

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Marija S. Ivanov

Mehanizmi delovanja odabranih flavonoida,
terpena i nitratnih estara heterocikličnih
jedinjenja na izolate *Candida albicans* iz
usne duplje čoveka

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

University of Belgrade
Faculty of Biology

Marija S. Ivanov

Mechanisms by which selected flavonoids,
terpenes and nitrate esters of heterocyclic
compounds exert activity towards *Candida*
albicans strains isolated from the human
oral cavity

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Mentori:

dr Jasmina Glamočlija
Naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"
Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Lozo
Vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Marina Soković
Naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Mikološkoj laboratoriji Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” uz podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, projekat OI173032 „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida“.

Veliko hvala dr Jasmini Glamočliji, mentoru i dr Marini Soković, članu komisije, na ukazanom poverenju, pruženim mogućnostima i pre svega na usmeravanju mog istraživačkog rada i uvođenju u svet nauke.

Veliko hvala dr Jeleni Lozo, mentoru, koja je svojim korisnim savetima, efikasnim vođenjem ove doktorske disertacije i pre svega pozitivnim stavom omogućila da proces doktoriranja prođe uz znatno manje stresa nego što je očekivano.

Hvala Prof. Dominique Sanglard i dr Abhilash Kannan koji su mi omogućili stručno usavršavanje i izradu eksperimenata koji su doprineli završnom izgledu ove disertacije.

Hvala i Federaciji evropskog udruženja mikrobiologa (FEMS) koji su mi svojom stipendijom (FEMS-GO-2017-015) omogućili da deo eksperimenata obavim u Mikrobiološkoj Laboratoriji Univerziteta u Lozani, Švajcarska. Hvala Prof. Panagiotis Zoumpoulakisu koji mi je omogućio boravak na Nacionalnoj helenskoj istraživačkoj fondaciji u Atini i time mi omogućio sticanje uvida u različite metode in silico predikcija. Hvala Prof. Simoni Golić Grdadolnik sa Hemijskog Instituta u Ljubljani jer mi je zahvaljujući bilatelarnom projektu (Kombinovana metodologija u cilju dobijanja novih, selektivnih inhibitora Candida CYP51) omogućila izradu eksperimenata kojima je vršen odabir najaktivnijih inhibitora proteina CYP51. Hvala Doc. Snežani Sanković Babić na omogućenom nesmetanom sakupljanju uzoraka Candida albicans na Klinici za uvo grlo i nos, Kliničko Bolničkog centra Zvezdara.

Hvala kolegi Dejanu Stojkoviću koji je doprineo usmeravanju mog naučnog interesa i učinio da zajednički rad u laboratoriji bude pre svega zabava. Hvala kolegi dr Milošu Nikoliću koji mi je svojim šalama olakšao početke na novom radnom mestu i uveo me u tehnike mikrobiologije. Hvala kolegicama Marini Kostić, dr Jovani Petrović i dr Ani Ćirić na vedroj atmosferi u laboratoriji koja je učinila da odlazak na posao bude zadovoljstvo a ne obaveza.

Veliko hvala drugaricama sa Biološkog fakulteta i društvu iz Studenjaka jer su smehom i pozitivnom energijom ispunili moje slobodno vreme. Roditeljima, sestri i suprugu hvala pre svega na višegodišnjoj podršci, poverenju i vedrini kojom gledaju na život.

Mehanizmi delovanja odabranih flavonoida, terpena i nitratnih estara heterocikličnih jedinjenja na izolate *Candida albicans* iz usne duplje čoveka

Sažetak

Vrsta *Candida albicans* jedan je od najčešćih uzročnika gljivičnih infekcija ljudi. U okviru ove doktorske disertacije ispitivani su mehanizmi antifungalnog delovanja 9 flavonoida (apigenin, apigetrin, astragalin, kvercetin, kvercitrin, izokvercitrin, rutin, luteolin i viteksin), 2 terpena (kamfor i eukaliptol) i 4 nitratna estera heterocikličnih jedinjenja (N-(2-nitroksietil)-1H-indol-2-karboksamid (MK55), N-(2-nitroksietil)-hinolin-2-karboksamid (MK56), N-(2-nitroksietil)-6-(piperidin-1-il)-9H-purin acetamid (MK94), 5'-O-nitro adenzin (MK129)).

