

Antibakterijski, citotoksični i antioksidativni učinakbenzoksantenskih lignana

Žuna, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:048952>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Kristina Žuna
1029/MB

**ANTIBAKTERIJSKI,
CITOTOKSIČNI I
ANTIOKSIDATIVNI UČINAK
BENZOKSANTENSKIH LIGNANA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Ane Huđek, mag. ing. biotechn.

ZAHVALA

Neizmjerno sam zahvalna mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo na stručnom vodstvu, razumijevanju i dijeljenju savjeta tijekom izrade ovog rada. Posebnu zahvalu upućujem i asistentici Ani Huđek, mag. ing. biotechn., na pomoći kod provođenja eksperimenata i statističke obrade podataka. Voljela bih se zahvaliti i dr. sc. Marijani Radić Stojković na doprinosu i pomoći kod pisanja stručne terminologije.

Za kraj se želim zahvaliti i svojoj obitelji, dečku Mariju i prijateljima koji su me uvelike podržavali, ohrabrivali i uveseljavali tijekom cijelog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ANTIBAKTERIJSKI, CITOTOKSIČNI I ANTIOKSIDATIVNI UČINAK BENZOKSANTENSKIH LIGNANA

Kristina Žuna, 1029/MB

Sažetak: Benzoksantenski lignani su prirodni spojevi koji su dosad u manjem broju izolirani iz različitih biljaka te se o njihovom biološkom djelovanju ne zna mnogo. Mogu se dobiti i kemijskom sintezom, a u ovom radu su ispitivani antibakterijski, citotoksični i antioksidativni učinci osam benzoksantenskih lignana dobivenih oksidativnim vezanjem kafeinske kiseline i metil kafeata. Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da benzoksantenski lignani u koncentracijama od 0,5 i 0,05 mmol L⁻¹ pokazuju značajni antibakterijski učinak na Gram pozitivne bakterije. Također, svi spojevi osim jednog su pokazali značajan citotoksični učinak na stanice humanog karcinoma jetre u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹ te je dokazana važnost bočnih fenilnih i slobodnih hidroksilnih skupina u njihovoj strukturi za učinkovito inhibiranje rasta tumorskih stanica. Značajan antioksidativni učinak su pokazali svi ispitivani benzoksantenski lignani u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹, a za antioksidativno djelovanje su bili odgovorni spojevi sa slobodnim hidroksilnim skupinama na položajima 6, 9 i 10 C atoma.

Ključne riječi: benzoksantenski lignani, antibakterijski učinak, humana stanična linija, citotoksičnost, antioksidativni učinak

Rad sadrži: 65 stranica, 18 slika, 11 tablica, 60 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Ksenija Durgo*

Pomoć pri izradi: *Ana Huđek, mag. ing. biotechn.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Blaženka Kos*
2. Prof.dr.sc. *Ksenija Durgo*
3. Dr.sc. *Marijana Radić Stojković*, viši znan. sur. (Institut Ruđer Bošković, Zagreb)
4. Prof.dr.sc. *Višnja Bačun-Družina* (zamjena)

Datum obrane: 20. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ANTIBACTERIAL, CITOTOXIC AND ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF BENZOXANTHENE LIGNANS

Kristina Žuna, 1029/MB

Abstract: Benzoxanthene lignans are natural compounds that have been isolated from various plants, but not very much is known about their biological activity. This study investigated the antibacterial, cytotoxic and antioxidant effects of eight different benzoxanthene lignans synthesized by oxidative coupling of caffeic acid and methyl caffeate. Results showed that all benzoxanthene lignans exhibited significant antibacterial effects against Gram positive bacteria at concentrations of 0,5 and 0,05 mmol L⁻¹. Seven of them showed significant cytotoxic effects on human liver cancer cells at a concentration of 0,05 mmol L⁻¹, with phenyl and hydroxyl groups in the structure being responsible for their effective tumor cell growth inhibition. All benzoxanthene lignans showed significant antioxidative effects at a concentration of 0,05 mmol L⁻¹. C-6, C-9 and C-10 hydroxyl groups were proven to be important for such antioxidative activity.

Keywords: benzoxanthene lignans, antibacterial effect, human cell line, cytotoxicity, antioxidative effect

Thesis contains: 65 pages, 18 figures, 11 tables, 60 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Ksenija Durgo, Full Professor*

Technical support and assistance: *Ana Huđek, mag. ing. biotechn., Scientific Assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
3. PhD. *Marijana Radić Stojković*, Senior Research Associate (Ruđer Bošković Institute, Zagreb)
4. PhD. *Višnja Bačun-Družina*, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 20th, 2019.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BENZOKSANTENSKI LIGNANI	2
2.1.1. Sinteza benzoksantenskih lignana	3
2.1.2. Biološka aktivnost benzoksantenskih lignana	4
2.2. MEHANIZMI DJELOVANJA ANTIBIOTIKA	5
2.3. KARAKTERISTIKE STANIČNIH STIJENKI BAKTERIJA	6
2.3.1. Gram negativne bakterije	6
2.3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	7
2.3.1.2. <i>Salmonella enterica serotip Typhimurium</i>	8
2.3.1.3. <i>Salmonella enterica serotip Typhimurium TA100</i>	9
2.3.2. Gram pozitivne bakterije	9
2.3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.3.2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	11
2.3.2.3. <i>Lactobacillus fermentum</i>	12
2.4. KARAKTERISTIKE STANIČNE MEMBRANE SISAVACA	12
2.5. OKSIDATIVNI STRES	13
2.6. TESTIRANJE NOVOSINTETIZIRANIH SPOJEVA	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Biološki test sustavi	16
3.1.1.1. <i>Radni mikroorganizmi</i>	16
3.1.1.2. <i>Humane stanice</i>	17
3.1.2. Hranjive podloge	17
3.1.3. Otopine korištene za potrebu eksperimenata	19
3.1.3.1. <i>Otopine benzoksantenskih lignana</i>	19
3.1.3.2. <i>Fosfatni pufer</i>	22
3.1.4. Laboratorijska oprema	22
3.1.4.1. <i>Pribor</i>	22
3.1.4.2. <i>Kemikalije</i>	23
3.1.4.3. <i>Aparatura</i>	24
3.1.5. Računalni programi	24
3.2. METODE	25
3.2.1. Ispitivanje antibakterijskog učinka benzoksantenskih lignana difuzijskim testom	25
3.2.2. Citotoksični učinak benzoksantenskih lignana	25
3.2.3. Ispitivanje promjene hidrofobnosti bakterijskih staničnih stijenki SAT (eng. <i>Salt Aggregation Test</i>) testom	26
3.2.4. Ispitivanje citotoksičnosti benzoksantenskih lignana NR metodom na kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2)	27
3.2.5. Ispitivanje antioksidativnog učinka benzoksantenskih lignana DCFH-DA metodom	28
3.2.6. Statistička obrada podataka	29

4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKOG UČINKA BENZOKSANTENSKIH LIGNANA DIFUZIJSKIM TESTOM	30
4.2. CITOTOKSIČNI UČINAK BENZOKSANTENSKIH LIGNANA.....	33
4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	33
4.2.2. <i>Salmonella enterica</i> serotip Typhimurium.....	35
4.2.3. <i>Salmonella enterica</i> serotip Typhimurium TA100	37
4.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4.2.5. <i>Lactobacillus plantarum</i>	40
4.2.6. <i>Lactobacillus fermentum</i>	42
4.3. ISPITIVANJE PROMJENE HIDROFOBNOСТИ BAKTERIJSKIH STANIČNIH STIJENKI SAT (eng. <i>Salt Aggregation Test</i>) TESTOM.....	44
4.4. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI BENZOKSANTENSKIH LIGNANA NR METODOM NA HUMANOJ STANIČNOJ LINIJI HEPATOCELULARNOG KARCINOMA (HepG2).....	49
4.5. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG UČINKA BENZOKSANTENSKIH LIGNANA DCHF-DA METODOM	54
5. ZAKLJUČCI.....	59
6. LITERATURA	60

1. UVOD

Sve češća pojava bakterijske rezistencije na antibiotike predstavlja veliku prijetnju zdravlju ljudi, životinja i okoliša. Iako bakterije oduvijek imaju sposobnost razvijanja rezistencije na određene antibiotike, ta je pojava učestalija upravo zbog neodgovornog i neopravdanog korištenja antibiotika u ljudskoj medicini, sve bržeg rasta ljudske populacije, globalnih migracija, loših rješenja za zbrinjavanje medicinskog otpada i korištenja antibiotika u prehrani stoke.

Zlatna era antibiotika, u kojoj se otkrilo najviše antibiotika koji se i danas koriste, završila je zato što broj otkrivenih novih spojeva nije mogao pratiti sve veći rast broja patogenih bakterijskih sojeva, posebno Gram negativnih (1). Posljedično tome, danas se istražuju mnogi spojevi izolirani iz biljaka ili sintetizirani po uzoru na spojeve izolirane iz biljaka kao mogući potencijalni antimikrobni agensi. Takvi su i lignani, spojevi koji se nalaze u sjemenkama, korijenju, lišću ili kori biljaka, a posjeduju mnoga ljekovita svojstva (2). Benzoksantenskih lignana izoliranih iz prirode nema mnogo (3), ali se oni mogu sintetizirati metodama oksidativnog vezanja fenetilnog estera kafeinske kiseline i metil kafeata (4).

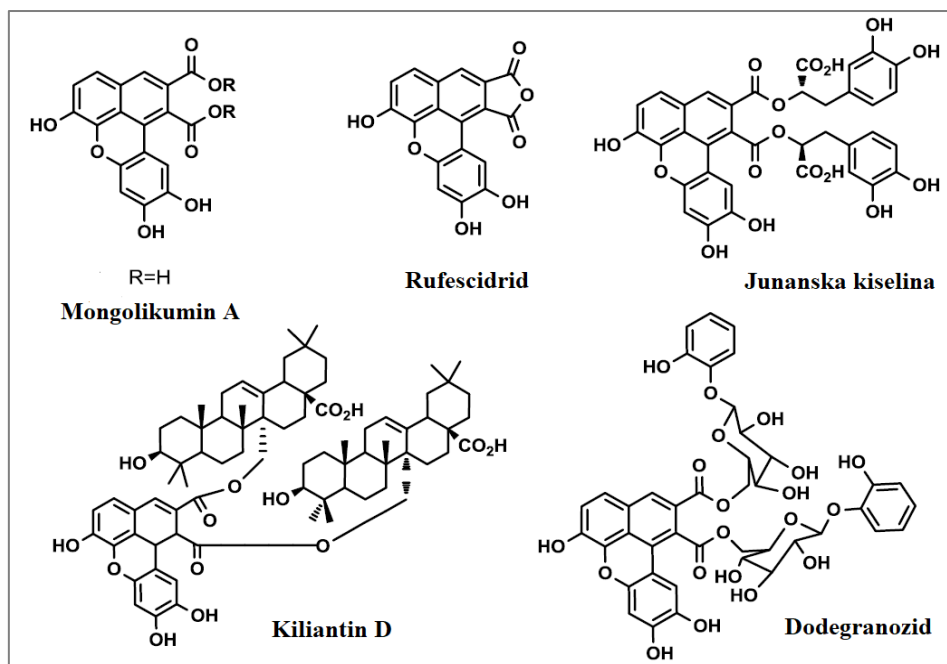
U ovom radu je ispitan antibakterijski učinak osam različitih umjetno sintetiziranih benzoksantenskih lignana na Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, uz hipotezu da je glavna prepreka antibakterijskom djelovanju tih spojeva upravo stanična stijenka, posebno kod Gram negativnih bakterija. Gram pozitivne bakterije korištene u radu su *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus plantarum*, a Gram negativne *Escherichia coli* K-12 MG1655 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium LT21. Osim toga, ispitan je i citotoksični te antioksidativni učinak tih spojeva na humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2) jer je dokazano da su benzoksantenski lignani zbog svoje planarne konjugirane strukture DNA interkalirajući agensi, a u polarnim i nepolarnim otapalima mogu reagirati s peroksidnim radikalima. Kako su mnogi protutumorski agensi izolirani iz prirodnih izvora, ili sintetizirani po uzoru na njih, i benzoksantenski lignani bi zbog svojih svojstava mogli biti učinkoviti protutumorski lijekovi (3).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BENZOKSANTENSKI LIGNANI

Lignani čine veliku skupinu spojeva nađenih u prirodi, posebice u raznim dijelovima biljaka, poput korijena, stabljike, kore, lišća, sjemenki i plodova. To su sekundarni metaboliti koji biljkama pretežno služe u obrani od nametnika, a posjeduju antibakterijska, antimikotička i insekticidna svojstva. Osim toga, posjeduju i antikancerogena, antioksidativna, protuupalna i antiviralna svojstva zbog mogu biti farmakološki značajni. Zanimljivo je da su lignani enterolaktoni i enterodioli nađeni i u sisavcima, ali su to zapravo metabolički nusprodukti razgradnje lignana koji potječu od konzumiranih biljaka.

Biosinteza lignana se odvija šikimatskim putem, u kojem se sparuju dvije fenilpropanske jedinice (2). Različitost u strukturama između lignana te njihova biološka aktivnost ih čini zanimljivima za modificiranje dodatkom različitih kemijskih skupina. Na taj način dobiveni su i benzoksantenski lignani, spojevi s izrazito konjugiranom i fluorescirajućom jezgrom, koji su inače veoma rijetki u prirodi. Do sada je nađeno samo 5 različitih lignana, a to su rufescidrid iz biljaka *Cordia rufescens* i *Taraxum monglocium*, junanska kiselina iz biljke *Salvia yunnanensis*, mongolikumin A iz biljke *Taraxum mongloicum*, kiliantin D iz biljke *Rhoiptelea chiliantha* te dodegranozid iz biljke *Dodecadenia grandiflora* (3), a prikazani su na slici 1.



Slika 1. Prikaz molekularne strukture benzoksantenskih lignana izoliranih iz prirode (prilagođeno prema Pulvirenti, 2017).

2.1.1. Sinteza benzoksantenskih lignana

Imitiranjem prirodnih metaboličkih puteva sinteze, uz pomoć spojeva također nađenih u prirodi, mogu se dobiti „neprirodni“ produkti, strukturno slični prirodnim spojevima, ali s mogućnošću dodatka određenih kemijskih skupina i s nešto izmijenjenim svojstvima.

Benzoksantenski lignani se mogu sintetizirati metodama oksidativnog vezanja fenetilnog estera kafeinske kiseline i metil kafeata. Fenetilni ester kafeinske kiseline je spoj prirodno dobiven iz propolisa te posjeduje protuupalna, antioksidativna i antikancerogena svojstva. Reakcija ima najviši prinos kada se provodi uz manganov (III) acetat ($Mn(OAc)_3$) kao oksidacijsko sredstvo, u otopini triklormetana ($CHCl_3$). Dva produkta koja se dobiju ovom reakcijom su benzoksantenski lignan, kao glavni produkt, te lignan s arildihidronaftalenskom bazom, kao sporedni produkt. Međutim, sporedni produkt je veoma važan za validaciju ove reakcije jer se prirodno može naći u biljci *Salvia yunnanensis*, iz koje je izolirana i junanska kiselina koja spada u skupinu benzoksantenskih lignana. To znači da je postupak sinteze benzoksantenskih lignana u prirodi veoma sličan kemijskoj sintezi u laboratoriju, i da bi tako dobiveni produkti zapravo mogli biti prirodni spojevi, ali koji još nisu izolirani iz prirodnih izvora (4).

Također, svi benzoksantenski lignani dobiveni ovakvom sintezom fluoresciraju pod utjecajem UV svjetla valne duljine 366 nm, u otopinama i u čvrstom agregatnom stanju. Zbog toga bi u budućnosti mogli poslužiti kao fluorescentne sonde za biomedicinsku primjenu (5).

2.1.2. Biološka aktivnost benzoksantenskih lignana

S obzirom na to da su benzoksantenski lignani rijetko nađeni u prirodi, o njima se malo zna, pa su i njihova biološka svojstva gotovo neistražena. Jedino rufescidrid, jedan od benzoksantenskih lignana izoliranih iz prirode, dokazano ima antibakterijsku aktivnost. Zbog toga se postavlja pitanje kakva biološka svojstva imaju benzoksantenski lignani dobiveni opisanom sintezom, posebno zato što se pretpostavlja da prirodni benzoksantenski lignani, kao sekundarni metaboliti, imaju ulogu u zaštiti biljaka od infekcija mikroorganizmima.

Dosadašnjim istraživanjima toksičnosti benzoksantenskih lignana na Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama nije dokazana značajna antibiotska aktivnost. Međutim, zamijećena je značajna antimikotička aktivnost kada je toksičnost benzoksantenskih lignana ispitivana na 20 različitih sojeva gljivice roda *Candida*, posebno kod spojeva koji su imali kateholnu skupinu (3).

Također, zbog toga što su mnogi protutumorski agensi zapravo sintetički derivati prirodnih spojeva, benzoksantenski lignani bi mogli biti dobri kandidati za učinkovite protutumorske lijekove, stoga su ispitivani njihovi antiproliferativni učinci te mogućnost vezanja na molekulu DNA. Pokazano je da se poliaromatski dio molekule veže između parova baza, a bočne kemijske skupine se vežu na deoksiriboze u okosnici lanca DNA. Bočne feniletilne skupine određenih benzoksantenskih lignana su Van der Waalsovima silama dodatno stabilizirale vezanje u manje utore u molekuli DNA. Također, spojevi s bočnim metoksi skupinama nisu mogli tvoriti vodikove veze s DNA što je smanjilo njihov antiproliferativni učinak, a spojevi s acetilnim bočnim skupinama su imali veći afinitet za vezanje na DNA zbog formiranja vodikovih veza s nukleotidima.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da su benzoksantenski lignani zapravo DNA interkalirajući agensi, a zbog konjugirane strukture bi mogli djelovati i na stabilizaciju G-

kvadrupleksa (3). G-kvadrupleks je sekvenca DNA koja je bogata gvaninom što omogućuje formiranje četverolančane strukture koja se naziva kvadrupleks ili tetrada. Do sada se zna da se takve strukture većinom nalaze u regijama uzvodno od promotora te kao takve mogu utjecati na gensku ekspresiju odnosno proces transkripcije određenog gena. G-kvadrupleksi se nalaze i u regijama na krajevima telomeraza, a geni koji se tu nalaze kodiraju za proteine s glavnim ulogama u procesima koji su bitni za stanični ciklus, odnosno proliferaciju stanica. Stabilizacija G-kvadrupleksa bi mogla dovesti do smanjenja aktivnosti telomeraza, posebno u tumorskim stanicama gdje je telomerazna aktivnost visoka, stoga bi benzoksantenski lignani mogli utjecati na smanjenje aktivnosti telomeraza i uzrokovati apoptozu tumorskih stanica (5).

2.2. MEHANIZMI DJELOVANJA ANTIBIOTIKA

Antibiotici su spojevi koji induciraju smrt stanica mikroorganizama ili tumora putem različitih mehanizama djelovanja. S obzirom na to da su to često kompleksne organske molekule koje su različite po građi, biološkom djelovanju i kemijskim svojstvima, ne postoji standardni način podjele. Prema tome, antibiotike dijelimo u kategorije sukladno biološkom podrijetlu, kemijskoj strukturi, načinu i spektru djelovanja te mehaničkom putu biosinteze.

Prema spektru djelovanja, antibiotici se mogu podijeliti na antibakterijske i antifungalne antibiotike, citostatike te antibiotike koji inhibiraju rast ameba. Antibakterijski antibiotici mogu biti uskog spektra djelovanja, odnosno aktivni protiv Gram pozitivnih bakterija, ili širokog spektra djelovanja, aktivni protiv Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija (6).

Prema mehanizmu djelovanja antibiotici se mogu podijeliti na:

- antibiotike koji oštećuju staničnu membranu,
- antibiotike koji inhibiraju sintezu stanične stijenke, proteina, nukleinskih kiselina ili purina i pirimidina,
- antibiotike koji inhibiraju proces oksidativne fosforilacije,
- antibiotike koji inhibiraju staničnu respiraciju,
- antibiotike koji djeluju antimetabolički prema aminokiselinama, nukleinskim kiselinama i vitaminima.

Antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina su primjerice tetraciklini i aminoglikozidi koji utječu na aktivnost 30S podjedinice ribosoma ili kloramfenikol, makrolidi i oksazolidinoni koji utječu na rad 50S podjedinice ribosoma. Na replikaciju stanične DNA mogu utjecati fluorokinoloni koji inhibiraju enzime DNA girazu i topoizomerazu. Dokazano je da u Gram pozitivnim bakterijama fluorokinoloni inhibiraju topoizomerazu TopoIV, a u Gram negativnim bakterijama primarno inhibiraju DNA girazu. Antibiotici koji inhibiraju sintezu stanične stijenke su primjerice beta-laktamski antibiotici i glikopeptidi koji djeluju na sintezu peptidoglikanskog sloja (7).

