,439	0,324	0,008	5,866	17,973	16,122
67			43,843	14,537	15,812	4,009	31,645	2,414	4,964	6,794	8,131
68			0,721	0,001	13,350	0,018	2,988	17,131	8,843	28,678	27,299
69			12,027	0,433	0,000	1,309	0,029	0,901	7,313	1,758	0,201
70			5,823	0,015	9,766	0,099	15,949	0,214	0,688	0,327	2,911
71			0,319	8,250	1,992	0,010	0,148	19,123	7,645	0,124	2,196
72			0,022	1,414	0,006	2,176	0,043	20,870	10,535	35,120	20,142
73			22,092	1,002	11,884	0,000	4,751	2,377	7,038	8,107	53,056
74			0,074	2,136	6,210	21,150	18,559	0,280	3,232	27,255	0,098
75			6,573	20,040	10,551	0,003	2,979	0,204	9,312	51,848	19,672
76			47,776	5,845	1,081	0,000	6,115	36,220	33,303	3,274	16,546
77			18,645	4,884	43,978	0,249	3,785	0,096	5,459	0,009	10,241
78			31,160	3,242	1,594	0,089	0,028	1,821	1,038	0,205	0,054
79			11,782	1,530	12,188	2,180	0,798	2,478	0,228	38,355	0,129
80			22,551	0,179	8,288	2,054	0,118	3,977	14,186	2,373	0,000
81			9,286	0,174	7,418	1,929	10,164	12,896	18,721	21,767	1,190
82			2,023	21,340	18,964	1,803	0,126	10,562	98,142	0,198	3,353
83			12,436	11,272	7,062	1,678	20,688	4,572	7,535	0,000	1,870
84			23,234	0,002	21,128	1,552	10,642	4,285	0,127	92,942	2,435
85			23,233	0,050	26,905	1,426	0,145	5,353	0,351	2,833	7,238
86			12,778	0,005	0,090	1,301	21,246	1,299	6,708	21,531	61,111
87			0,000	0,125	0,349	1,175	9,646	0,261	10,963	10,806	32,353
88			0,000	0,037	24,365	1,050	5,482	0,022	0,911	12,565	0,466
89			2,067	0,072	28,683	0,924	7,750	19,176	0,431	6,164	0,500
90			11,266	5,175	11,881	0,798	0,883	1,735	0,236	0,000	14,017
91			9,245	0,008	4,311	0,673	12,617	4,221	0,569	18,137	2,063
92			17,665	11,862	33,412	0,547	0,465	7,471	10,602	1,827	1,352
93			32,470	2,723	0,173	0,422	4,096	1,311	1,039	20,736	10,225
94			1,380	0,005	19,478	0,296	0,295	3,206	3,675	0,076	0,462
95			17,123	8,877	6,842	0,170	25,378	0,409	0,527	14,700	0,024
96			2,903	38,456	1,968	0,045	5,720	1,987	0,259	11,053	0,061
97			0,893	0,793	21,934		6,157	0,200	6,721	0,463	21,968
98			4,708	0,029	8,147		3,556	2,097	39,961	4,582	4,457
99			30,308	0,142	6,837		0,067	0,000	96,073	0,005	13,135
100			17,192	0,091	1,214		0,006	0,030	16,944	28,543	7,741