Najbolju antifungalnu aktivnost ispoljili su nitratni esteri heterocikličnih jedinjenja. U smanjenju razvoja virulentnosti ove gljive, nastanku biofilma i formiranju hifalnih ćelija, istakla se aktivnost flavonoida, posebno apigetrina, apigenina i izokvercitrina.

Razvoj antifungalne rezistencije *C. albicans* povezan je sa povećanjem aktivnosti efluksne pumpe kodiranih genima *MDR1*, *CDR1* i *CDR2*. Promene u ekspresiji ovih gena zabeležene su nakon tretmana astragalinom i apigeninom (smanjenje ekspresije *CDR1*), kamforom (povećanje ekspresije *CDR1*, smanjenje ekspresije *CDR2*) i eukaliptolom (povećanje ekspresije *CDR1* i *CDR2*), ukazujući na potencijalna korisna svojstva flavonoida, ali i moguće neželjene posledice primene testiranih terpena. Rezistencija je povezana i sa povećanom ekspresijom *ERG11*, gena koji kodira protein lanosterol 14 α -demetilazu (*CYP51*), ciljno mesto azolnih lekova. Izokvercitrin i MK94 izazivaju neželjeno povećanje, dok MK55 redukuje nivo ekspresije ovog gena. Mehanizam antifungalnog delovanja MK55 obuhvata i inhibiciju fungalnog proteina *CYP51*.

Narušavanje integriteta ćelijske membrane, kao potencijalnog mehanizma delovanja, potvrđeno je za apigenin, apigetrin i astragalin.

Upotreba MK55, MK94, apigenina, apigetrina, rutina, kvercetina, kvercitrina, izokvercitrina, luteolina i kamfora može se smatrati bezbednom, dok se eukaliptol zbog svog citotoksičnog efekta prema ćelijama jetre ne preporučuje za potencijalnu primenu u antifungalnoj terapiji.

Ključne reči: flavonoidi, terpeni, heterociklična jedinjenja, antifungalna aktivnost, *Candida albicans*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Mechanisms by which selected flavonoids, terpenes and nitrate esters of heterocyclic compounds exert activity towards *Candida albicans* strains isolated from the human oral cavity

Abstract

Candida albicans is among the most common human fungal pathogens. Mode of antifungal action has been tested for 9 flavonoids (apigenin, apigenin, astragalol, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin, luteolin and vitexin), 2 terpenes (camphor and eucalyptol) and 4 nitrate esters of heterocyclic compounds (N-(2-nitrooxyethyl)-1H-indol-2-carboxamide (MK55), N-(2-nitrooxyethyl)-quinoline-2-carboxamide (MK56), N-(2-nitrooxyethyl)-6-(piperidin-1-yl)-9H-purine acetamide (MK94), 5'-O-nitroadenosine (MK129)).

The most prominent anticandidal activity has been proven for nitrate esters of heterocyclic compounds. Significant activity of flavonoids, especially apigenin, apigenin and isoquercitrin, could be noticed in reducing fungal virulence, biofilm formation and hyphal growth.

Resistance to antifungal therapy is linked to increased activity of *C. albicans* efflux pumps encoded by *MDR1*, *CDR1* and *CDR2*. Disturbance in expression levels of these genes has been observed after treatment with astragalol and apigenin (decreased *CDR1* expression), camphor (increased *CDR1* and decreased *CDR2* expression) and eucalyptol (increased *CDR1* and *CDR2* expression levels), suggesting possible beneficial antimicrobial effects of flavonoids as well as potential harmful consequences of selected terpenes application.

Antifungal resistance is also linked to increased expression of *ERG11*, gene encoding for lanosterol 14 α -demethylase (CYP51), target protein for azole antifungals. Treatment with isoquercitrin and MK94 led to increased expression of this gene, while treatment with MK55 reduced it. Mode of action for MK55 involves inhibition of CYP51 enzyme. Damage of fungal cell membrane as a potential mechanism of antifungal activity has been observed for apigenin, apigenin and astragalol.