2.3. KARAKTERISTIKE STANIČNIH STIJENKI BAKTERIJA

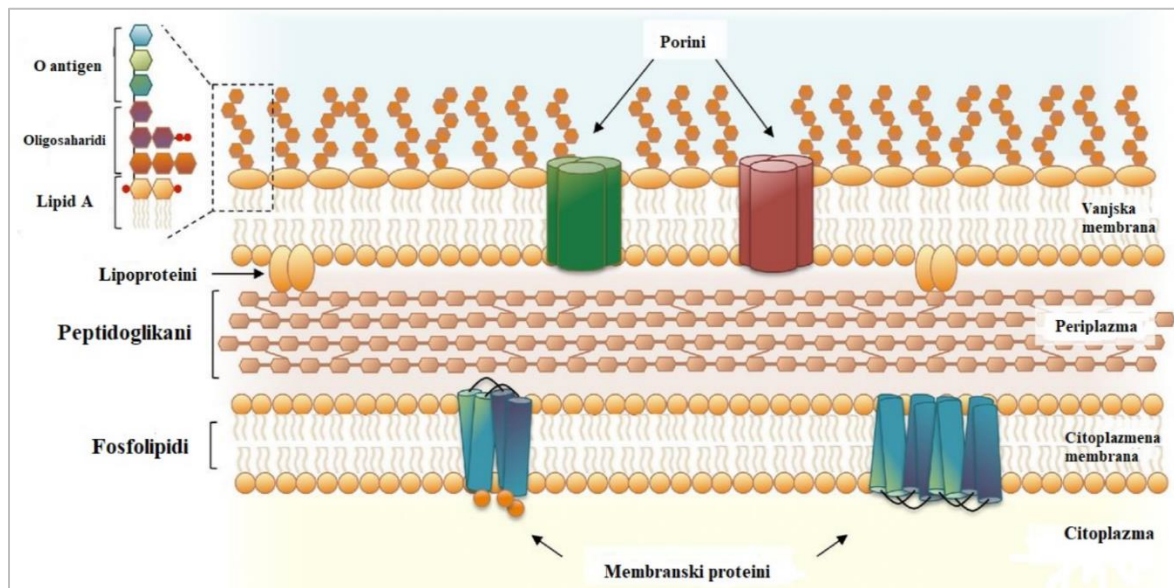
Rezistencija na antibiotike predstavlja sve veći problem u modernom svijetu, a najčešće su za to odgovorne Gram negativne bakterije. One posjeduju više mehanizama kojima mogu razviti otpornost na antibiotike, a to su promjene propusnosti stanične stijenke, efluks pumpe, strukturalne promjene veznih mjesta, razgradnja antibiotika određenim enzimima i inaktivacija antibiotika modifikacijom njegove kemijske strukture (8).

2.3.1. Gram negativne bakterije

Struktura stanične stijenke Gram negativnih bakterija se sastoji od tri dijela: vanjske membrane, citoplazmatske ili unutarnje membrane te središnjeg peptidoglikanskog sloja ili periplazme (9). Vanjska membrana je prva prepreka prolasku različitih molekula kroz staničnu barijeru i sastoji se od fosfolipida, lipopolisaharida te specifičnih i nespecifičnih propusnih kanala poput porina, kroz koje mogu proći hidrofilne molekule veličine do 600 Da. Pretpostavka je da veće hidrofobne molekule mogu proći kroz vanjsku membranu spontanom difuzijom, koja se odvija veoma sporo (10).

Lipopolisaharidni sloj vanjske membrane, koji se razlikuje između sojeva pojedinih bakterija, se sastoji od tri komponente: lipida A na kojeg su vezani lanci oligosaharida te naposljetku O antigeni, koji određuju razlike između pojedinih serotipova bakterijskih vrsta. Peptidoglikanski sloj se sastoji od linearnih polimera peptidoglikana (mureina) koji su građeni od polisaharida N-acetilglukozamina i N-acetilmuraminske kiseline te proteinskog dijela kojeg mogu činiti alanin, lizin, glutaminska kiselina ili diaminopimelinska kiselina (11).

Patogeni sojevi bakterija uglavnom imaju i kapsulu ili čahuru. Ona je ionskim vezama pričvršćena za staničnu stijenku bakterije te je građena od vode, polipeptida i polisaharida, poput celuloze, dekstrana, aminošećera ili monosaharida. Čahura je često odgovorna za otpornost i virulentnost bakterijske stanice te služi kao rezervni izvor hrane, a može je zaštititi od isušivanja i napada bakteriofaga. Slikoviti prikaz strukture stanične stijenke Gram negativnih bakterija je prikazan na slici 2.



Slika 2. Prikaz strukture stanične stijenke Gram negativnih bakterija (prilagođeno prema Auer i Weibel, 2017).

Neke od medicinski najznačajnijih Gram negativnih bakterija su one iz porodice *Enterobacteriaceae*, u koje spadaju i bakterije *E. coli* te *S. enterica*.

2.3.1.1. *Escherichia coli*

E. coli je fakultativno anaerobna štapičasta bakterija koja spada u razred *Gammaproteobacteria*, i jedan je od najproučavanijih organizama. Tipično živi u crijevima toplokrvnih životinja te za domaćina može biti korisna, ali i patogena. Može uzrokovati infekcije mokraćnog mjehura, neonatalni meningitis te sepsu (12).

Iako postoji više sojeva bakterije *E. coli*, struktura vanjskog sloja stanične stijenke je među njima velikim dijelom konzervirana. Zbog negativno nabijenih fosfatnih skupina molekule

lipopolisaharidnog sloja mogu međusobno tvoriti elektrostatske veze uz pomoć magnezijevih i kalcijevih kationa.

Upravo zbog ovakvog umreženog povezivanja hidrofobne molekule ne mogu prodrijeti kroz vanjski sloj stanične stijenke. Međutim, zbog lipida A može doći do reakcije s nekim hidrofobnim spojevima, što će rezultirati gubitkom integriteta stanične stijenke (13). Do rezistencije bakterije *E. coli* na antibiotike može doći i zbog efluks pumpe AcrAB-TolC, čiji su homolozi prisutni i u ostalim bakterijama porodice *Enterobacteriaceae*, te porina OmpF, OmpC i OmpA, koji dopuštaju prolaz samo hidrofilnim antibioticima veličine do 600 Da (14).

2.3.1.2. *Salmonella enterica* serotip Typhimurium

S. enterica je fakultativno anaerobna štapičasta bakterija koja spada u razred *Gammaproteobacteria* i koja može uzrokovati infekcije gastrointestinalnog trakta te akutni gastroenteritis. *S. enterica* serotip Typhimurium i *Salmonella e.* serotip Typhi mogu uzrokovati i tifus, akutnu bolest čiji su simptomi jaka bol u trbuhu, slabost i visoka temperatura (15), od kojeg godišnje u svijetu umre i do 130 000 ljudi (16), a sve veći problem predstavlja i rezistencija na postojeće antibiotike.

Zamijećeno je povećanje pojave multirezistentnih bakterija vrste *Salmonella enterica* serovar Typhimurium u razdoblju od 2011. do 2016. godine, a one su najčešće tetrarezistentne, odnosno rezistentne na četiri različita antibiotika ampicilin, streptomycin, sulfonamide i tetracikline, ili pentarezistentne, odnosno rezistentne na sve navedene antibiotike uz razvoj rezistencije i na kloramfenikol. Najčešće je zabilježena pojava osjetljivosti na fluorokinolinske antibiotike (17).

Citoplazmatska membrana bakterije *Salmonella* Typhimurium se sastoji od fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerola i kardiolipina (18), ali se rezistencija na antibiotike razvija zbog vanjske membrane visoke relativne molekularne mase. Lipopolisaharidni sloj vanjske membrane se može i modificirati u uvjetima opasnosti, dodatkom palmitola, pozitivno nabijene aminoarabinoze na lipid A ili 2-hidroksilne skupine na jedan od ostataka masnih kiselina. To povećava broj međusobnih interakcija između molekula

lipopolisaharidnog sloja i čini ga nepropusnijim za pozitivno nabijene peptide te velike hidrofobne spojeve (19).

2.3.1.3. *Salmonella enterica* serotip Typhimurium TA100

Soj *S. enterica* serotip Typhimurium TA100 se učestalo koristi u raznim laboratorijskim istraživanjima jer posjeduje mutaciju u histidinskom operonu. Radi se o supstituciji para baza na mjestu hisG46, što čini ovaj soj auksotrofom za histidin. Učestalo se koristi u Ames-ovom testu, za ispitivanje mutagenog potencijala nekog kemijskog spoja, gdje se ispituje mogućnost reverzije mutacije uslijed utjecaja njegovog djelovanja (20).

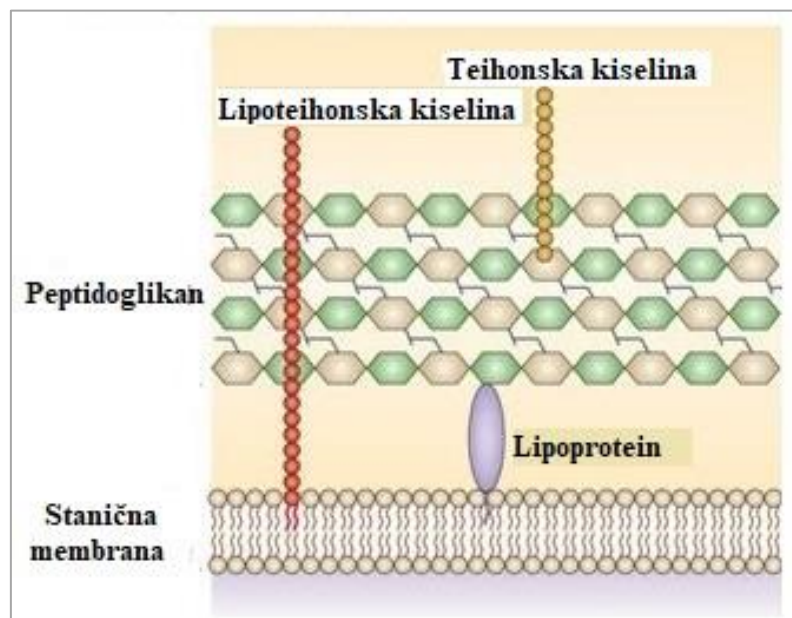
Osim nemogućnosti sintetiziranja histidina, ovaj soj bakterije ima mutaciju u *uvrB* genu, što eliminira mogućnost ekscizijskog popravka oštećene DNA. Također, sadrži i plazmid pKM101, zbog kojeg se povećava učestalost popravaka DNA koji su skloni greškama. Naposljetku, soj *Salmonella* Typhimurium TA100 sadrži i mutaciju u genu *rfa*, što rezultira nefunkcionalnim lipopolisaharidnim slojem u vanjskoj membrani zbog čega će ona biti propusnija za velike molekule, poput hidrofobnih antibiotika (21).

2.3.2. Gram pozitivne bakterije

Za razliku od Gram negativnih, Gram pozitivne bakterije nemaju vanjsku membranu koja sadrži lipopolisaharidni sloj. Zbog toga njihove stijenke sadržavaju deblji sloj peptidoglikana koji ih štiti od negativnih okolišnih čimbenika.

Također, Gram pozitivne bakterije u stijenci sadrže negativno nabijene teihonske kiseline, koje se sastoje od glicerol fosfata, glukozil fosfata ili ribitol fosfata. One se mogu kovalentno vezati na peptidoglikane ili membranske lipide, pa se nazivaju lipoteihonskim kiselinama (22). Od vrste do vrste mogu varirati i imaju brojne uloge, kao što je vezanje metalnih kationa koji stabiliziraju cijelu staničnu stijenku. Interakcija kationa s negativno nabijenim teihonskim kiselinama koje su vezane na peptidoglikane određuje propusnost i poroznost stanične stijenke, kao i načine interakcije s drugim mikroorganizmima ili raznim kemijskim spojevima.

Jedna od glavnih razlika između Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija se ogleda u unakrsnom povezivanju peptidoglikana u membrani. Većina peptidoglikana se u membrani Gram pozitivnih bakterija međusobno povezuje pomoću različitih grananja, dok se u membrani Gram negativnih bakterija peptidoglikani povezuju direktnim vezama između pojedinih aminokiselina (23). Takva razgranata struktura se kod Gram pozitivnih bakterija povezuje s razvojem rezistencije na beta laktamske antibiotike, jer oni djeluju na inaktivaciju transpeptidaza koje kataliziraju reakciju međusobnog povezivanja peptidoglikana. Gram pozitivne bakterije razvijaju rezistenciju na beta laktamske antibiotike modifikacijom funkcije pojedinih transpeptidaza što rezultira nemogućnošću antibiotika da djeluje na integritet membrane (24). Slikoviti prikaz strukture stanične stijenke Gram pozitivnih bakterija je prikazan na slici 3.



Slika 3. Prikaz strukture stanične stijenke Gram pozitivnih bakterija (prilagođeno prema Brown i sur., 2015).

2.3.2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus je bakterija okruglog oblika iz porodice *Micrococcaceae* koja nastanjuje ljudsku kožu i sluznice. Peptidoglikani u njenoj membrani su, između ostalog, umreženi pentaglicinskim ograncima čiju sintezu, u fazi razvoja stanične membrane bakterije, kataliziraju enzimi transpeptidaze, a upravo zbog tog povezivanja su otporniji na djelovanje

pojedinih antibiotika (25). Beta laktamski antibiotici su strukturno slični baznom dijelu peptidoglikana pa ih stoga transpeptidaze prepoznaju kao supstrate. Naime, struktura beta laktamskih antibiotika imitira D-alanil-D-alanin vezu u bazi peptidoglikana. Vežući se na aktivna mjesta transpeptidaza, poništavaju njihovu prvotnu ulogu što može rezultirati slabljenjem stanične membrane ili lizom stanice.

Meticilin rezistentan *S. aureus* eksprimira transpeptidazu PBP2A koja ima veći afinitet za peptidoglikane s pentaglicinskim ograncima, a manji za beta laktamski antibiotik pa time poništava njegovo djelovanje (26).

Površinski proteini adhezini se na membrani bakterije *S. aureus* zadržavaju tvorenjem kovalentnih ili ionskih veza s peptidoglikanima ili ionskih veza s teihonskim kiselinama, ali većina površinskih proteina se zadržava na membrani pomoću tvorenja kovalentnih veza s peptidnim dijelom peptidoglikana. Svi površinski proteini skupa s teihonskom kiselinom sudjeluju u prepoznavanju receptora i vezanju bakterije za komponente izvanstaničnog matriksa, fibrinogen, fibronektin i elastin, a upravo to je prvi korak u kolonizaciji tkiva domaćina (27).

2.3.2.2. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum je štapićasta bakterija mliječne kiseline. Živi u probavnom sustavu čovjeka i životinja, a može ju se naći i u biljkama. Kao probiotički mikroorganizam pruža mnoge prednosti u održavanju zdravlja organizma, poput inhibicije adhezije patogena u debelom crijevu, modulacije imunološkog odgovora te zaštite sluznice od patogena i štetnih utjecaja.

Peptidni dio membranskih peptidoglikana u bakterijama mliječne kiseline ima raspored aminokiselina L-Ala- γ -D-Glu-X-D-Ala, gdje kod bakterije *L. plantarum* X označava mezo-diaminopimeličnu kiselinu. Zbog te kiseline je unakrsno povezivanje peptidoglikana direktno, za razliku od većine Gram pozitivnih bakterija. Postotak ukupno umreženih peptidoglikana je u eksponencijalnoj fazi rasta bakterije *L. plantarum* procijenjen na 37.5%. Peptidoglikani su u membrani ove bakterije također modificirani amidacijom te O- ili N-acetilacijom (28).

Površinski proteini probiotičkih bakterija sudjeluju u kolonizaciji sluznica u probavnom traktu, a mogu stupati u interakcije sa stanicama imunološkog sustava. Za staničnu stijenkku se mogu pričvrstiti kovalentnim ili nekovalentnim vezama, putem lipida ili različitih veznih domena (29).

2.3.2.3. *Lactobacillus fermentum*

L. fermentum je štapićasta bakterija mliječne kiseline koja se smatra probiotičkim mikroorganizmom i često se nalazi u hrani. Iako nije dominantna vrsta u ljudskom probavnom traktu, pruža zdravstvene prednosti u obliku inhibicije rasta patogenih mikroorganizama, modulacije imunološkog sustava i smanjenja koncentracije LDL kolesterola (30).

L. fermentum je u eksponencijalnoj fazi osjetljiv na djelovanje lizozima i litičkih agenasa te stoga ostaje kraće vezan za stijenkku probavnog trakta u usporedbi s drugim vrstama laktobacila što se može objasniti strukturom stanične stijenke. Naime, osnovna struktura je slična strukturi stijenki ostalih vrsta laktobacila, ali peptidoglikani u eksponencijalnoj fazi imaju više O-acetiliranih ostataka. Broj O-acetiliranih peptidoglikana se smanjuje ulaskom bakterije u stacionarnu fazu, što je čini otpornijom na litičko djelovanje lizozima ili drugih molekula (31).

Laktobacili su se dosada generalno pokazali osjetljivima na tetracikline i eritromicin (32, 33).

2.4. KARAKTERISTIKE STANIČNE MEMBRANE SISAVACA

Stanična ili plazma membrana stanica sisavaca je kompleksna i sastoji se od lipidnog dvosloja koji je prožet raznovrsnim proteinima, a osnovna joj je funkcija da služi kao osmotska barijera stanici. Lipidi koji čine dvosloj su pretežno glicerofosfolipidi, glikolipidi i steroli. Omjer proteina i lipida je u staničnoj membrani otprilike 1:40 (34).

Proteini obavljaju mnoge funkcije membrane, kao što su: transport molekula unutar i izvan stanice, primanje signala iz okoline, povezivanje citoskeletona s membranom i mnoge druge. Za lipide se vežu hidrofobnim reakcijama. Stanična membrana nije stacionarna i u

neprestanom je pokretu, a lipidi se kreću lateralnom difuzijom te mogu prelaziti iz sloja u sloj (eng. *flip-flop*) ili se vrtjeti u mjestu rotacijom ili fleksijom. Postoji više načina na koje različite molekule mogu proći kroz staničnu membranu. Lipidni dvosloj je propustan za hidrofobne i manje polarne molekule (poput vode, ugljikovog (IV) dioksida, ureje i glicerola), a nepropustan je za ione te veće polarne molekule. One se u stanicu transportiraju putem membranskih transportnih proteina, porina te proteina prijenosnika (35).

2.5. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres se opisuje kao stanje povišene intracelularne koncentracije slobodnih radikala, odnosno reaktivnih kisikovih vrsta (eng. ROS – *Reactive Oxygen Species*), poput superoksidnog aniona ($O_2^{\bullet -}$), vodikovog peroksida (H_2O_2) ili hidroksil radikala (OH^{\bullet}), i ostalih. Oni nastaju kao nusprodukti staničnog disanja, u procesu oksidacijske fosforilacije koja se odvija u mitohondriju (36).

U reakciji koju katalizira kompleks IV ili citokrom c oksidaza, na molekulu kisika (O_2) se dodaju četiri elektrona i četiri protona, kako bi se reducirala na dvije molekule vode (H_2O). Međutim, u tom procesu kisik može greškom primiti samo tri elektrona čime će doći do stvaranja visokoreaktivnog superoksidnog aniona ($O_2^{\bullet -}$), ali i ostalih reaktivnih kisikovih vrsta (37).

Niske koncentracije slobodnih radikala su stanici potrebne za pravilno odvijanje sljedećih procesa: fosforilacije proteina, aktivacije transkripcijskih faktora, apoptoze i diferencijacije. Kad se njihova koncentracija povisi, tada može doći do oštećenja lipida, proteina i DNA, a njihovo djelovanje se često povezuje s razvojem mnogih bolesti, poput raka, dijabetesa tipa 2, ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti (38).

Reaktivne kisikove vrste oštećuju DNA tako da utječu na pucanje dvostrukih veza, modifikaciju nukleotida i mijenjanje veza između DNA i proteina. Time posljedično dolazi do promjena u staničnom ciklusu i nastanka tumora. Tumorske stanice dokazano konstantno sintetiziraju povišene koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta. Antioksidativni spojevi sudjeluju u poništavanju djelovanja slobodnih radikala što može dovesti do sprječavanja nastanka mutacija ili apoptoze tumorskih stanica (39).

Antioksidativno djelovanje imaju određeni enzimi ili spojevi koji uklanjaju ili smanjuju djelovanje slobodnih radikala, bilo endogenim ili egzogenim putem. Endogeni

antioksidansi mogu biti enzimatski, a to su primjerice enzimi superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze, koji sprječavaju nastanak slobodnih radikala. Neenzimatski endogeni antioksidansi djeluju na reaktivne dušikove vrste i sprječavaju reakcije u kojima sudjeluju slobodni radikali, a to su primjerice vitamin E i beta-karoten. Egzogeni antioksidansi su primjerice vitamini C te fenoli i njihovi derivati (40). No, u određenim uvjetima, pojedini spojevi mogu imati i prooksidativno djelovanje, koje se ogleda u generiranju reaktivnih kisikovih vrsta ili sprječavanju djelovanja antioksidanata (41).

2.6. TESTIRANJE NOVOSINTETIZIRANIH SPOJEVA

Istraživanje i razvoj novih lijekova je dug, opsežan i multidisciplinarni proces koji u zadnje vrijeme postaje sve kompliciraniji i skuplji. Ipak, široka i neopravdana upotreba antibiotika dovodi do sve češćeg razvoja bakterijske rezistencije pa se imperativ prvenstveno stavlja na istraživanje i razvoj novih spojeva koji će imati antibakterijsko djelovanje, a od velike važnosti su i protutumorski lijekovi (42).

Prvi korak u razvoju potencijalnog novog antibiotika je istraživanje u laboratoriju. Nakon sinteze određenog spoja, potrebno ga je testirati na *in vivo* i *in vitro* modelima, ispitati njegovu kinetiku, sposobnost vezanja za razna tkiva te općenitu biološku i farmakološku aktivnost. Kako se uobičajeno sintetizira više spojeva s istom osnovnom strukturom, poslije testiranja je potrebno odabrati jedan ili više spojeva koji su pokazali najveću aktivnost. Tim spojevima je potrebno testirati ljekoviti potencijal, selektivnost, sigurnost, toksičnost, distribuciju u organizmu i drugo. Iako neki spoj može biti biološki veoma učinkovit, može biti kemijski ili metabolički nestabilan ili imati izrazito toksične nuspojave. Zato je sljedeći korak optimizacija tih spojeva, primjerice dodatkom određenih bočnih skupina. Nakon svake promjene u strukturi se odabrani spojevi moraju ponovno testirati na iste načine.

Jednom kad se odabranim spojevima optimiziraju biološka, kemijska i fizikalna svojstva, prelazi se u pretkliničku istraživačku fazu, u kojoj se spojevima ispituju sigurnost, toksičnost, stabilnost, doziranje, alergijske reakcije, iritabilnost, mutagenost, farmakokinetička svojstva i drugo. Ako se dobije odobrenje od nadležne sigurnosne agencije, ulazi se u kliničku fazu, koja se sastoji od 4 pojedinačne podfaze u kojima se započinje testiranje tih spojeva na ljudima. Klinička faza I obično obuhvaća testiranje na 20

do 80 ljudi, klinička faza II na 100 do 300 ljudi, klinička faza III na 100 do 300 ljudi, a klinička faza IV može obuhvaćati testiranja na više od tisuću ljudi. Svaka od tih faza može potrajati godinama, i upravo zbog toga se novi antibiotici ne pojavljuju toliko često na tržištu (43).