Tabela 8.17. Rezultati komet testa za Jc-EU-P i PDO na MRC-5 ćelijama

Redni br.	K	DMSO			PDO			Jc-EU-P			DOX	
	0	0	250	500	1000	12,5	25	50	0,05	0,1	0,2	
	TI (%)											
1	1,157	12,975	6,265	0,543	5,960	0,244	9,874	2,283	12,411	20,272	1,630	
2	3,278	46,033	0,480	12,869	18,806	4,633	5,916	0,713	32,975	1,236	1,900	
3	1,325	29,499	4,562	2,918	30,309	22,650	5,486	0,108	20,880	13,680	5,069	
4	1,598	0,047	0,885	6,746	39,049	0,006	15,563	15,268	10,871	0,889	5,982	
5	23,875	0,000	1,418	14,642	33,960	0,480	0,577	24,903	7,560	33,505	7,555	
6	10,619	2,858	2,530	0,008	0,014	0,104	0,200	0,221	35,911	50,739	11,025	
7	13,639	1,700	12,703	0,004	41,152	11,220	0,244	1,187	18,877	13,879	11,498	
8	15,521	10,730	16,694	0,042	22,821	6,087	0,150	0,066	0,024	6,841	12,998	
9	11,671	3,489	0,278	17,898	0,052	0,278	0,761	0,006	26,524	0,562	14,496	
10	9,771	8,614	5,744	9,901	9,736	2,664	13,356	21,999	11,575	0,053	14,923	
11	6,149	4,324	0,035	19,824	0,044	15,242	11,058	1,274	32,392	0,067	15,647	
12	0,836	7,192	0,880	37,902	12,655	4,698	0,937	8,255	0,729	0,203	17,016	
13	3,812	12,962	6,954	39,326	0,122	5,737	7,589	11,462	8,522	0,093	17,826	
14	9,054	0,006	0,044	1,715	1,763	2,357	1,643	17,024	6,975	22,889	18,812	
15	14,208	1,855	5,639	0,069	21,854	4,210	22,437	1,454	26,237	5,257	19,887	
16	8,866	4,218	7,800	0,168	43,912	2,248	10,522	4,754	5,746	0,135	21,219	
17	9,799	11,547	5,260	30,008	10,339	2,385	19,244	0,107	9,776	16,009	21,278	
18	3,417	15,055	0,228	0,135	38,556	9,106	0,007	4,230	13,060	16,849	21,428	
19	0,499	0,772	3,192	8,894	3,639	3,276	3,648	20,602	0,661	22,803	21,502	
20	1,319	4,285	2,310	13,993	0,109	0,258	7,137	0,005	9,338	14,699	23,879	
21	8,965	0,017	26,078	17,984	32,800	6,109	2,820	6,321	6,289	0,020	24,211	
22	0,326	6,012	1,926	0,109	17,947	2,661	9,995	0,032	3,437	10,260	24,587	
23	4,852	13,523	1,287	0,124	1,612	0,045	3,559	0,620	30,698	9,948	24,744	
24	29,091	14,433	0,154	8,118	35,783	2,807	4,184	22,526	8,250	7,034	25,174	
25	15,959	3,893	0,061	2,989	30,625	7,814	5,025	14,805	4,598	0,052	25,676	
26	0,000	0,407	7,409	9,763	23,988	5,089	0,441	0,185	0,387	31,096	25,825	
27	1,445	0,400	6,179	16,263	33,340	8,226	4,542	18,275	0,136	19,888	25,919	
28	2,961	0,092	2,212	10,527	0,021	7,006	3,801	0,032	14,562	16,262	30,821	
29	3,947	9,866	3,699	39,724	31,693	5,866	0,238	9,459	25,416	10,297	31,623	
30	16,500	11,561	4,450	16,503	12,641	3,151	4,816	0,034	0,337	1,017	32,030	
31	4,177	11,240	10,806	0,898	27,304	0,154	3,493	0,141	16,312	0,058	32,209	
32	7,220	3,455	2,435	15,770	43,143	0,228	6,366	6,294	1,119	0,510	32,513	
33	1,876	18,290	8,921	14,870	47,403	0,388	4,931	8,549	20,795	0,432	33,338	
34	9,498	8,998	0,258	0,007	22,447	2,310	8,060	18,679	2,565	58,078	35,010	
35	11,911	15,829	3,574	0,003	5,795	21,767	4,497	15,357	9,611	1,172	36,039	
36	2,333	0,011	1,413	29,520	7,448	4,542	6,180	42,405	0,724	32,849	36,330	
37	13,748	9,929	0,058	6,316	48,019	12,317	16,318	11,282	2,946	10,633	37,531	
38	8,806	4,626	74,061	12,306	43,518	4,345	2,508	3,705	0,039	23,813	40,081	
39	0,117	2,585	1,433	0,017	26,048	2,479	0,041	1,276	1,406	1,646	40,833	
40	1,386	3,818	19,679	3,540	17,217	0,346	1,100	20,788	33,491	22,074	41,860	
41	2,848	1,245	14,151	33,499	16,348	2,897	8,575	27,658	1,628	1,423	43,417	
42	3,438	0,035	6,568	0,811	16,164	2,854	4,063	0,155	8,595	73,603	45,645	
43	3,353	14,366	16,569	14,855	0,120	0,000	10,104	19,229	11,135	0,665	48,748	
44	6,950	10,614	14,030	10,755	1,799	0,023	2,897	12,279	1,309	0,005	48,962	
45	6,804	0,225	20,202	22,795	39,146	2,905	8,452	2,544	0,036	4,620	50,063	
46	5,280	1,151	17,322	0,700	21,280	0,008	1,554	12,373	0,000	2,890	50,408	
47	1,705	2,553	3,351	0,009	1,507	7,147	8,303	3,819	0,153	39,515	55,144	
48	12,259	0,376	3,350	23,554	6,466	0,746	0,905	11,852	1,981	61,052	56,546	
49	3,418	1,392	4,187	24,110	6,969	2,837	4,405	2,159	1,508	21,568	65,623	
50	5,960	2,069	7,939	30,172	7,847	5,118	1,334	0,224	9,496	13,284	67,670	
51	4,612	8,015	19,759	0,797	0,319	0,061	1,446	3,411	9,721	24,381	69,587	