Application of MK55, MK94, apigenin, apigenin, rutin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, luteolin and camphor could be considered safe, based on the results of

their cytotoxicity towards the liver cell line, while eucalyptol should be used with serious precaution.

Keywords: flavonoids, terpenes, heterocyclic compounds, antifungal activity, *Candida albicans*.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology of eukaryotes

Lista skraćenica

ABC transporteri – grupa efluks pumpi koja koristi energiju ATPa (ATP-binding cassette)

ACT1 – gen koji kodira za aktin (engl. **Actin**)

Als3 – invazin asociranim sa hifama (**Agglutinin-Like Sequence**)

ATP – adenzin trifosfat (**Adenosine triphosphate**)

BCR1 – transkripcioni faktor (**Biofilm and Cell Wall Regulator**)

BCRP – protein rezistencije raka dojke (**Breast Cancer Resistance Protein**)

CaCYP – lanosterol 14 α -demetilaza poreklom iz *Candida albicans*

cAMP – ciklični adenzin monofosfat (**Cyclic adenosine monophosphate**)

cDNK – komplementarna DNK (engl. complementary DNA)

CDR1 i *CDR2* – geni koji kodiraju proteine efluks pump i povezani su sa rezistencijom (**Candida Drug Resistance**)

Ct – trenutak u qPCR reakciji u kome intenzitet fluorescentnog signala dostiže granicu (engl. **Cycle threshold**)

CYP51 – lanosterol 14 α -demetilaza, protein koji spada u grupu citohroma P450 (**Cytochrome P450**)

DEPC – dietil pirokarbonat (**diethyl pyrocarbonate**)

DMEM medijum – medijum za gajenje ćelija (**Dulbecco's Modified Eagle Medium**)

DMSO – dimetilsulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DRE – cis regulatorni element koji reguliše ekspresiju *CDR* gena (**Drug-Responsive Element**)

DTT - ditiotreitrol

ECE1 – gen uključen u hifalni rast ćelije (**Extent of cell elongation**)

EDTA – etilendiaminetetraacetična kiselina

EED1 – gen neophodan za preživljavanje u epitelu domaćina (**Epithelial Escape and Dissemination 1**)

ERG11 – gen koji kodira za CYP51 protein i uključen je u biosintezu ergosterola

ERG11 – gen koji kodira za lanosterol 14 α -demetilazu, enzim uključen u biosintezu ergosterola

hCYP – protein CYP51 humanog porekla

HUVE – ćelijska linija humane umbilikalne vene (**H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial)

HWPI – gen koji kodira protein ćelijskog zida hifa (**H**yp**H**al **W**all **P**rotein)

HYRI – gen koji reguliše hifalni rast (**H**yp**H**ally **R**egulated gene)

IC₅₀ – koncentracija koja inhibira 50 % targeta (**I**nhibitory **C**oncentration)

INT – jodonitrotetrazolijum hlorid (**I**odonitrotetrazolium chloride)

K_D – konstanta disocijacije

LC₅₀ – 50 % letalne koncentracije (**L**ethal **C**oncentration)

LiCl – litijum hlorid

LINCS – algoritam koji se koristi kako bi simulacije molekularne dinamike zadovoljile drugi Njutnov zakon (**L**INear **C**onstraint **S**olver)

MD – molekularna **D**inamika

MDRI – gen koji kodira membranski transportni protein, efluks pumpu, i utiče na nastanak rezistencije (**M**ulti-**D**rug **R**esistance)

MFK – minimalna fungicidna koncentracija

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Mrr1 – transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju *MDRI* (**M**ultidrug **R**esistance **R**egulator)

MRSA – meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*

MTT – 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolijum bromid

ND – ne deluje

OG – optička gustina

PBS – pufer (**P**hosphate **b**uffered **s**aline)

PDB – baza podataka koja sadrži makromolekulske strukture dobijene difrakcijom X zracima ili pomoću nuklearne magnetne rezonance (**P**rotein **D**ata **B**ank)

PDBQT – format sličan PDBu ali sadrži i informaciju o delimičnom naelektrisanju i tipu atoma

PLP2 – primarne ćelije jetre svinje (**P**orcine **L**iver **P**rimary cells).