Sve više se javlja potreba za razvojem novih laboratorijskih metoda kojima bi se skratilo vrijeme testiranja novih spojeva, posebno kod testiranja na *in vivo* i *in vitro* modelima. Razvijaju se nove tehnologije koje neće zahtijevati čekanje da stanice narastu, već će se njihov rast uz biološko djelovanje spojeva pratiti primjerice biosenzorima, optičkim snimanjem, mikrokanalnim rezonatorima, laserima i drugim brzorastućim tehnologijama. Sve se više prepoznaje i važnost otvorene suradnje među znanstvenicima različitih skupina, kako bi se pospješio protok najnovijih informacija. Takozvana „otvorena znanost“ bi mogla koristiti principe poput „nabave iz mnoštva“ (eng. *crowd-sourcing*), otvorenog nabavljanja podataka (eng. *open-sourcing*) ili otvorenih baza podataka u kojima se može zatražiti upit o pojedinim spojevima koji su u fazi ispitivanja (eng. *open-data*) (44).

Naravno, s novim metodama postoji i potreba za postavljanjem određenih granica između podataka koji će biti dostupni javnosti zbog sigurnosnih razloga, ali sve brži razvoj modernih tehnologija uz sve veću opasnost od razvoja bakterijskih rezistencija na antibiotike upozorava da se stvari moraju promijeniti čim prije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biološki test sustavi

Kao biološki test sustavi u ovom radu su upotrebljavane Gram negativne i Gram pozitivne bakterije te humane stanice.

3.1.1.1. Radni mikroorganizmi

Za potrebe ovog rada su korišteni bakterijski sojevi:

- *Escherichia coli* K-12 MG1655, divlji tip,
- *Salmonella enterica* serotip Typhimurium LT21, divlji tip,
- *Salmonella enterica* serotip Typhimurum TA100, histidinski auksotrof (his⁻),
- *Staphylococcus aureus*, divlji tip,
- *Lactobacillus plantarum*, divlji tip,
- *Lactobacillus fermentum*, divlji tip.

Bakterijski sojevi koji su korišteni u ovom radu su dio zbirke mikroorganizama Laboratorija za genetiku i biologiju mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Svi bakterijski sojevi su čuvani na -80 °C u tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 10 % glicerola. Neposredno prije eksperimenta je 100 μL pojedinog bakterijskog soja inokulirano u 20 mL svježe tekuće hranjive podloge. Sojevi su inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta do eksponencijalne faze, a uvjeti i vrijeme uzgoja koje je potrebno da se postigne eksponencijalna faza rasta su utvrđeni preliminarnim eksperimentima.

Vrijeme uzgoja za svaki pojedini soj je navedeno u tablici 1.

Tablica 1. Vrijeme potrebno za uzgoj pojedinog bakterijskog soja do eksponencijalne faze.

BAKTERIJSKI SOJ	VRIJEME UZGOJA
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	4 h
<i>Salmonella enterica</i> serotip Typhimurium LT21	14 h
<i>Salmonella enterica</i> serotip Typhimurum TA100	14 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	22 h
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7 h
<i>Lactobacillus fermentum</i>	18 h

3.1.1.2. Humane stanice

U ovom radu je korištena kontinuirana humana stanična linija hepatocelularnog karcinoma, HepG2. Stanična linija je rasla u monosloju u T-boci u kompletiranom mediju RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) u kojeg je dodana 10 % otopina fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum, FBS*). Stanice su uzgajane u inkubatoru u 5 % atmosferi CO₂ na temperaturi od 37 °C. Nakon uzgoja, za potrebe korištenja u eksperimentima, stanice su prevedene u suspenziju korištenjem 0,25 % otopine tripsina. Daljnje djelovanje tripsina je potom potrebno zaustaviti dodatkom medija sa serumom. Brojanjem pomoću Türken-Bürkove komore je koncentracija stanica podešena na 10⁵ stanica mL⁻¹.

3.1.2. Hranjive podloge

U ovom radu su za uzgoj bakterija korištene kompletne hranjive podloge LB (eng. *Luria-Bertani*) i MRS (eng. *Man, Rogosa and Sharpe broth*). Za uzgoj pojedinih bakterija su korištene i selektivne podloge, poput M9 minimalne podloge s laktozom za uzgoj bakterije *E. coli*, MRS podloge s nalidiksinskom kiselinom za uzgoj bakterija roda *Lactobacillus* te Simmonsovog citratnog agara za uzgoj bakterija roda *Salmonella*.

Podloge su pripravljene prema uputama proizvođača te sterilizirane u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku 1,01 × 10⁵ Pa, uz iznimku Simmonsovog citratnog agara koji je steriliziran u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 0,5 × 10⁵ Pa. Krute hranjive podloge su dobivene tako da je prije sterilizacije u tekuću hranjivu podlogu

dodan agar u prahu u koncentraciji od 15 g L⁻¹. Sastavi svih korištenih hranjivih podloga su navedeni u tablicama 2, 3, 4, 5 i 6.

Tablica 2. Sastav LB hranjive podloge u tekućem obliku.

SASTOJAK	KOLIČINA
Bakto-tripton	10,00 g
Kvašćev ekstrakt	5,00 g
NaCl	5,00 g
Destilirana voda	1000 ml

Tablica 3. Sastav MRS hranjive podloge u tekućem obliku.

SASTOJAK	KOLIČINA
MRS Broth	27,60 g
Destilirana voda	1000 ml

Tablica 4. Sastav MRS hranjive podloge s nalidiksinskom kiselinom.

SASTOJAK	KOLIČINA
MRS Broth	27,60 g
Nalidiksinska kiselina (100 mg ml ⁻¹)	300,00 µL
Destilirana voda	1000 ml

Tablica 5. Sastav M9 hranjive podloge s laktozom.

SASTOJAK	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	6,00 g
KH ₂ PO ₄	3,00 g
NaCl	0,50 g
NH ₄ Cl	1,00 g
Agar	15,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (1 mol L ⁻¹)	2,00 mL
CaCl ₂ (1 mol L ⁻¹)	100,00 µL
20% laktoza	10,00 mL
Tiamin (2 mg mL ⁻¹)	1,00 mL

Tablica 6. Sastav Simmonsovog citratnog agara.

SASTOJAK	KOLIČINA
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,00 g
K_2HPO_4	1,00 g
NaCl	5,00 g
Natrijev citrat	2,00 g
Na_2SO_4	0,20 g
Bromtimolno modriilo	0,08 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Za uzgoj bakterije *S. enterica* serotip Typhimurium TA100 je u ohlađenu podlogu nakon sterilizacije dodano 7,50 mL histidin-biotin otopine u koncentraciji od 0,50 mmol L⁻¹. Navedena otopina se priprema otapanjem 52,50 mg L-histidina i 61,00 mg D-biotina u 500 mL destiliranog pufera, a zatim se otopina filtrira.

3.1.3. Otopine korištene za potrebu eksperimenata

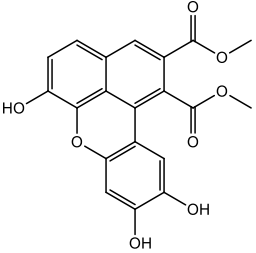
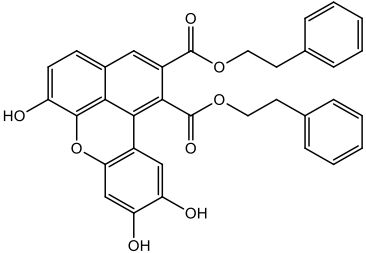
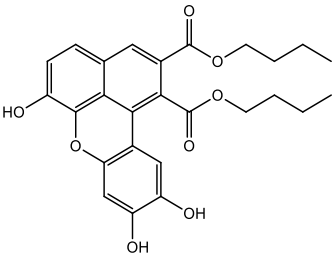
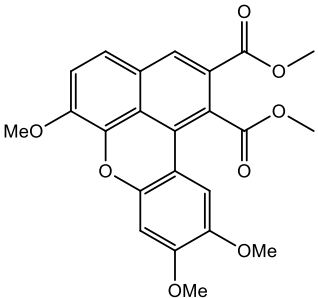
Za potrebu eksperimenata provedenih u ovom radu su korištene otopine benzoksantenskih lignana te fosfatni pufer.

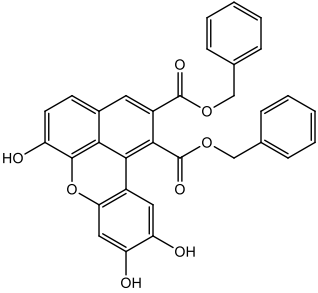
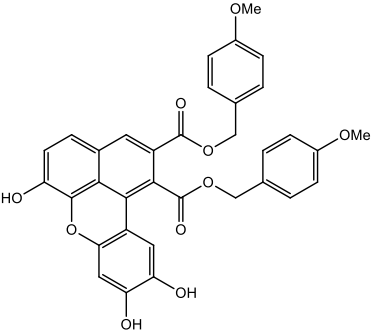
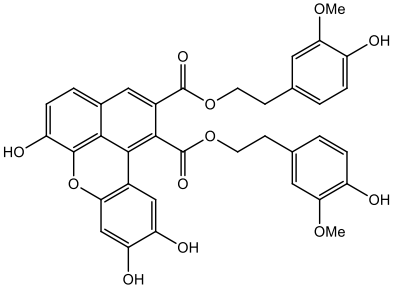
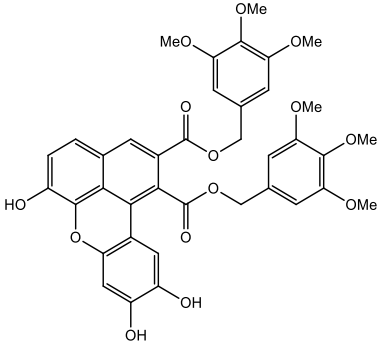
3.1.3.1. Otopine benzoksantenskih lignana

Ishodne otopine benzoksantenskih lignana su donirane s Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, a spojevi su sintetizirani u Laboratoriju za biološki aktivne prirodne spojeve Zavoda za kemiju Sveučilišta u Cataniji u Italiji pod vodstvom prof. dr. sc. C. Tringalija. Koncentracija spojeva otopljenh u dimetilsulfoksidu je bila 10 mmol L⁻¹.

Popis svih korištenih spojeva s njihovim molekulskim strukturama, masama i imenima po IUPAC-u je naveden u tablici 7.

Tablica 7. Popis ispitivanih spojeva s pripadajućim oznakama, molekularnim strukturama, nazivima po IUPAC-u te molekulskim masama.

OZNAKA	STRUKTURA	NAZIV PO IUPAC-u	MOLEKULSKA MASA (Da)
CT-A1		dimetil-6,9,10-trihidroksibenzo-[<i>k,l</i>]-ksanten-1,2-dikarboksilat	382,30
CT-A2		bis(2-feniletil)-6,9,10-trihidroksibenzo-[<i>k,l</i>]-ksanten-1,2-dikarboksilat	562,60
CT-A4		dibutil-6,9,10-trihidroksibenzo-[<i>k,l</i>]-ksanten-1,2-dikarboksilat	466,50
CT-A14		dimetil-6,9,10-trimetoksibenzo-[<i>k,l</i>]-ksanten-1,2-dikarboksilat	424,40

OZNAKA	STRUKTURA	NAZIV PO IUPAC-u	MOLEKULSKA MASA (Da)
CT-A19		bis(benzil)-6,9,10-trihidroksibenzo-[<i>k,l</i>]-ksanten-1,2-dikarboksilat	534,50
CT-A22		bis(4-metoksibenzil)-6,9,10-trihidroksibenzo-[<i>k,l</i>]-ksanten-1,2-dikarboksilat	594,60
CT-A23		bis(4-hidroksi-5-metoksifeniletil)-6,9,10-trihidroksibenzo-[<i>k,l</i>]-ksanten-1,2-dikarboksilat	654,60
CT-A24		bis(3,4,5-metoksibenzil)-6,9,10-trihidroksibenzo-[<i>k,l</i>]-ksanten-1,2-dikarboksilat	714,70

3.1.3.2. Fosfatni pufer

Fosfatni pufer je korišten za pripremu razrjeđenja različitih spojeva korištenih u ovom radu te ispiranje stanica. Sastav fosfatnog pufera je naveden u tablici 8.

Tablica 8. Sastav fosfatnog pufera.

SASTOJAK	KOLIČINA
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	1,15 g
K ₂ HPO ₄	0,20 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Sterilizacija pufera se provodi pri temperaturi 121 °C i tlaku 1,01 x 10⁵ Pa u vremenu od 15 minuta.

3.1.4. Laboratorijska oprema

3.1.4.1. Pribor

- Automatske pipete od 20, 200 i 1000 µL
- Aluminijska folija
- Erlenmayerove tikvice različitih volumena
- Falcon™ epruvete
- Filter papir
- Kivete po Eppendorfu različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- Ljepljiva traka
- Marker za pisanje
- Mikrobiološka ušica
- Mikrotitarske pločice s 96 jažica
- Papir za vaganje i zamatanje čepova
- Papirnati difuzijski diskovi
- Pipetni nastavci

- Plastične i staklene Petrijeve zdjelice
- Propipete
- Staklene čaše
- Staklene epruvete različitih volumena
- Staklene i plastične menzure različitih volumena
- Stakleni lijevak
- Sterilni filteri
- Štapić po Drigalskom
- T-boce
- Türken-Bürkova komora
- Vata za pravljenje čepova

3.1.4.2. *Kemikalije*

- Agar, *Biolife*, Italija
- Amonijev klorid (NH_4Cl), *Alkaloid-Skopje*, Sjeverna Makedonija
- Amonijev sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), *Alkaloid-Skopje*, Sjeverna Makedonija
- Bakto-tripton, *Biolife*, Italija
- Biotin, *Merck*, Njemačka
- Bromtimolno modriilo, *Kemika*, Zagreb
- Diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA), *Sigma Aldrich*, Canada
- Dimetilsulfoksid (DMSO), *Merck*, Njemačka
- Etanol, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- Fetalni goveđi serum, toplinski inaktiviran, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Glicerol, *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Histidin, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- Kalcijev klorid (CaCl_2), *Kemika*, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), *Riedel-De Hean*, Njemačka
- Kvaščev ekstrakt, *Biolife*, Italija
- Kristal violet, *Sigma - Aldrich - Chemie*, Steinheim
- Laktoza, *Kemika*, Hrvatska
- Magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), *Merck*, Njemačka
- Metilensko modriilo, *Kallies Feinchemie AG*, Njemačka

- MRS Broth, *Biolife*, Italija
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), *Carlo Erba Reagents*, Francuska
- Neutral Red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Feinchemie K.-H. Kallies KG*, Njemačka
- Octena kiselina, *p.a.*, *Kemika*, Zagreb
- RPMI 1640 medij, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Tiamin, *Carlo Erba Reagents*
- Tripsin, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka

3.1.4.3. Aparatura

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition, *Sartorius*, Velika Britanija
- Aparatura za termostatiranje BTE-S, *Termo-medicinski aparati*, Hrvatska
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih pločica, *Cecil Instruments Ltd*, Engleska
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2 , *Forma Scientific*, SAD
- Laminar, *Iskra*, Slovenija
- Svjetlosni mikroskop/invertni svjetlosni mikroskop, *Carl ZeissJena*, Njemačka; *Optika Microscopes*, Italija
- Vaga, *Sartorius*, Engleska
- Vibromikser EV-202 i EV-100, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific*, SAD

3.1.5. Računalni programi

Za potrebe deskriptivne i analitičke statistike te obrade dobivenih podataka su korišteni programi Microsoft Excel 2016 (*Microsoft Corporation*, SAD) te JASP 0.10.0 (Sveučilište u Amsterdamu, Nizozemska).

3.2. METODE

3.2.1. Ispitivanje antibakterijskog učinka benzoksantenskih lignana difuzijskim testom

Bakterije na kojima će se vršiti ispitivanje toksičnosti (*E. coli* K-12 MG1655, *S. enterica* serotip Typhimurium LT21, *S. aureus*, *L. plantarum* i *L. fermentum*) su uzgojene do ekspanzionalne faze u pripadajućim tekućim medijima. Za ispitivanje antibakterijskog učinka benzoksantenskih lignana su korištene ishodne otopine, gdje je koncentracija spoja 10 mmol L^{-1} .

Po $100 \text{ }\mu\text{L}$ svake pojedine bakterijske suspenzije je nacijepljeno na pripadajuću čvrstu hranjivu podlogu, a zatim su na podloge sterilnom tehnikom postavljeni papirnati difuzijski diskovi. Na diskove je nanešeno po $10 \text{ }\mu\text{L}$ pripadajućih otopina ispitivanih spojeva, a kao kontrola je služio papirnati disk na kojeg je nanešeno $10 \text{ }\mu\text{L}$ fosfatnog pufera. Stanice su stavljene na inkubaciju pri temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 24 h. Nakon 24 h evaluira se učinak ispitivanih spojeva praćenjem razvoja zone inhibicije oko postavljenih papirnatih diskova.

Kako bi se utvrdilo utječu li polarnost i veličina benzoksantenskih lignana na njihovu mogućnost prolaska kroz staničnu membranu ispitanih bakterija, difuzijski test je proveden i uz pomoć 0,1 % otopine kristal violeta, koja je dobivena otapanjem 0,05 grama kristal violet boje u 50 mL destilirane vode te filtriranjem.

3.2.2. Citotoksični učinak benzoksantenskih lignana

Za daljnje ispitivanje toksičnosti benzoksantenskih lignana su korišteni bakterijski sojevi *E. coli* K-12 MG1655, *S. enterica* serotip Typhimurium LT21, *S. enterica* serotip Typhimurium TA100, *S. aureus*, *L. plantarum* i *L. fermentum*.

Po $20 \text{ }\mu\text{L}$ pojedine bakterijske suspenzije je nacijepljeno u mikrotitarske ploče s 96 jažica. Bakterijska suspenzija je tretirana s po $20 \text{ }\mu\text{L}$ otopine određenog benzoksantenskog lignana u koncentraciji od 1 mmol L^{-1} ili $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, a svaka koncentracija je ispitana u 3 paralele. Ukupni volumen smjese u jažici je bio $40 \text{ }\mu\text{L}$ što znači da su konačne koncentracije ispitivanog spoja bile $0,5$ i $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Kontrola je bila bakterijska suspenzija tretirana samo s $20 \text{ }\mu\text{L}$ fosfatnog pufera. Smjesa je potom inkubirana 1 h na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$ te

je po 10 µL od sadržaja svake jažice naciijepljeno na odgovarajuće hranjive ploče. Stanice su uzgajane 24 h pri temperaturi od 37 °C, a zatim je izbrojan broj naraslih bakterijskih kolonija (eng. *CFU, Colony - Forming Unit*). Rezultati preživljenja bakterija nakon jednosatnog tretmana otopinama benzoksantenskih lignana su računati prema formuli 1:

$$[1] \quad \% \text{ Preživljenje bakterija} = (CFU / mL \text{ bakterija}) / (CFU / mL \text{ kontrole}) \times 100$$

Rezultati su prikazani grafički te fotografijama gdje je to bilo moguće.

3.2.3. Ispitivanje promjene hidrofobnosti bakterijskih staničnih stijenki SAT (eng. *Salt Aggregation Test*) testom

Hidrofobne interakcije su glavni korak u vezanju bakterija na stanice domaćina. Prema tome, razvijeno je nekoliko metoda za određivanje hidrofobnosti bakterijske stanične površine. Najčešće korištena i vrlo jednostavna metoda je SAT (eng. *Salt Aggregation Test*) metoda. U ovom radu korištena je upravo SAT metoda prema radu Rozgonyi i sur. (45).

Sojevi bakterija koji su korišteni u ovom eksperimentu su uzgajani u tekućoj hranjivoj podlozi do eksponencijalne faze rasta, te su bakterijske stanice odvojene od ostatka podloge centrifugiranjem 5 minuta na 10 000 rpm. Po 50 µL taloga bakterijskih stanica je dodano u jažice na mikrotitarskoj ploči. Kako bi se ispitalo djelovanje 0,5 mmol L⁻¹ koncentracije benzoksantenskih lignana u jažice je zatim dodano 5 µL ishodne otopine određenog spoja te 45 µL tekuće hranjive podloge za svaki pojedini spoj. Kako bi se ispitalo djelovanje 0,05 mol L⁻¹ koncentracije benzoksantenskih lignana u jažice je dodano 2,5 µL ishodne otopine određenog spoja te 47,5 µL tekuće hranjive podloge za svaki pojedini spoj. Stanice su inkubirane 1 h na temperaturi od 37 °C.

Natrij-fosfatni pufer je pripremljen pomoću 1 M otopine natrijevog dihidrogenfosfata (NaH₂PO₄) i 1 M otopine dinatrijevog hidrogenfosfata (Na₂HPO₄) pomiješanih u omjeru da se dobije pufer pH 6,8 koji je u konačnici razrijeđen do koncentracije 0,02 M. Otopina boje je pripremljena otapanjem 1,2 g metilenskog modrila u 60 mL natrij-fosfatnog pufera preko noći te filtracijom pomoću filter papira. Filtrat boje je korišten na način da je na 1 mL otopine soli ili pufera korišteno 10 µL boje kako bi se lakše vizualizirala agregacija.