8.6. Određivanje antimikrobnog potencijala *in vitro*Tabela 8.18. Efekat Jc-EU-P i PDO na adheziju *L. monocytogenes* i *C. albicans* na HT-29 i HCT116 ćelije

<i>L. monocytogenes</i>				
Jc-EU-P				
	(x10 ⁶ CFU/mL)	Inhibicija adhezije I (%)		
	Ukupan broj	Adherovano (kontrola)	Adherovano (Jc-EU-P)	
HT-29	262±18	58±5	55±4	
% adhezije		22,1	20,9	I=5%
HCT116	130±19	72	67	
% adhezije		55,3	51,5	I=7%
PDO				
	(x10 ⁶ CFU/mL)	Inhibicija adhezije I (%)		
	Ukupan broj	Adherovano (kontrola)	Adherovano (PDO)	
HT-29	262±18	77±14	54±5	
% adhezije		29,3	20,7	I=29%
HCT116	130±19	18,5±2	7±1	
% adhezije		13,7	5,2	I=62%
<i>C. albicans</i>				
Jc-EU-P				
	(x10 ⁶ CFU/mL)	Inhibicija adhezije I (%)		
	Ukupan broj	Adherovano (kontrola)	Adherovano (Jc-EU-P)	
HT-29	246±14	50±3	20±3	
% adhezije		20,3	8,1	I=60%
PDO				
	(x10 ⁶ CFU/mL)	Inhibicija adhezije I (%)		
	Ukupan broj	Adherovano (kontrola)	Adherovano (PDO)	
HT-29	246±14	40±2	112±9	
% adhezije		16,2	45,5	I= -180%

8.7. Antibakterijski efekat različitih vinskih marinada prema inokulisanoj *L. monocytogenes* na junećem mesu

Tabela 8.19. Preliminarni rezultati senzorne analize

Jc-EU-K						
Koncentracije	2xMIK=1%	1xMIK=0,5%	1/2xMIK=0,25%	1/4xMIK=0,125%	1/8xMIK=0,062%	1/16xMIK=0,031%
	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus
	-/-	+/-	-/+	-/+	+/+	+/+
	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+
	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+
	-/-	+/-	-/+	-/+	+/+	+/+
	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+
Sm-EU						
Koncentracije	2xMIK=1%	1xMIK=0,5%	1/2xMIK=0,25%	1/4xMIK=0,125%	1/8xMIK=0,062%	1/16xMIK=0,031%
	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus
	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	+/-
	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+
	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/-
	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+
	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+
Jc-EU-K+ Sm-EU (2:1)						
Koncentracije	0,0625%+0,031%	0,125%+0,062%	0,25%+0,125%	0,5%+0,25%		
	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus	miris/ukus		
	+/+	+/+	+/+	+/-		
	+/+	+/+	+/+	-/-		
	+/+	+/+	+/+	-/-		
	+/+	+/+	+/+	-/+		
	+/+	+/+	+/+	-/-		

Prihvatljivost mirisa i ukusa označena je znakom „+“, a neprihvatljivost znakom „-“.

Najpre su analizirani miris i ukus pojedinačno dodatih etarskih ulja u vino i odbarane maksimalne koncentracije svakog od agenasa koje se mogu kombinovati – na osnovu toga je izabrano da odnos agenasa u marinadi bude Jc-EU-K:SM-EU = 2:1.