PME – algoritam koji se koristi u izračunavanju elektrostatskih sila (**P**article-**m**esh **E**wald,).

qPCR – kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja polimerazom (**Quantitative polymerase chain reaction**)

QS – kvorum-senzing (engl. **Quorum Sensing**), fenomen međućelijske komunikacije mikroorganizama

RBT1 – gen koji se reprimira transkripcionim represorom Tup1 (**Repressed By Tup1**)

RKV – reaktivne kiseonične vrste

RNK – ribonukleinska kiselina

RPMI-1640 sa MOPSom – hranljivi medijum (**Roswell Park Memorial Institute**) sa MOPSom (3-(N-morfolin)propansulfonična kiselina))

RQ – relativna kvantifikacija (engl. **Relative quantification**)

SAP – sekretovane aspartil proteaze

SDA/SDB – hranljiva podloga (**Sabouraud Dextrose Agar/Broth**)

SDS – natrijum dodecilsulfat (**Sodium dodecyl sulfate**)

SMIK – minimalna inhibitorna koncentracija određena pri delovanju na sesilne ćelije, \geq 50 % redukcije biofilma (sesilna minimalna inhibitorna koncentracija)

Tac1p – transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju *CDR* gena (**Transcriptional Activator of CDR genes**)

TIG-1 – ćelijska linija fibroblasta (**Tokyo Institute of Gerontology-1**)

Tris – tris(hidroksimetil)aminometan

TSA/TSB – hranljiva podloga, (**Tryptic Soya Agar/Broth**)

Upc2 – transkripcioni regulator koji reguliše ekspresiju *ERG11* (**Sterol Uptake Control protein 2**)

XTT – natrijum 2,3,-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-karbonil]-2H-tetrazolijum) so

YPA/YPD – hranljiva podloga (**Yeast Pepton Agar/Broth**)

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Biologija ćelije <i>Candida albicans</i>	1
1.2. Bolesti izazvane vrstama roda <i>Candida</i>	2
1.3. Faktori virulencije <i>Candida albicans</i>	4
1.3.1. Biofilm <i>Candida albicans</i>	4
1.3.2. Prelazak <i>Candida albicans</i> iz kvasolikog u hifalni oblik.....	9
1.4. Faktori koji doprinose smanjenoj osetljivosti <i>Candida albicans</i> na antifungalne agense.....	11
1.5. Flavonoidi, terpeni i različita jedinjenja sintetskog porekla.....	13
1.5.1. Flavonoidi	14
1.5.1.1. Flavoni.....	17
1.5.1.1.1. Apigenin.....	17
1.5.1.1.2. Apigetrin.....	18
1.5.1.1.3. Viteksin	18
1.5.1.1.4. Luteolin	19
1.5.1.2. Flavonoli.....	20
1.5.1.2.1. Kvercetin	20
1.5.1.2.2. Kvercitrin	20
1.5.1.2.3. Izokvercitrin	21
1.5.1.2.4. Rutin.....	22
1.5.1.2.5. Astragalin	22
1.5.2. Terpeni	23
1.5.2.1. Eukaliptol	24
1.5.2.2. Kamfor	24
1.5.3. Jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže azot i predloženi mehanizam delovanja.....	25
1.5.3.1. Nitratni estri heterocikličnih jedinjenja.....	25
1.5.3.2. Ergosterol kao ciljno mesto antifungalnog delovanja	26
1.5.3.3. Citohromi P450 i CYP51 kao njihov član.....	27
1.5.3.4. Spektrofotometrijske karakteristitke proteina CYP51.....	28
1.6. <i>In silico</i> metode kojima se može vršiti odabir potencijalnog liganda	30