Za potrebe ispitivanja promjene hidrofobnosti površina bakterijskih stijenki pripremljene su ishodne otopine amonijevog sulfata u 0,02 M natrij-fosfatnom puferu u koncentracijama od 0,50, 1,00, 2,00 i 4,00 mol L⁻¹ i volumenu od 2 mL u koje je dodano 20 µl pripremljene boje metilenskog modrila, a pri eksperimentalnom radu su korištene radne otopine amonijevog sulfata u koncentraciji od 0,375, 0,75, 1,50 i 3,00 mol L⁻¹. Korištena je i fiziološka otopina, odnosno otopina NaCl u destiliranoj vodi u koncentraciji od 0,15 mol L⁻¹. Volumen od 50 µL svake pripremljene otopine soli, 15 µL fiziološke otopine i 10 µL tretirane bakterijske suspenzije se otpipetira u jažice čiste mikrotitarske ploče, i tako za svaki od osam ispitivanih spojeva. Kao kontrola su služile jažice u koje je dodano 50 µL natrij-fosfatnog pufera ili 50 µL fiziološke otopine uz 15 µL fiziološke otopine i 10 µL bakterijske suspenzije.

Rezultati se validiraju zamjećivanjem pojave međusobne agregacije bakterija, prema legendi koja je navedena u tablici 9, a prikazani su tablično i fotografijama gdje je to bilo moguće.

Tablica 9. Legenda za validiranje rezultata promjene hidrofobnosti staničnih stijenki bakterija u ovisnosti o koncentracijama soli.

Otopine:	Ako je zamijećena agregacija:
Natrij - fosfatni pufer	autoagregacija, ekstremno hidrofobna površina bakterije
<1,0 M amonij sulfat	jako hidrofobna površina bakterije
1,0-2,0 M amonij sulfat	hidrofobna površina
>2,0 M amonij sulfat	hidrofilna površina

3.2.4. Ispitivanje citotoksičnosti benzoksantenskih lignana NR metodom na kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma (HepG2)

Citotoksični učinak različitih koncentracija benzoksantenskih lignana je ispitivan na humanoj staničnoj liniji HepG2, a korištena je Neutral red metoda. Neutral red (3 - amino - 7 - dimetilamino - 2 - metilfenazin hidroklorid) je slaba kationska boja koja neionskom difuzijom može ući u stanicu i vezati se na anionske dijelove lizosomskog matriksa. S obzirom na to da se Neutral red boja u stanicu unosi aktivnim transportom, za to joj je potrebna neoštećena stanična membrana. Neki spojevi mogu oštetiti membranu ili

uzrokovati smrt stanice, pa u takve stanice boja ne može ući. U živim stanicama s funkcionalnom membranom će se boja nakupljati u lizosomima, što će biti mjerljivo nakon dodatka otopine za odbojavanje (46).

Po 100 μL suspenzije stanica HepG2 koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} je nasadeno u mikrotitarske pločice. Stanice su uzgajane 24 h u inkubatoru na temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$ i atmosferi od 5 % CO_2 kako bi došlo do njihovog vezanja za podlogu i razvoja subkonfluentnog monosloja. Nakon vezanja, stanice su tretirane sa 100 μL otopina osam različitih benzoksantenskih lignana u koncentraciji od 0,5, 0,05 i 0,005 mmol L^{-1} koje su pripravljene u hranjivom mediju. Svaka koncentracija pojedinog spoja je ispitivana u 4 replike. U pojedine jažice je dodan samo hranjivi medij, bez ispitivanih spojeva, kako bi služile kao kontrola. Vrijeme tretmana je bilo 2 i 24 h.

Nakon završetka uzgoja, sa stanica se uklanjaju istraživani spojevi, a u svaku jažicu je dodano 100 μL radne otopine Neutral red boje. Radna otopina Neutral red boje (10%) je pripravljena razrjeđivanjem ishodne otopine Neutral red boje (5 mg mL^{-1} u etanolu) pomoću kompletiranog medija. Provedena je inkubacija od 1 h na temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$, a zatim je boja uklonjena i sve stanice su isprane sa 100 μL fosfatnog pufera kako bi se uklonio višak boje. Nakon ispiranja, u jažice je dodano 100 μL otopine za odbojavanje, koja sadržava 1% ledene octene kiseline, 50 % etanola i 49 % destilirane vode. Intenzitet obojenja je određen spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540 nm. Intenzitet obojenja je proporcionalan preživljenju stanica, koje se računa prema formuli 2:

$$[2] \quad \% \text{ preživljenja} = (A_{540 \text{ nm istraživanog spoja}} / A_{540 \text{ nm kontrole}}) \times 100$$

3.2.5. Ispitivanje antioksidativnog učinka benzoksantenskih lignana DCFH-DA metodom

Koncentracija slobodnih radikala odnosno reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *ROS*, *Reactive Oxygen Species*) koji nastaju bazalnim metabolizmom ili djelovanjem ispitivanih spojeva se može izmjeriti pomoću diklorodihidrofluorescein diacetata (eng. DCHF-DA, *dichlorodihydrofluorescein diacetate*), nepolarnog i nefluorescirajućeg spoja koji može difundirati kroz staničnu membranu. Nakon što uđe u citosol, hidrolizira se u nefluorescirajući DCHF karboksilatni anion u reakciji koju kataliziraju unutarstanični

enzimi. DCHF će se tek u prisutnosti slobodnih radikala oksidirati u DCF, odnosno dihidrofluorescein, koji je izrazito fluorescentan. Fluorescencija se mjeri pomoću fluorimetra pri valnim duljinama od 485 nm za ekscitaciju i 520 nm za emisiju. Intenzitet fluorescencije je mjera za prisutnost slobodnih radikala u stanici (47).

Da bi se izmjerilo antioksidativno djelovanje benzoksantenskih lignana na staničnu liniju HepG2, po 100 μL suspenzije stanica HepG2 koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} je nasađeno u crne mikrotitarske pločice. Uzgajane su 24 h u inkubatoru na temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$ i atmosferi od 5 % CO_2 . Zatim su tretirane sa po 100 μL otopina osam različitih benzoksantenskih lignana u koncentraciji od 0,5, 0,05 i 0,005 mmol L^{-1} koje su pripremljene u hranjivom mediju. Svaka koncentracija pojedinog spoja je ispitivana u 4 replike. U pojedine jažice je dodan samo hranjivi medij, bez ispitivanih spojeva, kako bi služile kao kontrola. Vrijeme tretmana je bilo 2 i 24 h. Nakon određenog vremena tretmana sadržaji iz jažica su uklonjeni i stanice su isprane sa 100 μL fosfatnog pufera. Na stanice se dodaje po 100 μL radne otopine DCHF-DA ($0,05\text{ mmol L}^{-1}$), koja je dobivena razrjeđivanjem ishodne otopine 2',7'- diklorofluorescein diacetata koncentracije 2 mmol L^{-1} . Stanice se inkubiraju 15 minuta na temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$ i atmosferi od 5 % CO_2 . Poslije inkubacije se uz pomoć fluorimetra mjeri intenzitet fluorescencije te se statistički obrađuju rezultati u odnosu na kontrolu.

3.2.6. Statistička obrada podataka

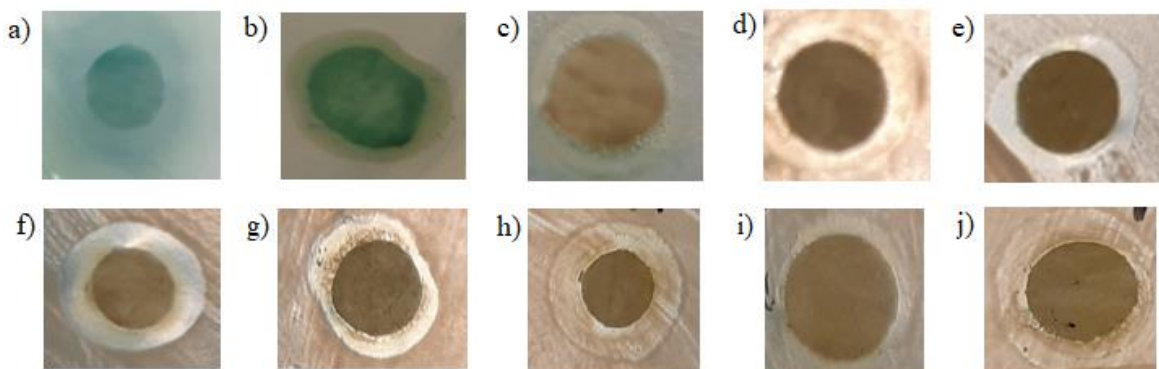
Dobiveni rezultati su obrađeni u statističkom programu JASP 0.10.0, korištenjem One Way ANOVA statističke analize sa Scheffe post-hoc testom usporedbe. Odabrana razina značajnosti (p -vrijednost) je bila 0,05. Svaki rezultat koji pokazuje razinu značajnosti manju od 0,05 smatra se statistički značajnim. Pomoću Microsoft Excel 2016 programa su dobiveni rezultati prikazani grafički gdje je to bilo moguće.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ISPITIVANJE ANTIBAKTERIJSKOG UČINKA BENZOKSANTENSKIH LIGNANA DIFUZIJSKIM TESTOM

Antibakterijski učinak benzoksantenskih lignana je ispitan difuzijskim testom u kojem su korištene ishodne otopine spojeva koncentracije 10 mmol L⁻¹, a korišteni su sojevi bakterija *E. coli* K-12 MG1655, *S. enterica* serotip Typhimurium LT21, *S. aureus*, *L. plantarum* i *L. fermentum*. Bakterije su bile izložene djelovanju spojeva 24 h, a nakon toga su zabilježene pojave zona inhibicije.

Na slici 4 su prikazane zone inhibicije za pojedine ispitivane spojeve i sojeve bakterija. Kod ostalih ispitivanih spojeva i bakterijskih sojeva nisu zamijećene zone inhibicije.



Slika 4. Prikaz zona inhibicije nakon provedenog ispitivanja antibakterijskog učinka benzoksantenskih lignana difuzijskim testom. a) *Salmonella* Typhimurium LT21 tretirana spojem CT-A1 b) *Salmonella* Typhimurium LT21 tretirana spojem CT-A2 c) *L. plantarum* tretiran spojem CT-A4 d) *L. plantarum* tretiran spojem CT-A19 e) *L. fermentum* tretiran spojem CT-A2 f) *L. fermentum* tretiran spojem CT-A4 g) *L. fermentum* tretiran spojem CT-A19 h) *L. fermentum* tretiran spojem CT-A22 i) *L. fermentum* tretiran spojem CT-A23 j) *L. fermentum* tretiran spojem CT-A24.

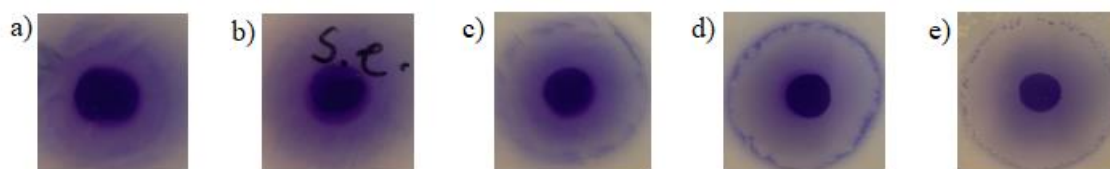
Iz rezultata je vidljivo da spojevi CT-A1 i CT-A2 u koncentraciji od 10 mmol L⁻¹ u određenoj mjeri inhibiraju rast bakterije *S. enterica* serotip Typhimurium LT21. To se može objasniti činjenicom da je *Salmonella* Typhimurium LT21 Gram negativna bakterija čija stanična

stijenka ne propušta veće hidrofobne molekule, ali može propustiti hidrofobne molekule veličine do otprilike 650 Da, kao što su spojevi CT-A1 molekulske mase 382,30 Da i CT-A2 molekulske mase 562,60 Da. Također, spojevi CT-A1 i CT-A2 imaju po tri slobodne hidroksilne skupine pomoću kojih mogu tvoriti vodikove veze s lipopolisaharidnim slojem u staničnoj membrani, što će omogućiti brži transfer u stanicu (48). Međutim, to ne objašnjava zašto ostali spojevi molekulske mase manje od 650 Da, CT-A4, CT-A19 i CT-A22 nisu inhibirali rast ove bakterije, iako također imaju po tri slobodne hidroksilne skupine.

Pojava zone inhibicije je ipak najviše bila učestala kod bakterija roda *Lactobacillus*. Bakterija *L. plantarum* se pokazala osjetljivom na spojeve CT-A4 i CT-A19, a bakterija *L. fermentum* na spojeve CT-A2, CT-A4, CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24. Laktobacili su Gram pozitivne bakterije koje nemaju vanjski lipopolisaharidni sloj u staničnoj stijenci kao Gram negativne bakterije pa su stoga višestruko osjetljivije na djelovanje antibakterijskih antibiotika, a time se može objasniti učestalija pojava zona inhibicije kod takvih bakterija (49). Također, *L. fermentum* u eksponencijalnoj fazi sadrži više O-acetiliranih ostataka na peptidoglikanima, što ga čini osjetljivijim na djelovanje raznih litičkih agenasa (31), dok *L. plantarum* u strukturi stanične stijenke sadrži mezo-diaminopimeličnu kiselinu zbog koje je unakrsno povezivanje peptidoglikana direktno, što samu bakteriju čini otpornijom (28). Time se može objasniti zašto je kod *L. plantarum* došlo do pojave zone inhibicije pod utjecajem samo dva spoja.

Međutim, i *S. aureus* je Gram pozitivna bakterija, ali ispitivanjem antibakterijskog učinka beznoksantenskih spojeva difuzijskim testom nije došlo do pojave zona inhibicije. Iako slična istraživanja nisu provedena s benzoksantenskim lignanima, poznato je da *S. aureus* može razviti rezistenciju na razne antibiotike upravo zbog umreženog povezivanja pentaglicinskih ogranaka na peptidoglikanima, što ga čini otpornijim od većine drugih Gram pozitivnih bakterija (25).

Kako bi se utvrdilo utječu li polarnost i veličina benzoksantenskih lignana na njihovu mogućnost prolaska kroz staničnu membranu ispitanih bakterija, difuzijski test je proveden i uz pomoć otopine kristal violeta. Kristal violet je triarilmetansko bojilo molekulske mase 407,97 Da, a posjeduje antimikotička i antibakterijska svojstva. Zone inhibicije koje su nastale nakon tretmana od 24 h su prikazane na slici 5.



Slika 5. Prikaz zona inhibicije nakon tretmana bakterija s otopinom kristal violeta. a) *E. coli* K-12 MG1655 b) *S. enterica* serotip Typhimurium LT21 c) *S. aureus* d) *L. plantarum* e) *L. fermentum*.

Rezultati pokazuju da je kristal violet uzrokovao inhibiciju rasta svih ispitivanih bakterija, kako Gram negativnih, tako i Gram pozitivnih. Primijećene su i veće zone inhibicije kod Gram pozitivnih bakterija, posebice sojeva *L. fermentum* i *L. plantarum*. To je u skladu s dosadašnjim istraživanjima koja pokazuju da kristal violet inhibira rast bakterija, a posebice Gram pozitivnih (50).

S obzirom na to da značajnija inhibicija rasta nije primijećena kad se ispitivao antibakterijski učinak benzoksantenskih lignana na Gram negativnim bakterijama, može se zaključiti da je to zbog toga što su benzoksantenski lignani većinom hidrofobni spojevi koji nisu mogli ući u stanicu zbog posebne strukture stanične stijenke.

Što se tiče inhibicije rasta Gram pozitivne bakterije *S. aureus*, može se pretpostaviti da je kristal violet mogao inhibirati njen rast zbog toga što je sa staničnom stijenkom mogao tvoriti više polarnih veza od ispitivanih benzoksantenskih lignana. Međutim, difuzijski test ispitivanja antibakterijske aktivnosti tih spojeva nije dovoljno precizan kako bi se to moglo sa sigurnošću zaključiti.

Dosadašnja preliminarna istraživanja antibakterijskog djelovanja benzoksantenskih lignana nisu pokazala značajne rezultate, osim za benzoksantenski lignan rufescidrid, koji je izoliran iz biljaka *Cordia rufescens* i *Taraxum monglocium* (3, 4). Međutim, istraživanja sa spojevima koji su korišteni u ovom radu dosad nisu detaljno provedena.

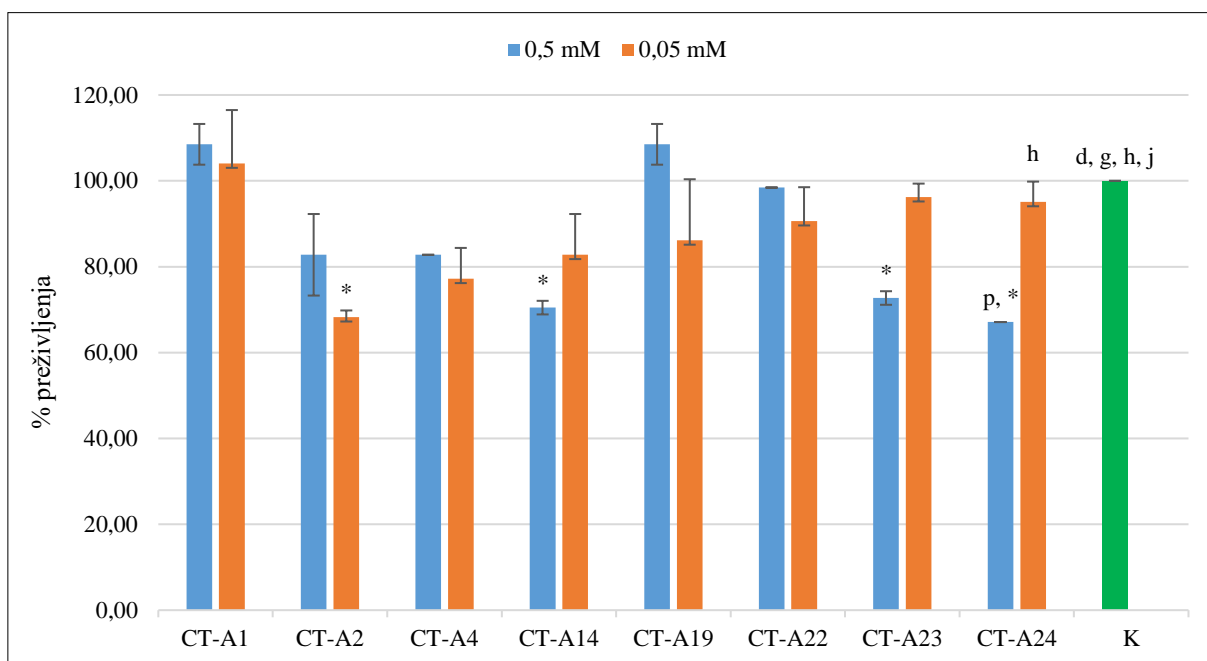
Prednosti ispitivanja antibakterijskog učinka određenih spojeva difuzijskim testovima su svakako jednostavnost izvedbe i pristupačna cijena, ali ovaj način testiranja često neće biti učinkovit kod malih koncentracija ispitivanih spojeva koje su klinički značajne jer se zone inhibicije neće ispoljiti (51) stoga je citotoksični učinak benzoksantenskih lignana ispitan i metodom inkubacije otopina tih spojeva s pojedinim bakterijskim kulturama.

4.2. CITOTOKSIČNI UČINAK BENZOKSANTENSKIH LIGNANA

Nakon jednosatnog tretmana benzoksantenskim lignanima u koncentracijama od 0,5 i 0,05 mmol L⁻¹, bakterijske suspenzije su nacijepljene na odgovarajuće hranjive ploče. Broj naraslih bakterijskih kolonija je izbrojan, a preživljenje je izraženo u postotcima.

4.2.1. *Escherichia coli*

Na slici 6 se nalazi grafički prikaz ovisnosti postotka preživljenja bakterije *E. coli* K-12 MG1655 u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹.



Slika 6. Ovisnost preživljenja bakterije *E. coli* K-12 MG1655 u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, d - CT-A14 0,5 mM, g - CT-A23 0,5 mM, h - CT-A24 0,5 mM, j - CT-A2 0,05 mM, p - CT-A24 0,05 mM.

Iz rezultata je vidljivo da je tretman spojevima CT-A14, CT-A23 i CT-A24 u koncentraciji od 0,5 mmol L⁻¹ i CT-A2 u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹ imao statistički značajan citotoksični učinak na stanice bakterije *E. coli* K-12 MG1655 u odnosu na kontrolu. Spoj CT-A2 je imao citotoksični učinak na bakterijske stanice u manjoj od dvije ispitivane

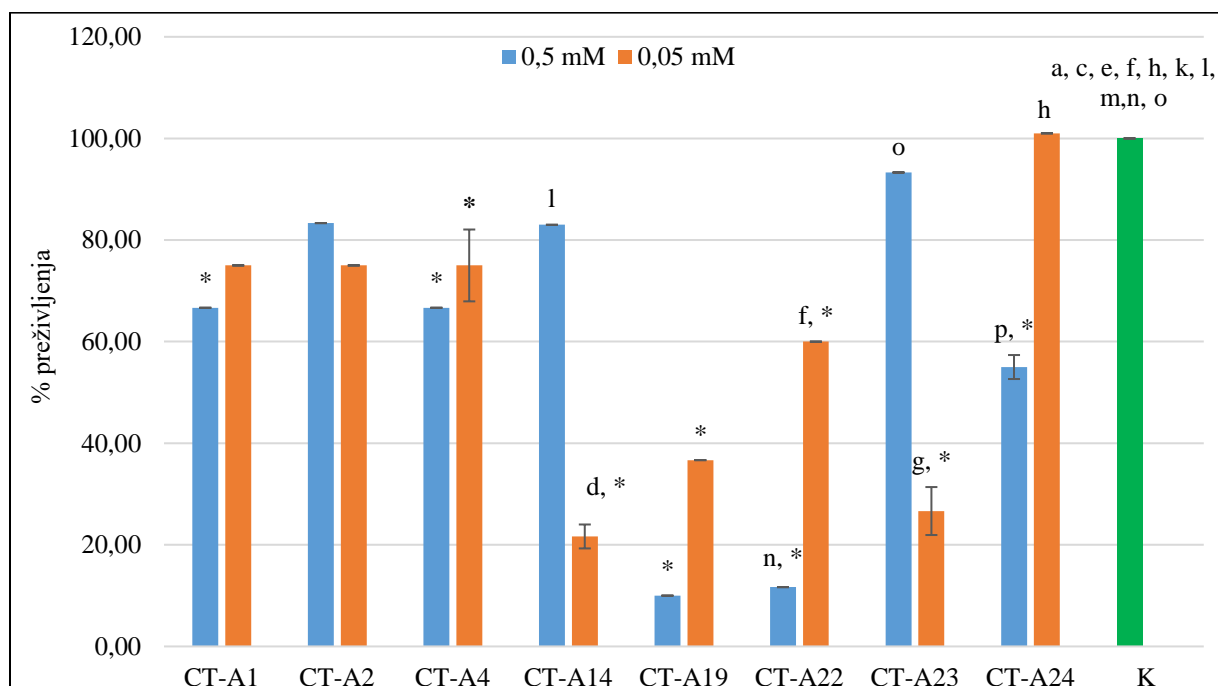
koncentracije, što se može objasniti time da spoj u strukturi sadrži dvije fenilne skupine koje mogu tvoriti hidrofobne interakcije s lipidom A u bakterijskoj staničnoj stijenci što može dovesti do gubitka njenog integriteta (13). Međutim, u većoj koncentraciji taj spoj nije imao statistički značajan citotoksični učinak jer je vjerojatno došlo do aktivacije efluks pumpe AcrAB-TolC koja je odgovorna za ispumpavanje antibiotika i razvoj rezistencije kod *E. coli* (14). Može se primijetiti da spoj CT-A19 ima veoma sličnu strukturu kao CT-A2, ali umjesto etilne skupine na fenil ima vezanu metilnu skupinu. Spoj CT-A19 nije iskazao statistički značajan citotoksični učinak pa se može zaključiti da je upravo ta promjena u strukturi bila važna za njegovo djelovanje.