Tabela 8.20. Efekat različitih vinskih marinada na broj *L. monocytogenes* ATCC 19111

	-1. dan	0. dan	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	9. dan	11. dan	13. dan	15. dan
NaCl	5,0±0,00	5,24±0,15	5,44±0,19	5,65±0,27	6,09±0,22	6,59±0,24	6,77±0,25	6,84±0,26	7,11±0,33	7,04±0,31
VM	5,0±0,00	3,61±0,20	3,82±0,15	3,59±0,19	4,19±0,21	4,14±0,16	4,25±0,25	4,07±0,21	4,73±0,18	4,59±0,22
VM+J	5,0±0,00	3,71±0,18	3,47±0,22	3,30±0,22	3,46±0,25	3,32±0,18	3,28±0,21	3,44±0,18	3,57±0,23	3,04±0,26
VM+S	5,0±0,00	3,55±0,21	3,22±0,20	3,49±0,28	3,22±0,27	3,10±0,16	3,36±0,24	2,98±0,18	3,42±0,21	2,80±0,24
VM+JS	5,0±0,00	3,32±0,19	3,14±0,17	2,83±0,14	2,43±0,15	2,15±0,16	2,70±0,11	2,68±0,15	2,55±0,14	2,45±0,17

Broj bakterija je izražen u log CFU/g.

Tabela 8.21. Efekat različitih vinskih marinada na broj LMB izolata

	-1. dan	0. dan	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	9. dan	11. dan	13. dan	15. dan
NaCl	5,0±0,00	5,12±0,25	5,87±0,27	6,03±0,26	6,82±0,35	7,19±0,38	7,26±0,32	7,56±0,37	7,43±0,40	7,26±0,30
VM	5,0±0,00	3,72±0,28	4,21±0,23	4,08±0,20	3,96±0,27	4,11±0,28	4,08±0,26	4,14±0,30	4,25±0,23	4,34±0,21
VM+J	5,0±0,00	3,27±0,26	4,13±0,18	3,81±0,22	3,77±0,22	3,79±0,21	3,80±0,21	3,96±0,24	2,96±0,21	2,36±0,21
VM+S	5,0±0,00	3,43±0,19	4,10±0,18	4,07±0,19	4,09±0,21	4,23±0,20	3,48±0,20	3,56±0,23	2,72±0,20	3,28±0,23
VM+JS	5,0±0,00	3,62±0,23	3,92±0,19	3,58±0,26	3,74±0,23	3,35±0,20	3,29±0,27	2,74±0,22	2,64±0,19	2,98±0,22

Broj bakterija je izražen u log CFU/g.

Tabela 8.22. Efekat različitih vinskih marinada na ukupan broj AHMB

	-1. dan	0. dan	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	9. dan	11. dan	13. dan	15. dan
NaCl	5,2±0,24	5,67±0,21	5,96±0,22	7,11±0,20	7,53±0,31	7,30±0,35	8,32±0,22	8,74±0,24	8,71±0,21	8,39±0,40
VM	5,2±0,24	3,82±0,22	4,30±0,19	4,41±0,22	4,83±0,27	4,59±0,32	5,36±0,22	4,99±0,23	6,05±0,30	6,01±0,20
VM+J	5,2±0,24	3,40±0,20	3,74±0,19	3,99±0,20	4,18±0,27	4,04±0,23	4,16±0,19	4,31±0,23	4,59±0,27	4,06±0,24
VM+S	5,2±0,24	3,12±0,23	3,53±0,27	3,14±0,24	3,62±0,27	3,85±0,24	3,98±0,19	4,11±0,33	4,39±0,30	4,09±0,24
VM+JS	5,2±0,24	2,77±0,14	2,69±0,1	3,09±0,19	2,82±0,15	3,03±0,18	3,24±0,19	3,29±0,15	3,63±0,19	3,35±0,22

Broj bakterija je izražen u log CFU/g.

Tabela 8.23. Efekat različitih vinskih marinada na broj ENT

	-1. dan	0. dan	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	9. dan	11. dan	13. dan	15. dan
NaCl	2,5±0,22	3,22±0,29	4,13±0,24	4,37±0,20	5,35±0,22	5,82±0,30	6,72±0,26	6,88±0,29	6,95±0,23	7,29±0,24
VM	2,5±0,22	2,23±0,19	2,80±0,21	3,18±0,21	3,71±0,20	4,06±0,29	4,34±0,33	4,23±0,25	3,87±0,23	4,01±0,27
VM+J	2,5±0,22	2,05±0,12	2,65±0,21	3,05±0,12	3,20±0,25	3,39±0,26	3,58±0,24	2,92±0,17	2,96±0,21	2,80±0,26
VM+S	2,5±0,22	2,36±0,20	2,46±0,15	2,54±0,22	2,85±0,13	3,11±0,28	3,22±0,26	2,70±0,27	2,75±0,21	2,95±0,24
VM+JS	2,5±0,22	2,00±0,00	2,38±0,13	2,74±0,18	2,43±0,24	2,61±0,22	2,59±0,22	2,93±0,26	2,82±0,19	2,18±0,21

Broj bakterija je izražen u log CFU/g.