1.6.1.	Molekularni doking.....	30
1.6.2.	Molekularna dinamika.....	33
1.7.	Antimikotici u lečenju infekcija <i>Candida albicans</i>	34
2.	Ciljevi.....	38
3.	Materijali i metode.....	39
3.1.	Odabrana jedinjenja i hranljive podloge.....	39
3.2.	Izolacija i identifikacija <i>Candida albicans</i>	41
3.3.	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti jedinjenja metodom mikrodilucije.....	41
3.4.	Potencijal testiranih jedinjenja da ometaju faktore koji doprinose virulentnosti <i>Candida albicans</i>	42
3.4.1.	Inhibiranje formiranja biofilma <i>Candida albicans</i>	43
3.4.2.	Ometanje prelaska <i>Candida albicans</i> iz kvasolike u hifalnu fazu.....	43
3.4.2.1.	Određivanje procenta ćelija koje rastu u hifalnom obliku.....	43
3.4.2.2.	Nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćeliji i vanćelijskom prostoru nakon tretmana testiranim jedinjenjima.....	44
3.5.	Uticaj antifungalnog tretmana na ekspresiju gena povezanih sa rezistencijom <i>Candida albicans</i>	44
3.5.1.	Izolovanje RNK.....	45
3.5.2.	Uklanjanje DNK iz uzoraka i sinteza cDNK.....	46
3.5.3.	Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja polimerazom.....	47
3.6.	Inhibicija procesa sinteze ergosterola kao potencijalni mehanizam antifungalnog delovanja.....	48
3.6.1.	Nivo ekspresije <i>ERG11</i> nakon antifungalnog tretmana.....	48
3.6.2.	Inhibicija lanosterol 14 α -demetilaze kao mehanizam antifungalnog delovanja.....	49
3.6.3.	<i>In silico</i> priprema proteina CYP51 i molekularni doking.....	49
3.6.4.	Simulacije molekularne dinamike (MD).....	51
3.7.	Integritet ćelijske membrane nakon tretmana jedinjenjima.....	52
3.8.	Citotoksičnost odabranih jedinjenja.....	53
4.	Rezultati i diskusija.....	54
4.1.	Prikupljanje i identifikacija <i>Candida albicans</i>	54
4.2.	Osetljivost različitih sojeva <i>Candida albicans</i> na komercijalne antifungalne lekove.....	55
4.3.	Osetljivost <i>Candida albicans</i> na tretman odabranim flavonoidima, terpenima i nitratnim estrima heterocikličnih jedinjenja.....	56
4.3.1.	Antimikrobna aktivnost nitratnih estara heterocikličnih jedinjenja.....	56

4.3.2.	Antimikrobna aktivnost flavonoida.....	57
4.3.2.1.	Luteolin	57
4.3.2.2.	Kvercitrin	58
4.3.2.3.	Izokvercitrin	58
4.3.2.4.	Rutin.....	59
4.3.2.5.	Apigetrin.....	60
4.3.2.6.	Viteksin	60
4.3.2.7.	Kvercetin	60
4.3.2.8.	Astragalin	61
4.3.2.9.	Apigenin.....	61
4.3.3.	Antimikrobna aktivnost terpena, kamfora i eukaliptola.....	62
4.4.	Uticaj testiranih jedinjenja na formiranje biofilma <i>Candida albicans</i>	64
4.4.1.	Antibiofilm aktivnost flavonoida	65
4.4.2.	Antibiofilm aktivnost terpena.....	69
4.4.3.	Antibiofilm aktivnost nitratnih estara heterocikličnih jedinjenja	70
4.5.	Sposobnost jedinjenja da remete prelazak iz kvasolikog u hifalni oblik.....	71
4.5.1.	Uticaj jedinjenja na procenat ćelija <i>Candida albicans</i> u hifalnom obliku	71
4.5.1.1.	Uticaj flavonoida na prelazak <i>Candida albicans</i> u hifalni oblik.....	72
4.5.1.2.	Uticaj terpena na morfološku tranziciju	74
4.5.1.3.	Uticaj jedinjenja sintetskog porekla na morfološku tranziciju	75
4.5.2.	Sprečavanje rasta hifa inhibicijom reaktivnih kiseoničnih vrsta.....	78
4.6.	Uticaj antifungalnog tretmana na nivo ekspresije gena koji kodiraju proteine efluksnih pumpi <i>Candida albicans</i>	80
4.6.1.	Uticaj jedinjenja na nivo ekspresije <i>MDR1</i>	80
4.6.2.	Uticaj jedinjenja na nivo ekspresije <i>CDR1</i>	81
4.6.3.	Uticaj odabranih jedinjenja na nivo ekspresije <i>CDR2</i>	84
4.7.	Uticaj jedinjenja na ekspresiju gena <i>ERG11</i> i na aktivnost proteina Erg11 (<i>CYP51</i>)	85
4.7.1.	Nivo ekspresije <i>ERG11</i> nakon tretmana jedinjenjima.....	85
4.7.2.	Sposobnost jedinjenja da inhibiraju Erg11 (<i>CYP51</i>)	87
4.8.	<i>In silico</i> predviđanje načina vezivanja MK55 za fungalni protein <i>CYP51</i>	90
4.9.	Narušavanje integriteta ćelijske membrane <i>Candida albicans</i> kao potencijalni mehanizam delovanja.....	93
4.10.	Citotoksičnost odabranih jedinjenja	95