Spojevi CT-A14, CT-A23 i CTA24 su iskazali citotoksične učinke u većoj od dvije ispitivane koncentracije što se vjerojatno dogodilo zbog njihove mogućnosti da pomoću metoksi i hidroksilnih skupina tvore elektrostatske interakcije s negativno nabijenim lipopolisaharidima u staničnoj stijenci te vežu magnezijeve i kalcijeve ione koji su joj prijeko potrebni za stabilizaciju. Spoj CT-A24 je iskazao najveći citotoksični učinak bez obzira što ima najveću molekularnu masu od svih ispitivanih spojeva (714,70 Da). To se može objasniti time što ovaj spoj ima 6 metoksi i 3 hidroksilne skupine te stoga može tvoriti najviše elektrostatskih interakcija, posebno u većoj od dvije koncentracije. Zamijećena je i statistički značajna razlika između citotoksičnog učinka tog spoja u koncentraciji od 0,5 i 0,05 mmol L⁻¹, što se također može objasniti većim brojem interakcija koje taj spoj može u većoj koncentraciji tvoriti s lipopolisaharidima stanične stijenske. Bilandžić i sur. u preglednom članku koji je objavljen 2018. godine objašnjavaju da i kolistin, polipeptidni antibiotik veličine 1155,45 Da, može imati značajan citotoksični učinak bez obzira na svoju veličinu upravo zbog mnogobrojnih elektrostatskih interakcija koje može tvoriti s lipopolisaharidima stanične stijenske *E. coli* (52).

Međutim, iako su 4 navedena spoja iskazala statistički značajan citotoksični učinak u odnosu na kontrolu, on se ne može smatrati klinički značajnim. Čak je i nakon djelovanja spoja CT-A24 u koncentraciji od 0,5 mmol L⁻¹, koji je iskazao najveći citotoksični učinak od svih spojeva, preživljenje bakterije *E. coli* K-12 MG1655 bilo više od 60 %.

4.2.2. *Salmonella enterica* serotip Typhimurium

Na slici 7 se nalazi grafički prikaz ovisnosti postotka preživljenja bakterije *S. enterica* serotip Typhimurium LT21 u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹.



Slika 7. Ovisnost preživljenja bakterije *S. enterica* serotip Typhimurium LT21 u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,5 mM, c - CT-A4 0,5 mM, d - CT-A14 0,5 mM, e - CT-A19 0,5 mM, f - CT-A22 0,5 mM, g - CT-A23 0,5 mM, h - CT-A24 0,5 mM, k - CT-A4 0,05 mM, l - CT-A14 0,05 mM, m - CT-A19 0,05 mM, n - CT-A22 0,05 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,05 mM.

Iz rezultata je vidljivo da su spojevi CT-A1 i CT-A24 iskazali statistički značajan citotoksični učinak u koncentraciji od 0,5 mmol L⁻¹, a spojevi CT-A14 i CT-A23 u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹. Spojevi CT-A4, CT-A19 i CT-A22 su iskazali značajan citotoksični učinak u obje ispitivane koncentracije.

Gram negativna bakterija *Salmonella* Typhimurium se u uvjetima opasnosti prilagođava modifikacijom stanične stijenke tako što dodatkom određenih kemijskih skupina povećava

broj interakcije između lipopolisaharida, što samu stijenkku čini otpornijom na djelovanje velikih hidrofobnih spojeva, kakvi su i benzoksantenski lignani (19).

Zanimljivo je da su spojevi najveće molekularne mase (CT-A24, 714,70 Da) i najmanje molekularne mase (CT-A1, 382,30 Da) iskazali citotoksični učinak samo u većoj koncentraciji. To se može objasniti time da CT-A1 kao najmanji spoj može tvoriti dovoljno elektrostatskih veza samo u povećanoj koncentraciji. Djelovanje spoja CT-A24 zbog njegove velike molekularne mase u manjoj koncentraciji može prepoznati bakterijska stanica te se prilagoditi na njegov utjecaj, dok u povišenoj koncentraciji vjerojatno ne može dovoljno brzo eliminirati njegov utjecaj. Kod spoja CT-A24 se pojavljuje i statistički značajna razlika između citotoksičnog učinka veće i manje koncentracije.

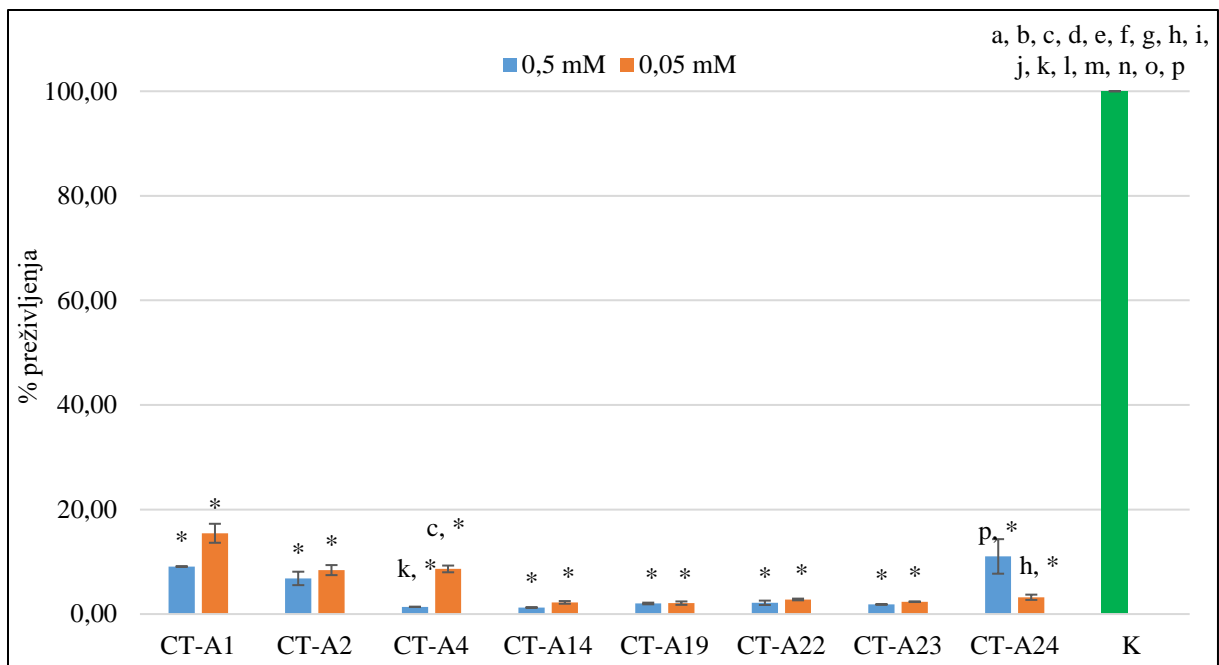
Slično se zamjećuje i kod spojeva CT-A14 i CT-A23, koji su statistički značajan citotoksični učinak iskazali samo kod manje koncentracije. Može se pretpostaviti da samo u nižoj koncentraciji ti spojevi pomoću hidroksilnih te metoksi i etoksi skupina mogu tvoriti veze s lipopolisaharidima stanične stijenke bakterije *Salmonella Typhimurium* LT21.

Spojevi CT-A19 i CT-A22 su u koncentraciji od 0,5 mmol L⁻¹ imali najveći citotoksični učinak od svih ispitivanih spojeva, a molekule ta dva spoja su veoma slične. Molekularne mase su im 534,50 i 594,60 Da, a oba spoja posjeduju metil fenilnu skupinu, osim što spoj CT-A22 ima još dvije metoksi skupine. Vjerojatno je ta kombinacija veličine spoja i skupina koje posjeduje bila ključna za ostvarivanje citotoksičnog učinka na bakteriju *Salmonella Typhimurium* LT21, s preživljenjima nižim od 20 %. Slično preživljenje je bakterija iskazala i nakon tretmana spojem CT-A14 u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹. Drugi spojevi, čak i oni koji su u određenim koncentracijama iskazali statistički značajan citotoksični učinak, nisu klinički iskoristivo utjecali na preživljenje bakterije.

Istraživanja su pokazala da je *Salmonella Typhimurium* najosjetljivija na fluorokinolinske antibiotike (17). Osnovna struktura fluorokinolina sadrži tri elektronegativna atoma, kisik, fluor i dušik, koji pridonose stvaranju elektrostatskih veza s lipopolisaharidima stanične stijenke. Sama molekula je velika 163,15 Da (53), što je dvaput manje od najmanjeg benzoksantenskog lignana korištenog u ovom radu, stoga bi za antibakterijski antibiotik koji će biti učinkovit protiv bakterije roda *Salmonella* trebalo razmisliti o puno manjim i polarnijim spojevima.

4.2.3. *Salmonella enterica* serotip Typhimurium TA100

Bakterija *S. enterica* serotip Typhimurium TA100 sadrži mutaciju u genu *rfa*, što čini njen lipopolisaharidni sloj u vanjskoj membrani nefunkcionalnim zbog čega će ona biti propusnija za velike molekule (21). Benzoksantenski lignani su velike hidrofobne molekule pa se korištenjem ovog bakterijskog soja željelo utvrditi u kojoj mjeri bakterijska stijenka Gram negativnih bakterija tvori prepreku njihovom prolasku, a posljedično i citotoksičnom učinku. Na slici 8 se nalazi grafički prikaz ovisnosti postotka preživljenja bakterije *S. enterica* serotip Typhimurium TA100 u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹.



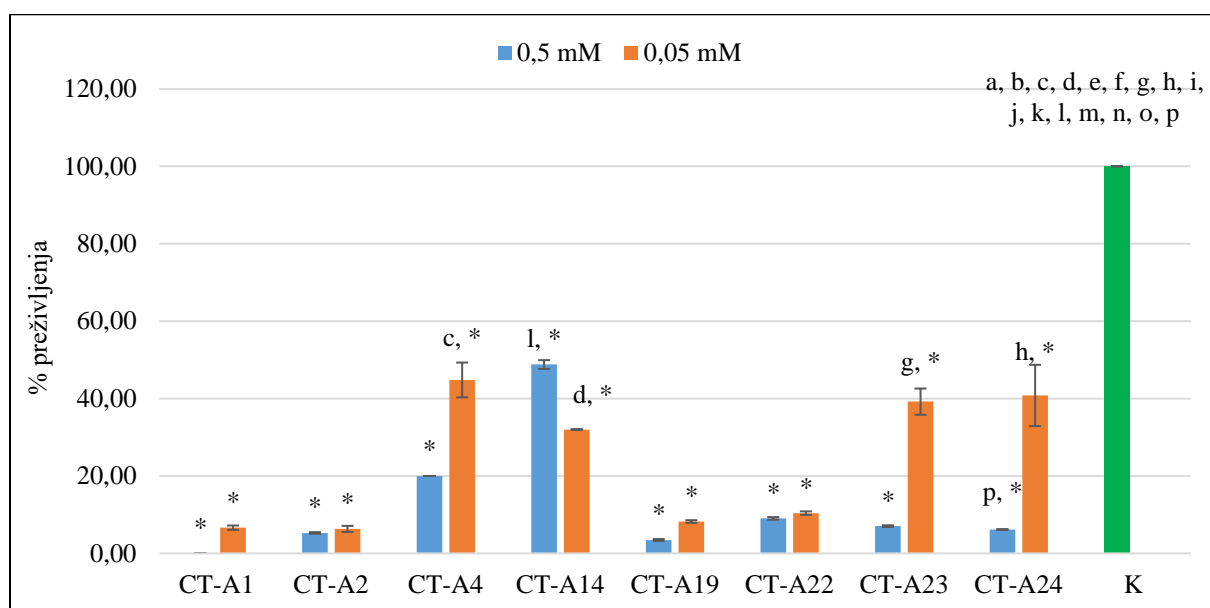
Slika 8. Ovisnost preživljenja bakterije *S. enterica* serotip Typhimurium TA100 u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,5 mM, b - CT-A2 0,5 mM, c - CT-A4 0,5 mM, d - CT-A14 0,5 mM, e - CT-A19 0,5 mM, f - CT-A22 0,5 mM, g - CT-A23 0,5 mM, h - CT-A24 0,5 mM, i - CT-A1 0,05 mM, j - CT-A2 0,05 mM, k - CT-A4 0,05 mM, l - CT-A14 0,05 mM, m - CT-A19 0,05 mM, n - CT-A22 0,05 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,05 mM.

Rezultati su pokazali da su svi spojevi u obje koncentracije imali statistički značajan citotoksički učinak na stanice bakterije *Salmonella* Typhimurium TA100 gdje nijedno preživljenje nije bilo veće od 20 %. Time je dokazano da je prva i glavna prepreka

antibakterijskom djelovanju benzoksantenskih lignana na Gram negativne bakterije upravo njihova stanična stijenka.

4.2.4. *Staphylococcus aureus*

Na slici 9 se nalazi grafički prikaz ovisnosti postotka preživljenja bakterije *S. aureus* u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹.



Slika 9. Ovisnost preživljenja bakterije *S. aureus* u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,5 mM, b - CT-A2 0,5 mM, c - CT-A4 0,5 mM, d - CT-A14 0,5 mM, e - CT-A19 0,5 mM, f - CT-A22 0,5 mM, g - CT-A23 0,5 mM, h - CT-A24 0,5 mM, i - CT-A1 0,05 mM, j - CT-A2 0,05 mM, k - CT-A4 0,05 mM, l - CT-A14 0,05 mM, m - CT-A19 0,05 mM, n - CT-A22 0,05 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,05 mM.

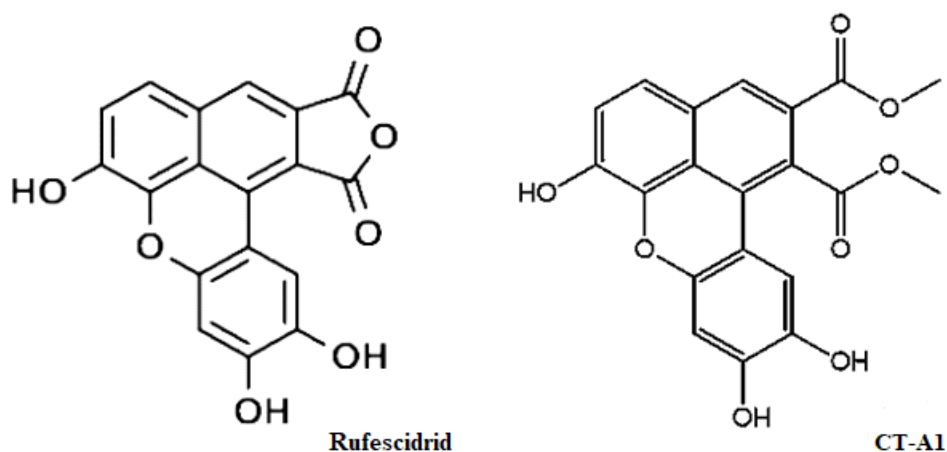
S. aureus je Gram pozitivna bakterija koja u stijenci ne sadrži vanjski lipopolisaharidni sloj kakav sadrže stijenke Gram negativnih bakterija. Iako Gram pozitivne bakterije sadrže deblji peptidoglikanski sloj, ipak su puno podložnije djelovanju velikih hidrofobnih spojeva. Osim toga, Gram pozitivne bakterije u stijenci sadrže teihonske kiseline koje su negativno nabijene i koje vežu katione koji su potrebni za stabiliziranje cijele stanične stijenke (22).

Rezultati pokazuju da su svi ispitivani benzoksantenski lignani u obje koncentracije iskazali statistički značajne citotoksične učinke. Jedino je nakon tretmana spojem CT-A14 u obje koncentracije preživljenje bilo veće od 30 %, a nakon tretmana spojevima CT-A4, CT-A23 i CT-A24 u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹ je preživljenje bilo veće od 40 %. Spojevi CT-A23 i CT-A24 su najveći od svih ispitivanih spojeva te je moguće da u manjoj koncentraciji nisu mogli efikasno djelovati na staničnu stijenkku, dok su spojevi CT-A4 i CT-A14 manji, ali je moguće da njihove bočne skupine nisu mogle tvoriti dovoljan broj veza sa skupinama koje se nalaze na staničnoj stijenci.

Valja primijetiti da je nakon tretmana spojem CT-A1 u koncentraciji od 0,5 mmol L⁻¹ preživljenje bilo 0 %, a u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹ manje od 10 %. To bi moglo značiti da bi spoj CT-A1, uz spojeve CT-A2, CT-A19 i CT-A22 mogao biti potencijalni novi antibiotik. Spojevi CT-A2, CT-A19 i CT-A22 posjeduju istu osnovnu strukturu, s tim da spoj CT-A19 umjesto etil fenilne skupine ima metil fenilnu, a spoj CT-A22 ima etil fenilnu skupinu s dodane dvije metoksi skupine. Spoj CT-A1 pak nema bočni benzenski prsten, a to je sterički povoljno jer nekad previše bočnih supstituenata ometa interakcije između spoja i ciljnih molekula, što bi mogao biti razlog zašto je njegovo djelovanje bilo toliko učinkovito. Može se pretpostaviti da je njegovo općenito djelovanje zapravo stvaranje elektrostatskih veza s teihonskim kiselinama, čime se onesposobljava njihova mogućnost da vežu katione, a time se stanična stijenka destabilizira.

Iako slična istraživanja s benzoksantenskim lignanima nisu provedena pa se rezultati ne mogu direktno usporediti, Favela-Hernández i suradnici su ispitivali antibakterijsko djelovanje lignana izoliranih iz čaparala (lat. *Larrea tridentata*) na 16 različitih bakterijskih vrsta. Pokazalo se da lignan 3'-dimetoksi-6-O-dimetillizogvajacin najučinkovitije djeluje protiv rasta bakterije *S. aureus*, a taj lignan sadrži 3 benzenska prstena za razliku od spoja CT-A1 koji sadrži 4. Međutim, oba spoja imaju isti broj hidroksilnih skupina i otprilike su jednake veličine (54). Također, spoj CT-A1 je strukturno veoma sličan rufescidridu, benzoksantenskom lignanu koji je izoliran iz biljaka *Cordia rufescens* i *Taraxum monglocium* te koji dokazano ima antibakterijsko djelovanje (3). Međutim, spoj CT-A1 za razliku od rufescidrida nema pentanski prsten i ima dvije metoksi skupine, što bi mu moglo omogućiti stvaranje dodatnih elektrostatskih veza s molekulama stanične stijenske.

Njihove strukture su prikazane usporedno na slici 10.



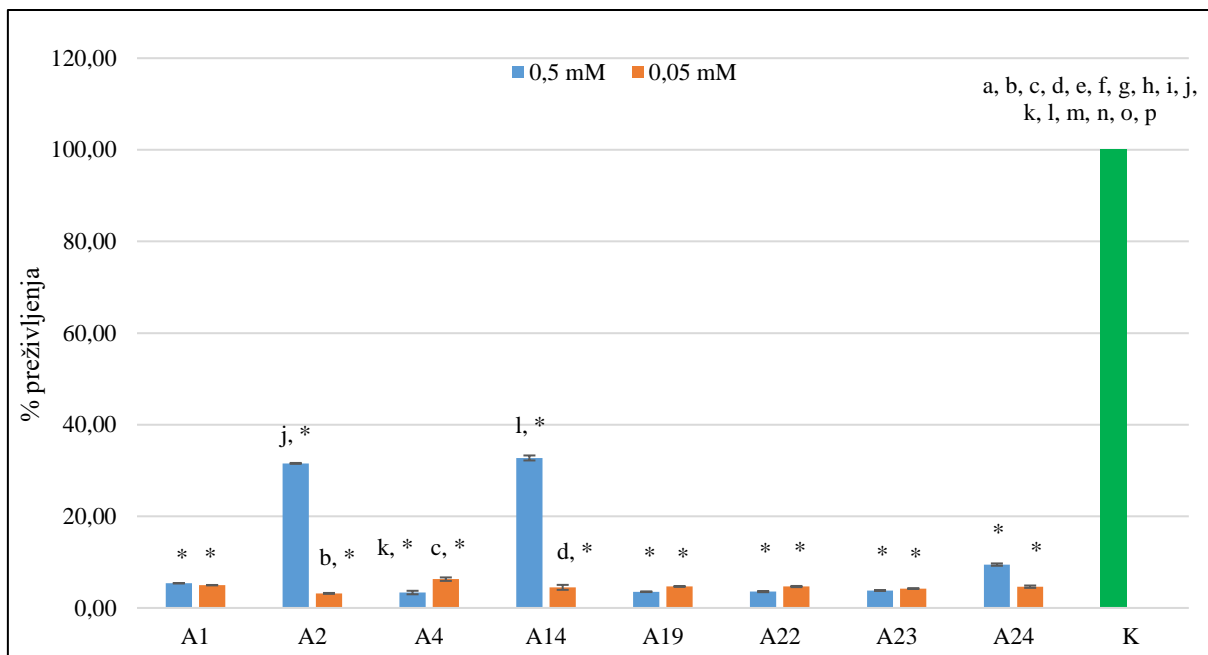
Slika 10. Usporedba molekularne strukture rufescidrida i spoja CT-A1.