*- broj ispod granice detekcije

Tabela 8.24. Efekat različitih vinskih marinada na broj BMK

	-1. dan	0. dan	1. dan	3. dan	5. dan	7. dan	9. dan	11. dan	13. dan	15. dan
NaCl	2,8±0,21	3,23±0,28	3,56±0,25	3,87±0,13	4,23±0,21	4,29±0,22	4,54±0,30	4,93±0,21	5,09±0,23	5,59±0,21
VM	2,8±0,21	2,35±0,23	2,46±0,23	2,53±0,18	2,87±0,17	3,18±0,21	3,34±0,26	3,33±0,29	3,99±0,24	3,53±0,17
VM+J	2,8±0,21	2,20±0,16	2,50±0,20	2,72±0,16	2,18±0,21	2,93±0,26	2,29±0,23	2,98±0,17	3,05±0,12	2,94±0,27
VM+S	2,8±0,21	2,10±0,15	2,13±0,21	2,57±0,19	2,34±0,19	2,76±0,21	2,39±0,21	2,61±0,25	2,74±0,26	2,59±0,22
VM+JS	2,8±0,21	2,05±0,12	2,15±0,16	2,34±0,19	2,46±0,24	2,40±0,25	2,45±0,26	2,36±0,21	2,05±0,12	2,00±0,00*

Broj bakterija je izražen u log CFU/g.

*- broj ispod granice detekcije

BIOGRAFIJA

Bojana P. Vasiljević (rođ. Jovanović) rođena je 13.06.1985. godine u Užicu. Osnovnu i srednju školu završila je u Arilju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/2005. godine, studijska grupa Biologija, a diplomirala je 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,59 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Na istom fakultetu školske 2013/2014. godine upisala je doktorske akademske studije, studijska grupa Biologija, modul Biologija mikroorganizama. Od 2013. godine angažovana je kao istraživač-pripravnik a od 2016. kao istraživač saradnik na projektu „Biološki aktivni prirodni proizvodi kao potencijalni izvori novih lekova i dijetetskih suplemenata“, (OI 172058) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Od školske 2013/2014. godine uključena je u praktičnu nastavu na Katedri za mikrobiologiju na predmetima Mikrobiologija, Mikrobiološki praktikum i Metode u mikrobiologiji, a takođe je saradnik u Istraživačkoj stanici Petnica, Valjevo. Bojana P. Vasiljević je član Srpskog biološkog društva, Udruženja mikrobiologa Srbije, Društva genetičara Srbije i Federacije evropskih mikrobioloških društava (FEMS). Dobitnica je FEMS stipendije za učešće na Sedmom kongresu evropskih mikrobiologa održanom 2017. godine u Valensiji, Španija. Do sada je objavila šest naučnih radova od kojih su tri iz kategorije M21a, jedan iz kategorije M22, jedan iz kategorije M23 i jedan iz kategorije M24. Takođe je učestvovala sa 24 saopštenja na naučnim skupovima, u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бојана П. Василијевић

број индекса Б3045/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хемијска карактеризација, антимикуробна и цитотоксична активност етарског уља и постдестилационог остатка клеке (*Juniperus communis* L.) и њихово комбиновано деловање са конвенционалним антибиотицима и цитостатицима

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.11.2020.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бојана П. Василијевић

Број индекса Б3045/2013

Студијски програм Биологија

Наслов рада Хемијска карактеризација, антимикуробна и цитотоксична активност етарског уља и постдестилационог остатка клеке (*Juniperus communis* L.) и њихово комбиновано деловање са конвенционалним антибиотицима и цитостатицима

Ментор Проф. др Биљана Николић

Потписани/а Бојана П. Василијевић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.11.2020.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Хемијска карактеризација, антимикуробна и цитотоксична активност етарског уља и постдестилационог остатка клеке (*Juniperus communis* L.) и њихово комбиновано деловање са конвенционалним антибиотицима и цитостатицима

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 30.11.2020.



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