Ti rezultati su obećavajući, budući da je multi-rezistentni *S. aureus* uzročnik od 13 % do 74 % ukupnih infekcija diljem svijeta. Iako je to širok raspon, statistički pokazatelji u Europi upozoravaju na činjenicu da je danas u 7 od 29 zemalja Europske Unije više od 25 % ukupno izoliranih invazivnih bakterija *S. aureus* iz pacijenata zapravo multi-rezistentno (55).

Zato bi i spojeve poput benzoksantenskih lignana, a posebice spoj CT-A1, trebalo podrobnije testirati u širem rasponu koncentracija i reakcijskih uvjeta.

4.2.5. *Lactobacillus plantarum*

Na slici 11 se nalazi grafički prikaz ovisnosti postotka preživljenja bakterije *L. plantarum* u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹.



Slika 11. Ovisnost preživljenja bakterije *L. plantarum* u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,5 mM, b - CT-A2 0,5 mM, c - CT-A4 0,5 mM, d - CT-A14 0,5 mM, e - CT-A19 0,5 mM, f - CT-A22 0,5 mM, g - CT-A23 0,5 mM, h - CT-A24 0,5 mM, i - CT-A1 0,05 mM, j - CT-A2 0,05 mM, k - CT-A4 0,05 mM, l - CT-A14 0,05 mM, m - CT-A19 0,05 mM, n - CT-A22 0,05 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,05 mM.

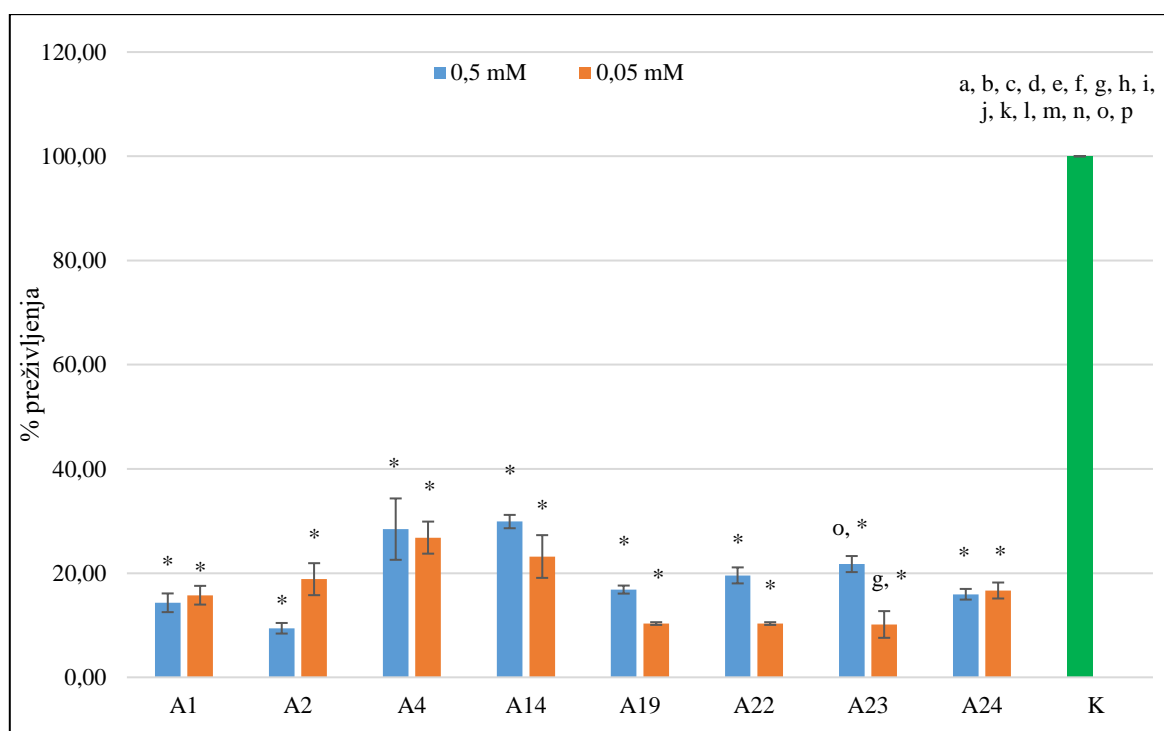
Rezultati pokazuju da su svi ispitivani spojevi u obje koncentracije imali statistički značajan citotoksični učinak na stanice bakterije *L. plantarum* u odnosu na kontrolu. Osim u slučaju spojeva CT-A2 i CT-A14 u koncentraciji od 0,5 mmol L⁻¹, postotak preživljenja bakterije nije bio veći od 10 %. Laktobacili su Gram pozitivne bakterije koje u staničnoj stijenci nemaju lipopolisaharidni sloj koji bi im pružio dodatnu zaštitu, kao Gram negativnim bakterijama, pa su zato ovi rezultati bili očekivani.

Međutim, peptidoglikani se u stijenci bakterije *L. plantarum* povezuju direktnim vezama, a ne unakrsnim kao kod većine Gram pozitivnih organizama. Chapot-Chartier i Kulakauskas ističu da je zbog toga postotak umreženosti peptidoglikana u staničnoj stijenci u eksponencijalnoj fazi procijenjen na 37,5 % što bi bakteriju moglo učiniti otpornijom na djelovanje raznih spojeva (28). Veći postotak preživljenja, u odnosu na ostale spojeve i koncentracije, se iskazao kod djelovanja spojeva CT-A2 i CT-A14 u koncentraciji od 0,5 mmol L⁻¹. Moguće je da se citotoksično djelovanje tih dvaju spojeva u većoj od dvije

koncentracije nije moglo ispoljiti zbog umreženosti stanične stijenke, ali s obzirom na to da ostali spojevi nisu iskazali sličan učinak, to se ne može zaključiti sa sigurnošću. Peptidoglikani su kod ove bakterije također modificirani amidacijom te O- ili N-acetilacijom, što može povećati vjerojatnost stvaranja elektrostatskih veza između njih i ispitivanih skupina, što će povećati propusnost membrane. Isto vrijedi i za nabijene teihonske kiseline koje u stijenci posjeduju Gram pozitivne bakterije.

4.2.6. *Lactobacillus fermentum*

Na slici 12 se nalazi grafički prikaz ovisnosti postotka preživljenja bakterije *L. fermentum* u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹.



Slika 12. Ovisnost preživljenja bakterije *L. fermentum* u ovisnosti o tretmanu pojedinim benzoksantenskim lignanom u koncentraciji od 0,5 ili 0,05 mmol L⁻¹. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,5 mM, b - CT-A2 0,5 mM, c - CT-A4 0,5 mM, d - CT-A14 0,5 mM, e - CT-A19 0,5 mM, f - CT-A22 0,5 mM, g - CT-A23 0,5 mM, h - CT-A24 0,5 mM, i - CT-A1 0,05 mM, j - CT-A2 0,05 mM, k - CT-A4 0,05 mM, l - CT-A14 0,05 mM, m - CT-A19 0,05 mM, n - CT-A22 0,05 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,05 mM.

Rezultati pokazuju da su svi ispitivani spojevi u obje koncentracije imali statistički značajan citotoksični učinak na bakteriju *L. fermentum*. Postotak preživljenja ni u jednom slučaju nije bio veći od 30 %.

L. fermentum je Gram pozitivna bakterija koja u stijenci ne sadrži vanjski lipopolisaharidni sloj kao što ga sadrže Gram negativne bakterije, pa je bilo očekivano da će veliki hidrofobni spojevi poput benzoksantenskih lignani u većoj mjeri utjecati na nju. To potvrđuje i činjenica da su se dosada laktobacili općenito pokazali osjetljivima na velike antibiotike poput eritromicina, molekulske mase 733,93 Da i tetraciklina, molekulske mase 444,44 Da (32, 33). Također, citotoksični učinak benzoksantenskih lignana se ispitivao na bakteriji *L. fermentum* kad je bila u eksponencijalnoj fazi rasta, a Šimelyte i suradnici su pokazali da njeni peptidoglikani u staničnoj stijenci u eksponencijalnoj fazi imaju više O-acetiliranih ostataka, što bakteriju čini osjetljivijom na djelovanje raznih spojeva (31).

L. fermentum i *L. plantarum* se smatraju probiotičkim mikroorganizmima koji žive u probavnom traktu čovjeka i kao takvi pružaju mnoge zdravstvene prednosti (30), a zato rezultati citotoksičnog učinka benzoksantenskih lignana na bakterije roda *Lactobacillus* nisu idealni jer pokazuju da bi oralno uzimanje tih spojeva, između ostalog, moglo rezultirati neravnotežom crijevne mikroflore. Najčešća nuspojava koja se javlja nakon toga je antibioticima uzrokovan proljev, koji je veoma neugodan za pacijenta, a može rezultirati dehidracijom i gubitkom vrijednih elektrolita iz organizma. Međutim, Blaabjerg i suradnici ističu da uzimanje probiotičkih dodataka prehrani može pomoći kod liječenja probavnih smetnji koje su uzrokovane djelovanjem antibiotika (56). U slučaju da bi se benzoksantenski lignani u daljnjim istraživanjima pokazali kao korisni antibiotici za oralnu primjenu, primjerice za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *S. aureus*, narušavanje crijevne mikroflore bi se moglo spriječiti dodatnim uzimanjem probiotičkih dodataka prehrani.

4.3. ISPITIVANJE PROMJENE HIDROFOBNOŠTI BAKTERIJSKIH STIJEŃKI STIJEŃKI SAT (eng. *Salt Aggregation Test*) TESTOM

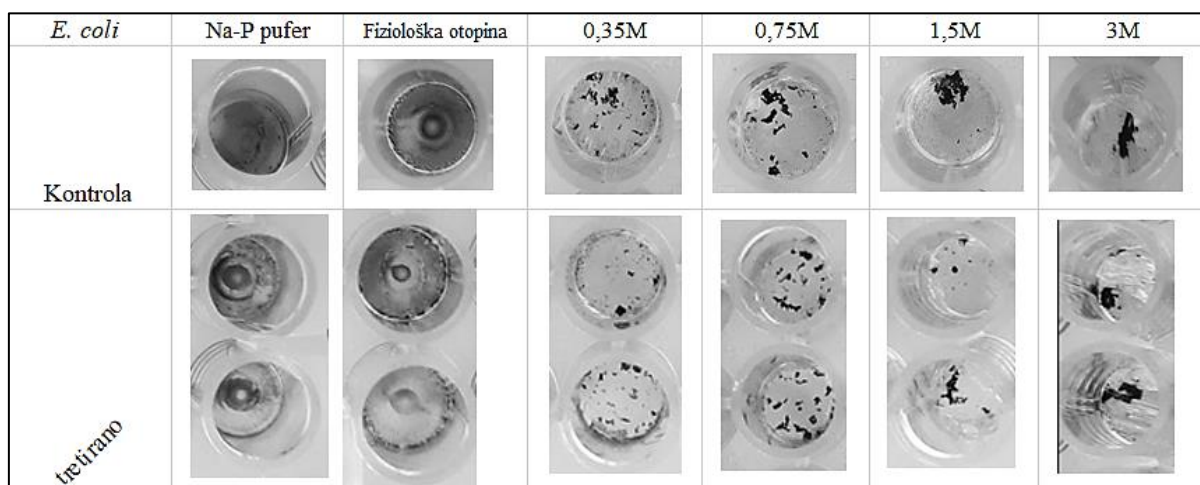
Ispitivanje promjene hidrofobnosti površine bakterijskih stijenki je provedeno na bakterijskim sojevima koji su nakon ispitavanja citotoksičnosti benzoksantenskih lignana iskazali najveći postotak preživljenja, a to su bile bakterije *E. coli* K-12 MG1655 i *S. enterica* serotip Typhimurium LT21.

Željelo se provjeriti povećava li se hidrofobnost stijenki tih bakterija nakon djelovanja benzoksantenskih lignana jer su one pretežno patogene te bi se povećanjem hidrofobnosti u većoj mjeri uspjele vezati za inače hidrofobne stanice probavnog ili mokraćnog sustava (57), gdje ih očekivano nalazimo u organizmu. Hidrofobnost površine stijenke ostalih bakterijskih sojeva, na koje su benzoksantenski lignani djelovali izrazito citotoksično, nije bilo potrebno ispitivati zbog toga što se prepostavljamo takve bakterijske stanice zbog gubitka vitalnosti pod djelovanjem ispitivanih lignana nisu sposobne vezati za stijenke probavnog ili mokraćnog sustava.

Promjena hidrofobnosti bakterijskih stijenki je ispitivana SAT (eng. *Salt Aggregation Test*) testom, a rezultati su prikazani u tablicama 10 i 11 te na slikama 13 i 14.

Tablica 10. Prikaz pojave agregacije bakterije *E. coli* K-12 MG1655 prije (kontrola) i nakon tretmana benzoksantenskim lignanima u Na-P puferu, fiziološkoj otopini i u ovisnosti o dodatku natrijevog klorida i amonijevog sulfata u različitim koncentracijama.

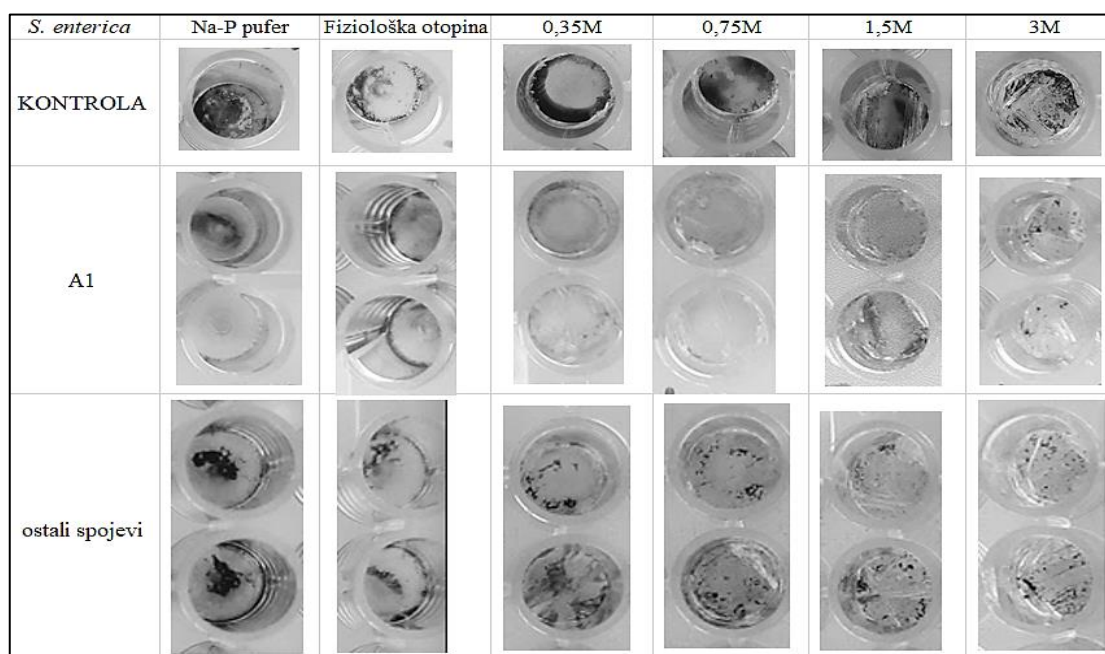
Agregacija (- nema vidljive agregacije, + vidljiva agregacija)			Otopina amonijevog sulfata (M)			
<i>Escherichia coli</i>	Na-P pufer (0,02 M)	0,15 M NaCl (Fiziološka otopina)	0,35	0,75	1,5	3
KONTROLA	-	-	+	+	+	+
CT-A1 (0,5 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A1 (0,05 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A2 (0,5 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A2 (0,05 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A4 (0,5 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A4 (0,05 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A14 (0,5 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A14 (0,05 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A19 (0,5 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A19 (0,05 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A22 (0,5 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A22 (0,05 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A23 (0,5 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A23 (0,05 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A24 (0,5 mM)	-	-	+	+	+	+
CT-A24 (0,05 mM)	-	-	+	+	+	+



Slika 13. Slikoviti prikaz pojave agregacije bakterije *E. coli* K-12 MG1655 prije (kontrola) i nakon tretmana benzoksantenskim lignanima u Na-P puferu, fiziološkoj otopini i u ovisnosti o dodatku natrijevog klorida i amonijevog sulfata u različitim koncentracijama.

Tablica 11. Prikaz pojave agregacije bakterije *S. Typhimurium* LT21 prije (kontrola) i nakon tretmana benzoksantenskim lignanima u Na-P puferu, fiziološkoj otopini i u ovisnosti o dodatku natrijevog klorida i amonijevog sulfata u različitim koncentracijama.

Agregacija (- nema vidljive agregacije, + vidljiva agregacija)			Otopina amonijevog sulfata (M)			
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Na-P pufer (0,02 M)	Fiziološka otopina	0,35	0,75	1,5	3
KONTROLA	-	-	-	-	-	+
CT-A1 (0,5 mM)	-	-	-	-	-	+
CT-A1 (0,05 mM)	-	-	-	-	-	+
CT-A2 (0,5 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A2 (0,05 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A4 (0,5 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A4 (0,05 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A14 (0,5 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A14 (0,05 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A19 (0,5 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A19 (0,05 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A22 (0,5 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A22 (0,05 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A23 (0,5 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A23 (0,05 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A24 (0,5 mM)	+	+	+	+	+	+
CT-A24 (0,05 mM)	+	+	+	+	+	+



Slika 14. Slikoviti prikaz pojave agregacije bakterije *S. Typhimurium* LT21 prije (kontrola) i nakon tretmana benzoksantenskim lignanima u Na-P puferu, fiziološkoj otopini i u ovisnosti o dodatku natrijevog klorida i amonijevog sulfata u različitim koncentracijama.

Rezultati su validirani prema legendi u tablici broj 9, a prema njoj se može zaključiti da je *E. coli* K-12 MG1655 neautoagregirajuća bakterija s jako hidrofobnom površinom, a nijedan od ispitivanih spojeva u obje koncentracije ne utječe na promjenu te hidrofobnosti. To je u skladu s postotkom preživljenja te bakterije nakon ispitivanja citotoksičnog djelovanja benzoksantenskih lignana, jer je od svih ispitivanih bakterija upravo ona iskazala najveće postotke preživljenja. Prema tome možemo zaključiti da ni jedan od benzoksantenskih lignana nema antibakterijski učinak na *E. coli* K-12 MG1655, što se može objasniti strukturom njene Gram negativne stanične stijenke te sposobnošću da aktivira efluks pumpu AcrAB-TolC koja je odgovorna za ispumpavanje antibiotika i razvoj rezistencije, kao što je već rečeno. Zbog ekstremno hidrofobne površine ova bakterija ima sposobnost vezanja za epitelne stanice, primjerice mokraćnog mjehura ili crijeva.

S druge strane, rezultati pokazuju da je *S. Typhimurium* LT21 neautoagregirajuća bakterija koja ima hidrofilnu površinu. Svi su spojevi osim CT-A1 utjecali na promjenu hidrofobnosti njene stanične stijenke, tako da je iz hidrofilne postala ekstremno hidrofobna (autoagregirajuća), a razlike djelovanja između dvije ispitivane koncentracije nisu zamijećene. Taj rezultat se slaže s zamijećenim postotkom preživljenja bakterije *S. Typhimurium* LT21 nakon ispitivanja citotoksičnog učinka benzoksantenskih lignana, a na grafičkom prikazu sa slike 9 se može vidjeti kako je bakterija najveći postotak preživljenja imala nakon tretmana sa spojem CT-A1.

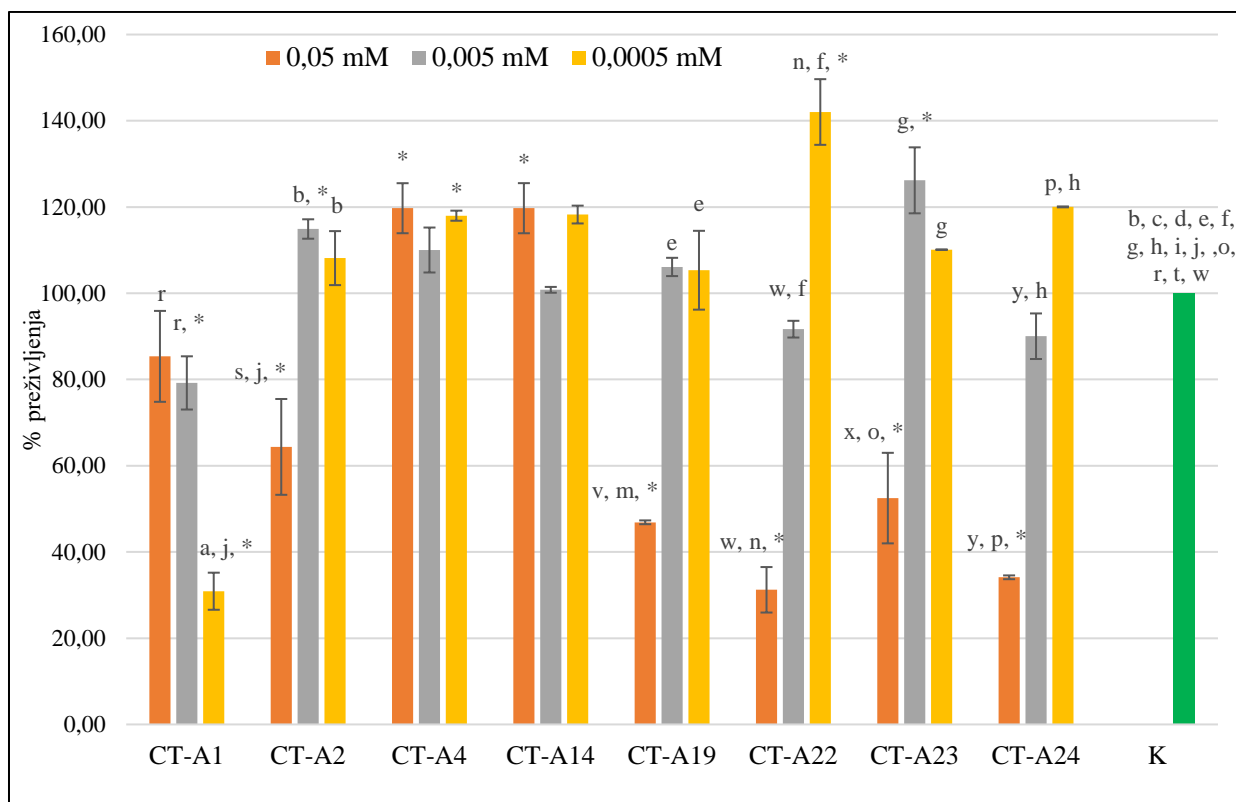
Međutim, iako je promjena hidrofobnosti stanične stijenke mogla dovesti do lize određenog broja stanica *S. Typhimurium* LT21, veliki postotak stanica je ipak preživio, a zbog toga ti rezultati nisu idealni, jer promjena iz hidrofilne u ekstremno hidrofobnu staničnu stijenku može dovesti do toga da se *S. Typhimurium* puno učestalije i snažnije veže za epitelne stanice probavnog sustava, što je suprotno od učinka kojeg se htjelo postići djelovanjem benzoksantenskih lignana.

Iako slična istraživanja promjene hidrofobnosti stanične stijenke nakon djelovanja benzoksantenskih lignana nisu provedena, Majtánová i Majtán su proveli istraživanje promjene hidrofobnosti stanične stijenke na bakteriji *S. Typhimurium* nakon djelovanja razrijeđenih otopina uobičajenih sredstava za dezinfekciju. Takva sredstva redom sadrže polarne spojeve poput alkohola, diamin tetraacetata ili didecildimetilamonijevog klorida, a rezultati su pokazali da su takva sredstva djelovala tako da je došlo do smanjenja

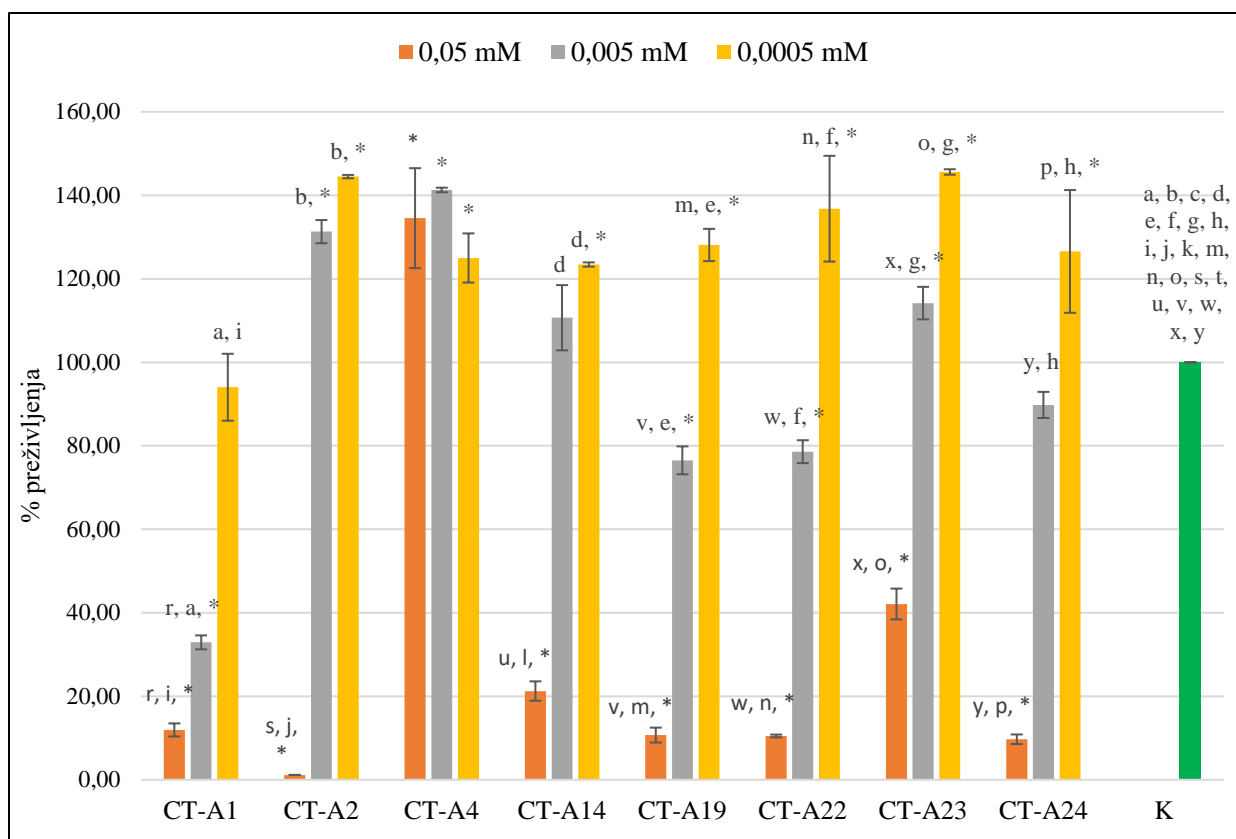
hidrofobnosti stanične stijenke i povećanja polarnosti (58), a zbog toga se potvrđuje zaključak da bi u slučaju bakterija roda *Salmonella* kao antibakterijski antibiotik trebalo koristiti puno manje i polarnije spojeve nego što su benzoksantenski lignani.

4.4. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI BENZOKSANTENSKIH LIGNANA NR METODOM NA HUMANOJ STANIČNOJ LINIJI HEPATOCELULARNOG KARCINOMA (HepG2)

Citotoksični učinak benzoksantenskih lignana u koncentracijama od 0,05, 0,005 i 0,0005 mmol L⁻¹ je ispitivan na humanoj staničnoj liniji HepG2 korištenjem Neutral red metode, a vrijeme tretmana je bilo 2 i 24 h. Rezultati su prikazani grafički kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolu, na slikama 15 i 16.



Slika 15. Prikaz % preživljenja HepG2 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama benzoksantenskih lignana u trajanju od 2 h. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,05 mM, b - CT-A2 0,05 mM, c - CT-A4 0,05 mM, d - CT-A14 0,05 mM, e - CT-A19 0,05 mM, f - CT-A22 0,05 mM, g - CT-A23 0,05 mM, h - CT-A24 0,05 mM, i - CT-A1 0,005 mM, j - CT-A2 0,005 mM, m - CT-A19 0,005 mM, n - CT-A22 0,005 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,005 mM, r - CT-A1 0,0005 mM, s - CT-A2 0,0005 mM, t - CT-A4 0,0005 mM, v - CT-A19 0,0005 mM, w - CT-A22 0,0005 mM, x - CT-A23 0,0005 mM, y - CT-A24 0,0005 mM.



Slika 16. Prikaz % preživljenja HepG2 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama benzoksantenskih lignana u trajanju od 24 h. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,05 mM, b - CT-A2 0,05 mM, c - CT-A4 0,05 mM, d - CT-A14 0,05 mM, e - CT-A19 0,05 mM, f - CT-A22 0,05 mM, g - CT-A23 0,05 mM, h - CT-A24 0,05 mM, i - CT-A1 0,005 mM, j - CT-A2 0,005 mM, k - CT-A4 0,005 mM, l - CT-A14 0,005 mM, m - CT-A19 0,005 mM, n - CT-A22 0,005 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,005 mM, r - CT-A1 0,0005 mM, s - CT-A2 0,0005 mM, t - CT-A4 0,0005 mM, u - CT-A14 0,0005 mM, v - CT-A19 0,0005 mM, w - CT-A22 0,0005 mM, x - CT-A23 0,0005 mM, y - CT-A24 0,0005 mM.

Rezultati pokazuju da je spoj CT-A1 nakon dvosatnog tretmana u koncentraciji od 0,005 mmol L⁻¹ uzrokovao blagi citotoksični učinak, dok je u koncentraciji 0,0005 mmol L⁻¹ izazvao značajan citotoksični učinak jer je postotak preživljenja stanica bio ispod 30 %. Taj rezultat nije u skladu s očekivanjima, jer se očekuje da bi taj spoj u najvećoj od tri ispitivane koncentracije trebao izazvati najveći citotoksični učinak. Međutim, kad se pogledaju rezultati učinka tog spoja nakon tretmana od 24 h, vidljivo je da je u najvećoj koncentraciji izazvao i najveći citotoksični učinak, gdje je postotak preživljenja stanica bio ispod 20 %. Postojao je

i dozni odgovor između koncentracija i preživljenja stanica, jer je postotak preživljenja stanica bio veći sa smanjenjem koncentracije tog spoja.

Dvosatni tretman stanica spojem CT-A2 u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹ je izazvao statistički značajan, ali blagi citotoksični učinak. Manje koncentracije tog spoja su nakon 2 h izazvale blagi proliferativni učinak. Nakon tretmana od 24 h je spoj CT-A2 u najvećoj koncentraciji izazvao jaki citotoksični učinak na stanice, dok su manje koncentracije izazvale statistički značajan proliferativni učinak, što se može objasniti prilagodbom stanica na novonastale uvjete. Spatafora i sur. su također dokazali jaki citotoksični učinak spoja CT-A2, koji je bio više učinkovit u inhibiciji rasta tumorskih stanica crijeva i pluća od 5-fluorouracila, već postojećeg protutumorskog lijeka (3).

Spoj CT-A4 je u sve tri ispitivane koncentracije nakon tretmana od 2 i od 24 h izazvao staničnu proliferaciju pa se može zaključiti da na stanice HepG2 uopće nema citotoksičan učinak.

Nakon dvosatnog tretmana spojem CT-A14 je zamijećen nikakav ili blago proliferativni učinak na stanice u sve tri ispitivane koncentracije, dok je nakon 24 h u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹ izazvao citotoksični učinak, a u manjim koncentracijama nikakav ili blago proliferativni učinak.

Tretman spojem CT-A19 u najvećoj koncentraciji je nakon 2 h rezultirao citotoksičnim učinkom gdje je postotak preživljenja stanica bilo otprilike 50 %, a manje koncentracije nisu iskazale nikakav statistički značajan učinak na stanice. Nakon tretmana od 24 h, zamijećen je pojačani citotoksični učinak tog spoja u najvećoj koncentraciji, gdje je postotak preživljenja stanica bio manji od 20 %. Koncentracija tog spoja od 0,005 mmol L⁻¹ je nakon 24 h izazvala blagi citotoksični učinak, dok je koncentracija od 0,0005 mmol L⁻¹ izazvala blago proliferativni učinak. Nakon 24 h je vidljiv i dozni odgovor između koncentracija i preživljenja stanica nakon tretmana ovim spojem, jer je vidljivo da sa smanjenjem koncentracije postotak preživljenja stanica statistički značajno raste.

Spoj CT-A22 je nakon dvosatnog tretmana u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹ izazvao citotoksični učinak, u koncentraciji od 0,005 mmol L⁻¹ nije izazvao nikakav statistički značajan učinak, a u koncentraciji od 0,0005 mmol L⁻¹ je izazvao jaki proliferativni učinak, gdje je postotak preživljenja stanica bio iznad 140 %. Nakon 24 h u najvećoj koncentraciji izaziva jaki citotoksični učinak, u srednjoj koncentraciji blagi citotoksični učinak, a u najmanjoj koncentraciji blagi proliferativni učinak. Također, vidljiv je i dozni odgovor

između koncentracija i preživljenja stanica nakon tretmana ovim spojem, jer je vidljivo da sa smanjenjem koncentracije postotak preživljenja stanica statistički značajno raste.

Tretman stanica spojem CT-A23 u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹ nakon dva h izaziva umjereni citotoksični učinak. U koncentraciji od 0,005 mmol L⁻¹ izaziva blagi proliferativni, a u koncentraciji od 0,0005 mmol L⁻¹ nikakav statistički značajan odgovor. Nakon 24 h, u najvećoj koncentraciji izaziva umjeren citotoksični učinak, dok u dvije manje koncentracije izaziva blago proliferativni učinak na stanice.

Naposljetku, spoj CT-A24 nakon dvosatnog tretmana u dvije manje koncentracije ne izaziva nikakav statistički značajan učinak na stanice, dok u najvećoj koncentraciji izaziva citotoksični učinak. Nakon 24 h, u najvećoj koncentraciji izaziva jaki citotoksični učinak, u srednjoj koncentraciji nikakav učinak, a u najmanjoj izaziva blagi proliferativni učinak. Postoji i dozni slijed između postotka preživljenja stanica i određene koncentracije spoja, a vidljivo je da se taj postotak sa povećanjem koncentracije spoja smanjuje.

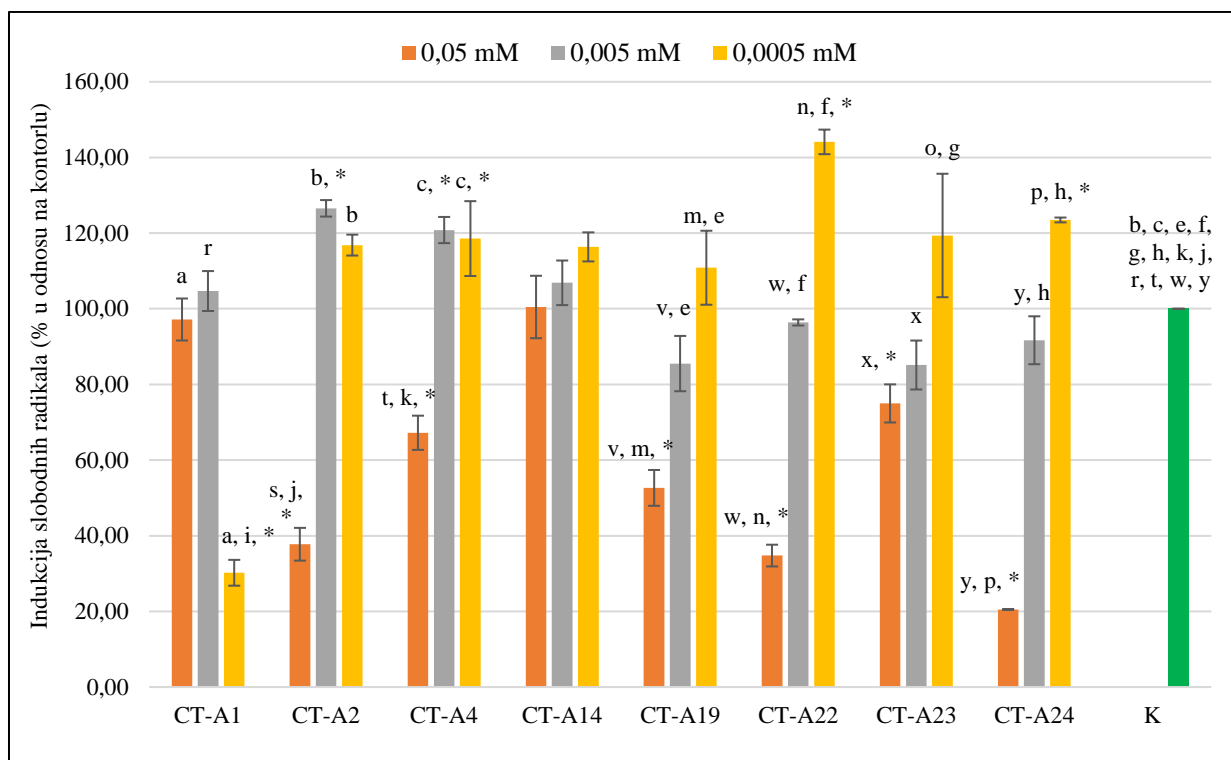
Valja zamijetiti da su spojevi CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24 analozi spoja CT-A2, sintetizirani po uzoru na njega jer se u dosadašnjim istraživanjima dokazalo da spoj CT-A2 ima najveći citotoksični učinak na tumorske stanice, a dokazano je i da feniletalna skupina tog spoja dodatno stabilizira vezanje u manje utore u molekuli DNA pomoću Van der Waalsovih sila (3). Vijayakurup i sur. su dokazali da je spoj CT-A2 puno učinkovitije inhibirao rast stanica kolorektalnog karcinoma od spoja CT-A1, koji mu je analogan, ali nema feniletalnu skupinu (60). Međutim, pokazalo se da bočne metoksi skupine nisu mogle tvoriti vodikove veze s DNA pa se time može objasniti zašto su spojevi izvedeni od spoja CT-A2 ipak iskazali manji citotoksičan učinak. Spoj CT-A4 u strukturi ne posjeduje feniletalnu skupinu i posjeduje najmanje polarnih skupina od ostalih spojeva što dovodi do toga da on uopće ne izaziva citotoksični učinak na HepG2 stanice.

Spoj CT-A14 u strukturi nema feniletalnu skupinu i ima metoksi skupine pa se time može objasniti zašto je izazvao citotoksični učinak samo u najvećoj koncentraciji i samo nakon 24 h od tretiranja stanica. Di Micco i sur. su pak dokazali da spoj CT-A14 ipak iskazuje malo veći citotoksični učinak od svog analoga, spoja CT-A1, što nije u skladu s ovdje pokazanim rezultatima. Međutim, razlike nisu drastične pa se može zaključiti da oba spoja u približnoj mjeri inhibiraju rast tumorskih stanica, ali bi spoj CT-A1 mogao imati veći potencijal jer ima manji broj metoksi skupina od spoja CT-A14 i veći broj hidroksilnih skupina, koje su izazivo važne za tvorbu vodikovih veza s molekulom DNA.

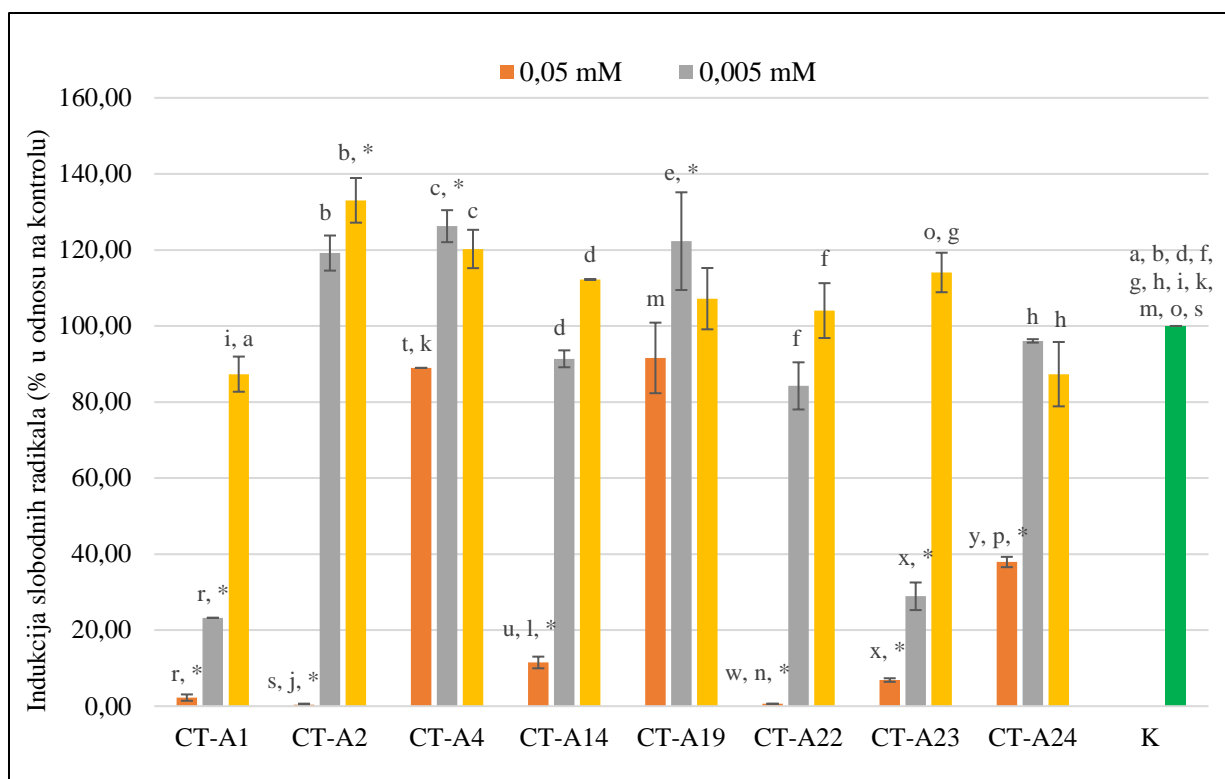
Također, općenito se može zaključiti da 2 h nisu bila dovoljna da spojevi ispolje svoje citotoksične ili proliferativne učinke na stanice jer su određeni postoci preživljenja stanica, barem u koncentracijama od 0,05 mmol L⁻¹, bili najmanji nakon tretmana od 24 h. Usto, najveća ispitivana koncentracija od 0,05 mmol L⁻¹ je pokazala najveće citotoksične učinke, dok je najmanja koncentracija uglavnom uzrokovala proliferaciju stanica, što se može objasniti time da su se stanice mogle prilagoditi na djelovanje određenih spojeva u tako maloj koncentraciji. Dokazana je važnost postojanja feniletilne i slobodnih hidroksilnih skupina u strukturi benzoksantenskih lignana za učinkovito inhibiranje rasta tumorskih stanica.

4.5. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG UČINKA BENZOKSANTENSKIH LIGNANA DCHF-DA METODOM

Antioksidativno djelovanje benzoksantenskih lignana u koncentracijama od 0,05, 0,005 i 0,0005 mmol L⁻¹ je ispitivano na humanoj staničnoj liniji HepG2 korištenjem DCHF-DA metode, a vrijeme tretmana je bilo 2 i 24 h. Dobivena indukcija slobodnih radikala je korigirana u odnosu na postotak preživljenja stanica koji je prethodno određen Neutral red metodom. Rezultati su prikazani grafički na slikama 17 i 18 .



Slika 17. Prikaz utjecaja pojedinih spojeva na indukciju slobodnih radikala na HepG2 stanice nakon tretmana od 2 h. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,05 mM, b - CT-A2 0,05 mM, c - CT-A4 0,05 mM, e - CT-A19 0,05 mM, f - CT-A22 0,05 mM, g - CT-A23 0,05 mM, h - CT-A24 0,05 mM, i - CT-A1 0,005 mM, j - CT-A2 0,005 mM, k - CT-A4 0,005 mM, m - CT-A19 0,005 mM, n - CT-A22 0,005 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,005 mM, r - CT-A1 0,0005 mM, s - CT-A2 0,0005 mM, t - CT-A4 0,0005 mM, v - CT-A19 0,0005 mM, w - CT-A22 0,0005 mM, x - CT-A23 0,0005 mM, y - CT-A24 0,0005 mM.



Slika 18. Prikaz utjecaja pojedinih spojeva na indukciju slobodnih radikala na HepG2 stanice nakon tretmana od 24 h. K označava kontrolu. Statistički značajno različite vrijednosti ($p < 0,05$) u odnosu na: * - kontrolu, a - CT-A1 0,05 mM, b - CT-A2 0,05 mM, c - CT-A4 0,05 mM, d - CT-A14 0,05 mM, e - CT-A19 0,05 mM, f - CT-A22 0,05 mM, g - CT-A23 0,05 mM, h - CT-A24 0,05 mM, i - CT-A1 0,005 mM, j - CT-A2 0,005 mM, k - CT-A4 0,005 mM, l - CT-A14 0,005 mM, m - CT-A19 0,005 mM, n - CT-A22 0,005 mM, o - CT-A23 0,05 mM, p - CT-A24 0,005 mM, r - CT-A1 0,0005 mM, s - CT-A2 0,0005 mM, t - CT-A4 0,0005 mM, u - CT-A14 0,0005 mM, w - CT-A22 0,0005 mM, x - CT-A23 0,0005 mM, y - CT-A24 0,0005 mM.

Iz rezultata je vidljivo da spoj CT-A1 nakon 2 h tretmana u koncentracijama od 0,05 i 0,005 mmol L⁻¹ nije uzrokovao statistički značajnu promjenu u indukciji slobodnih radikala, dok je u koncentraciji od 0,0005 mmol L⁻¹ izazvao smanjenje postotka indukcije slobodnih radikala u stanici. Nakon 24 h, najveća i srednja koncentracija spoja CT-A1 su također uzrokovale smanjenje postotka indukcije slobodnih radikala u odnosu na kontrolu. Najmanja koncentracija spoja CT-A1 nakon 24 h nije uzrokovala statistički značajnu promjenu u postotku indukcije slobodnih radikala u odnosu na kontrolu. Može se zaključiti da spoj CT-A1 djeluje antioksidativno na HepG2 stanice u najvećoj i srednjoj ispitivanoj koncentraciji, a da taj učinak nije zamijećen nakon 2 h od tretmana jer su se tumorske stanice jetre sposobne

brzo prilagoditi na djelovanje takvih spojeva, kao i na duže djelovanje malih koncentracija ispitivanih spojeva.

Nakon 2 h, zamijećeno je statistički značajno smanjenje indukcije slobodnih radikala uslijed tretmana stanica spojem CT-A2 u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹. Koncentracija od 0,005 mmol L⁻¹ je uzrokovala blago povećanje postotka indukcije slobodnih radikala, dok koncentracija spoja CT-A2 od 0,0005 mmol L⁻¹ nije uzrokovala statističku značajnu promjenu u indukciji slobodnih radikala. Nakon tretmana od 24 h, primijećeni su slični rezultati, pa se može zaključiti da spoj CT-A2 u najvećoj ispitanoj koncentraciji djeluje antioksidativno, a u manjim koncentracijama može djelovati blago prooksidativno.

Dvosatni tretman stanica spojem CT-A4 u najvećoj koncentraciji je rezultirao statistički značajnim smanjenjem postotka indukcije slobodnih radikala u odnosu na kontrolu. Međutim, nakon 24 h nije došlo do statistički značajnog smanjenja postotka indukcije slobodnih radikala. Srednja koncentracija spoja CT-A4 je nakon 2 h uzrokovala blago prooksidativni učinak, što se ponovilo i nakon 24 h. Najmanja koncentracija spoja je nakon dva h uzrokovala blago prooksidativni učinak, ali nakon 24 h od tretmana nije došlo do bilo kakve statistički značajne promjene. Može se zaključiti da najveća od ispitivanih koncentracija može uzrokovati kratkotrajni antioksidativni učinak, ali su se stanice sposobne prilagoditi kroz 24 h od tretmana.

Spoj CT-A14 nakon 2 h od tretmana ni u jednoj koncentraciji nije uzrokovao statistički značajne promjene indukcije slobodnih radikala u odnosu na kontrolu. Nakon 24 h srednja i najveća koncentracija spoja također nije uzrokovala statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu, ali je najveća uzrokovala značajno smanjenje postotka indukcije slobodnih radikala. Može se zaključiti da su se stanice bile sposobne prilagoditi na kratkotrajni učinak djelovanja spoja CT-A14, dok se kroz duže vrijeme ispoljilo antioksidativno djelovanje tog spoja u najvećoj od tri ispitane koncentracije.

Slični rezultati su zamijećeni i za djelovanje spoja CT-A19, koji također nakon 2 h ni u jednoj koncentraciji nije iskazao statistički značajno smanjenje ili povećanje postotka indukcije slobodnih radikala u stanicama. Nakon 24 h je samo srednja ispitivana koncentracija iskazala blagi prooksidativni učinak, a ostale koncentracije nisu iskazale statistički značajne promjene indukcije slobodnih radikala.

Dvosatni tretman stanica spojem CT-A22 najvećom ispitanom koncentracijom je rezultirao jakim antioksidativnim učinkom, a najmanjom ispitanom koncentracijom jakim

prooksidativnim učinkom. Srednja ispitivana koncentracija nije iskazala nikakav statistički značajan učinak u odnosu na kontrolu. Nakon 24 h do tretiranja stanica, spoj CT-A22 u najvećoj koncentraciji utječe na značajno smanjenje postotka indukcije slobodnih radikala u stanici, dok ostale dvije koncentracije ne iskazuju nikakav statistički značajan učinak. Može se zaključiti da spoj CT-A22 djeluje antioksidativno, ali samo u najvećoj od tri ispitivane koncentracije.

Nakon dvosatnog tretmana spojem CT-A23, zamijećeno je statistički značajno smanjenje postotka indukcije slobodnih radikala za najveću ispitivanu koncentraciju, dok najmanja i srednja koncentracija ne uzrokuju statistički značajne promjene. Poslije 24 h, jako antioksidativno djelovanje su iskazale najveća i srednja koncentracija, dok kod najmanje nije bilo zamijećene statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu. Zaključak je da spoj CT-A23 djeluje antioksidativno, ali koncentraciji većoj od 0,0005 mmol L⁻¹.

Spoj CT-A24 uzrokuje statistički značajno smanjenje postotka indukcije slobodnih radikala nakon 2 i 24 h od tretiranja stanica najvećom koncentracijom, a najmanja koncentracija nakon 2 h djeluje blago prooksidativno, iako taj učinak nije primijećen nakon 24 h. Srednja ispitivana koncentracija spoja CT-24 nije ni u jednom slučaju djelovala na statistički značajnu promjenu postotka indukcije slobodnih radikala u stanicama. Zaključak je da spoj CT-A24 djeluje antioksidativno, ali koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹.

Antioksidativno djelovanje spoja CT-A2 u zaštiti suncokretovog ulja od oksidacijskog kvarenja je već dokazano, a spoj CT-A2 se pokazao jednako učinkovit kao alfa tokoferol, prirodno najaktivniji antioksidans topljiv u mastima. Zbog toga je njegovo antioksidativno djelovanje ispitivano u prisutnosti peroksidnih radikala u polarnim i nepolarnim medijima, odnosno u klorbenzenu i acetonitrilu. Spoj CT-A2 je pokazao učinkovito antioksidativno djelovanje u oba otapala, s tim da su za reakciju s peroksidnim radikalima bili odgovorni hidroksili na položajima 6, 9 i 10 C atoma (3, 60).

To znači da bi benzoksantenski lignani mogli biti učinkoviti antioksidansi i u biološkim medijima, ali bi utjecaj pojedinih bočnih skupina na njihovo antioksidativno djelovanje trebalo podrobnije ispitati. Iz ovdje prikazanih rezultata se može zaključiti da spojevi CT-A2, CT-A22, CT-A23 i CT-A24 mogu djelovati kao učinkoviti antioksidansi nakon 2 i 24 h od tretmana u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹, a tu se ogleda važnost bočne fenilne skupine koju posjeduju.

Antioksidativno djelovanje benzoksantenskih lignana bi trebalo ispitati i pomoću drugih metoda za mjerenje antioksidativnog kapaciteta. DCHF-DA metoda nije uvijek pouzdana jer mitohondrijski protein citokrom c, koji ulazi u citosol kad stanica uđe u apoptozu, može direktno ili indirektno oksidirati DCHF pri čemu nastaje lažni odziv u indukciji sinteze slobodnih radikala koji potječe od apoptičnih stanica. Također, ne može se uvijek pretpostaviti da kontrola i ispitivani uzorci generiraju DCF s istom efikasnošću i linearnom ovisnošću između redoks reakcija uzrokovanih DCF radikalom (47).

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog ispitivanja antibakterijskog, citotoksičnog i antioksidativnog djelovanja benzoksantenskih lignana, zaključeno je:

1. Benzoksantenski lignani ne iskazuju značajnu antibakterijsku aktivnost protiv Gram negativnih bakterija, s tim da povećavaju hidrofobnost stanične stijenke bakterije *Salmonella enterica* serotip Typhimuirum LT21 u koncentracijama od 0,5 i 0,05 mmol L⁻¹.
2. Benzoksantenski lignani iskazuju značajnu antibakterijsku aktivnost protiv Gram pozitivnih bakterija, posebice onih roda *Lactobacillus*, u koncentracijama od 0,5 i 0,05 mmol L⁻¹.
3. Spoj CT-A1 bi se mogao koristiti kao učinkovit antibakterijski agens protiv bakterije *Staphylococcus aureus*, posebice u koncentraciji od 0,5 mmol L⁻¹.
4. Svi benzoksantenski lignani, osim spoja CT-A4, su nakon 24 h iskazali značajan citotoksični učinak na stanice humanog karcinoma jetre u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹. Dokazana je važnost postojanja bočne fenilne i slobodnih hidroksilnih skupina u strukturi benzoksantenskih lignana za učinkovito inhibiranje rasta tumorskih stanica.
5. Svi benzoksantenski lignani mogu djelovati kao antioksidansi u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹, a za njihovo djelovanje su odgovorni slobodni hidroksili na položajima 6, 9 i 10 C atoma. Spojevi CT-A2, CT-A22, CT-A23 i CT-A24 djeluju kao učinkoviti antioksidansi nakon 2 i 24 h od tretmana u koncentraciji od 0,05 mmol L⁻¹, a njihovo antioksidativno djelovanje vjerojatno pojačavaju bočne fenilne skupine koje posjeduju.

6. LITERATURA

1. Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., et al. (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug Resist.* **11**, 1645–1658. doi: 10.2147/IDR.S173867
2. Di Micco, S., Mazué, F., Daquino, C., Spatafora, C., Delmas, D., Latruffe, N., Tringali, C., Riccio, R., Bifulco, G. (2011) Structural basis for the potential antitumour activity of DNA-interacting benzo[*kl*]xanthene lignans. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 701-10. doi: 10.1039/c0ob00480d
3. Spatafora, C., Barresi, V., Bhusainahalli, V.M., Di Micco, S., Musso, N., Riccio, R., Bifulco, G., Condorelli, D., Tringali, C. (2014) Bio-inspired benzo[*k,l*]xanthene lignans: synthesis, DNA-interaction and antiproliferative properties. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 2686-701. doi: 10.1039/c3ob42521e
4. Pulvirenti, L. (2017) Natural or Bio-inspired Polyphenols in the Synthesis of Potential Chemotherapeutic Agents. PhD Thesis. University of Catania.
5. Daquino, C., Rescifina, A., Spatafora, C., Tringali, C. (2009) Biomimetic Synthesis of Natural and “Unnatural” Lignans by Oxidative Coupling of Caffeic Esters. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6289–6300. doi: 10.1002/ejoc.200900804
6. Šušković, J., Kos, B., Novak, J. (2016): Predavanje iz modula „Tehnologija antibiotika“, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <https://moodle.srce.hr/20162017/pluginfile.php/1115908/mod_resource/content/1/antibiotici%207_2017.pdf>. Pristupljeno: 10. kolovoza 2019.
7. Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **33**, 300-305. doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15
8. Munita, J.M., Arias, C.A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**, 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
9. Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., et al. (2017) Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg. Infect. Control* **12**, Doc05. doi: 10.3205/dgkh000290

10. Zgurskaya, H. I., López, C. A., Gnanakaran, S. (2015) Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect. Dis.* **1**, 512–522. doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00097
11. Auer, G.K., Weibel, D.B. (2017) Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry* **56**, 3710–3724. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00346
12. Jang, J., Hur, H.G., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., Ishii, S. (2017) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J. Appl. Microbiol.* **123**, 570-581. doi: 10.1111/jam.13468
13. Ebbensgaard, A., Mordhorst, H., Aarestrup, F.M., Hansen, E.B. (2018) The Role of Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides for the Sensitivity of *Escherichia coli* to Antimicrobial Peptides. *Front. Microbiol.* **9**, 2153. doi: 10.3389/fmicb.2018.02153
14. Nikaido, H., Pagès, J.M. (2012) Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 340-63. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x
15. Johnson, R., Ravenhall, M., Pickard, D., Dougan, G., Byrne, A., Frankel, G. (2018) Comparison of *Salmonella enterica* Serovars Typhi and Typhimurium Reveals Typhoidal Serovar-Specific Responses to Bile. *Infect. Immun.* **86**, e00490-17. doi: 10.1128/IAI.00490-17
16. Veeraraghavan, B., Pragasam, A. K., Bakthavatchalam, Y. D., Ralph, R. (2018) Typhoid fever: issues in laboratory detection, treatment options & concerns in management in developing countries. *Future Sci. OA* **4**, FSO312. doi: 10.4155/fsoa-2018-0003
17. Wang, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W., Yue, M. (2019) Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996. and 2016. *Front. Microbiol.* **10**, 985. doi: 10.3389/fmicb.2019.00985
18. Bonnington, K. E., Kuehn, M. J. (2016) Outer Membrane Vesicle Production Facilitates LPS Remodeling and Outer Membrane Maintenance in *Salmonella* during Environmental Transitions. *mBio* **7**, e01532-16. doi: 10.1128/mBio.01532-16
19. Nobre, T. M., Martynowycz, M. W., Andreev, K., Kuzmenko, I., Nikaido, H., Gidalevitz, D. (2015) Modification of *Salmonella* Lipopolysaccharides Prevents the Outer Membrane Penetration of Novobiocin. *Biophys. J.* **109**, 2537–2545. doi: 10.1016/j.bpj.2015.10.013

20. Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **455**, 29-60. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00064-6
21. Sugiyama, K., Yamada, M., Awogi, T., Hakura, A. (2016) The strains recommended for use in the bacterial reverse mutation test (OECD guideline 471) can be certified as non-genetically modified organisms. *Genes Environ.* **38**, 2. doi:10.1186/s41021-016-0030-3
22. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A. (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 620–630. doi: 10.1038/nrmicro3480
23. Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M. A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149-67. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
24. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 234-58. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
25. Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414
26. Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., Fowler, V. G. Jr. (2019) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 203-218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4.
27. Josse, J., Laurent, F., Diot, A. (2017) Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front. Microbiol.* **8**, 2433. doi: 10.3389/fmicb.2017.02433
28. Chapot-Chartier, M. P., Kulakauskas, S. (2014) Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* **13**, S9. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9
29. Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., Hébraud, M. (2006) Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **256**, 1-15. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00122.x
30. Simons, L. A., Amansec, S. G., Conway, P. (2006) Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **16**, 531-5. doi: 10.1016/j.numecd.2005.10.009
31. Šimelyte, E., Rimpiläinen, M., Lehtonen, L., Zhang, X., Toivanen, P. (2000) Bacterial cell wall-induced arthritis: chemical composition and tissue distribution of four *Lactobacillus* strains. *Infect. Immun.* **68**, 3535–3540. doi: 10.1128/iai.68.6.3535-3540.2000

32. Gad, G. F., Abdel-Hamid, A. M., Farag, Z. S. (2014) Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Braz. J. Microbiol.* **45**, 25–33. doi: 10.1590/s1517-83822014000100005
33. Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., et al. (2015) Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29**, 84–91. doi: 10.1080/13102818.2014.987450
34. Di, L., Artursson, P., Avdeef, A., Ecker, G. F., Faller, B., Fischer, H., Houston, J. B., Kansy, M., Kerns, E. H., Krämer, S. D., Lennernäs, H., Sugano, K. (2012) Evidence-based approach to assess passive diffusion and carrier-mediated drug transport. *Drug Discov. Today* **17**, 905–12. doi: 10.1016/j.drudis.2012.03.015.
35. Yang, N. J., Hinner, M. J. (2015) Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol. Biol.* **1266**, 29–53. doi: 10.1007/978-1-4939-2272-7_3
36. Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Bennett, B., Zielonka, J. (2018) Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox Biol.* **15**, 347–362. doi: 10.1016/j.redox.2017.12.012
37. Bouchez, C., Devin, A. (2019) Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Cells* **8**, 287. doi: 10.3390/cells8040287
38. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., et al. (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 8416763. doi: 10.1155/2017/8416763
39. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015) Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **30**, 11–26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0
40. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., et al. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* **13**, 757–772. doi: 10.2147/CIA.S158513
41. Lecci, R. M., Logrieco, A., Leone, A. (2014) Pro-oxidative action of polyphenols as action mechanism for their pro-apoptotic activity. *Anticancer Agents Med. Chem.* **14**, 1363–75. doi: 10.2174/1871520614666140922121014

42. Syal, K., Mo, M., Yu, H., Iriya, R., Jing, W., Guodong, S., et al. (2017) Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics* **7**, 1795–1805. doi: 10.7150/thno.19217
43. Chen, J., Luo, X., Qiu, H., Mackey, V., Sun, L., Ouyang, X. (2018) Drug discovery and drug marketing with the critical roles of modern administration. *Am. J. Transl. Res.* **10**, 4302–4312, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6325519/>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2019.
44. Shaw, D. L. (2017) Is Open Science the Future of Drug Development? *Yale J. Biol. Med.* **90**, 147–151, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5369032/>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2019.
45. Rozgonyi, F., Szitha, K. R., Ljungh, Å., Baloda, S. B., Hjertén, S., Wadström, T. (1985) Improvement of the salt aggregation test to study bacterial cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**, 131–138. doi: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb00999.x
46. Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125–31. doi: 10.1038/nprot.2008.75.
47. Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., et al. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1–6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
48. Nikaido, H. (1976) Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochim. Biophys. Acta.* **433**, 118–32, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/769835>>. Pristupljeno 19. kolovoza 2019.
49. Fair, R. J., Tor, Y. (2014) Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* **6**, 25–64. doi: 10.4137/PMC.S14459
50. Maley, A. M., Arbiser, J. L. (2013) Gentian violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century. *Exp. Dermatol.* **22**, 775–780. doi: 10.1111/exd.12257
51. Coorevits, L., Boelens, J., Claeys, G. (2015) Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1207–1212. doi: 10.1007/s10096-015-2349-2
52. Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., Božić Luburić, Đ., Varga, I., Terzić, S. (2018) Kolistin, polipeptidni antibiotik zadnje obrane protiv invazivnih Gram-negativnih bakterija. *Veterinarska stanica* **49**, 273–286, <<http://veterina.com.hr/?p=70759>>. Pristupljeno 20. kolovoza 2019.

53. Chemspider. (2017) Royal Society of Chemistry. Chemspider - Search and share chemistry, <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9270105.html>>. Pristupljeno 20. kolovoza 2019.
54. Favela-Hernández, J. M., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., Camacho-Corona, M. R. (2012) Antibacterial and antimycobacterial lignans and flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytother. Res.* **26**, 1957-60. doi: 10.1002/ptr.4660
55. Hassoun, A., Linden, P. K., Friedman, B. (2017) Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit. Care* **21**, 211. doi: 10.1186/s13054-017-1801-3
56. Blaabjerg, S., Artzi, D. M., Aabenhus, R. (2017) Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Outpatients-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics (Basel)* **6**, 21. doi: 10.3390/antibiotics6040021
57. Lugea, A., Salas, A., Casalot, J., Guarner, F., Malagelada, J. (2000) Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut* **46**, 515–521. doi: 10.1136/gut.46.4.515
58. Majtánová, L., Majtán, V. (2003) Effect of disinfectants on surface hydrophobicity and mobility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Ceska Slov. Farm.* **52**, 141-7, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12789775>>. Pristupljeno 22. kolovoza 2019.
59. Vijayakurup, V., Spatafora, C., Tringali, C., Jayakrishnan, P. C., Srinivas, P., Gopala, S. (2014) Phenethyl caffeate benzoxanthene lignan is a derivative of caffeic acid phenethyl ester that induces bystander autophagy in WiDr cells. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 85–94. doi: 10.1007/s11033-013-2840-8
60. Spatafora, C., Daquino, C., Tringali, C., Amorati, R. (2013) Reaction of benzoxanthene lignans with peroxy radicals in polar and non-polar media: cooperative behaviour of OH groups. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 4291-4. doi: 10.1039/c3ob40723c.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Kristina Žuna