5. Opšta diskusija	99
6. Zaključci.....	103
7. Literatura.....	106
Prilog 1. Odluka etičkog odbora	133

1. Uvod

Učestalost invazivnih bolesti izazvanih gljivama koje pripadaju rodu *Candida* u porastu je poslednjih decenija, a čak 50-90% njih izazvano je vrstom *Candida albicans* (Falagas i sar., 2010; Martins i sar., 2014). U Srbiji je *C. albicans* uzrok 55,8% kandidemija (infekcija krvotoka) sa smrtnošću od 33% (Arsić Arsenijević i sar., 2018), što je čini značajnim uzročnikom smrtnosti pacijenata, naročito u bolničkim uslovima (Perlroth i sar., 2007). Lečenje bolesti izazvanih ovim patogenom otežano je usled razvijene rezistencije na primenu nekih od do sada najčešće preporučivanih lekova, kao i različitih neželjenih dejstava koja mogu dodatno oslabiti pacijenta već kompromitovanog imunog stanja (Wiederhold, 2017). Usled nedostataka trenutno dostupne antifungalne terapije postoji težnja ka ispitivanju novih, kako sintetičkih tako i prirodnih jedinjenja, potencijalnih antifungalnih agenasa. Različite *in vitro* studije su sprovedene i predstavljaju polaznu tačku u proceni potencijala novoispitanih supstanci da pronađu primenu u antifungalnoj terapiji (Zida i sar., 2017; Smiljkovic i sar., 2018).

1.1. Biologija ćelije *Candida albicans*

Rod *Candida* pripada razdelu Ascomycota, klasi Saccharomycetes, redu Saccharomycetales i familiji Saccharomycetaceae (Barnett, 2004). Rodu pripada preko 200 vrsta, od kojih se *C. albicans* smatra najznačajnijim patogenom (Spampinato i Leonardi, 2013).

C. albicans je okružena ćelijskim zidom koji je štiti od imune odbrane domaćina i pri invaziji prvi dolazi u kontakt sa ćelijom domaćina. Glavne komponente ćelijskog zida su glukan, hitin i manoproteini (Chaffin i sar., 1998). Idući ka središtu ćelije, sledi ćelijska membrana, struktura sa bitnom ulogom u komunikaciji ćelije i spoljašnje sredine. Fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane sadrži proteine sa ulogom u transportu, signalnoj transdukciji, kao i proteine sa ulogom receptora (Cabezon i sar., 2009). Esencijalne komponente ćelijske membrane su i steroli koji ćeliji daju rigidnost, stabilnost i otpornost na fizičke stresore. Najzastupljeniji sterol je ergosterol, lipid karakterističan za ćelijsku membranu gljiva. Sintetiše se u endoplazmatičnom

retikulumu i na lipidnim telima, a bitan je i kao ciljno mesto delovanja nekih klasa antifungalnih lekova (Mukhopadhyay i sar., 2004; Lv i sar., 2016). *C. albicans* koristi glukozu kao izvor ugljenika, a aminokiseline kao izvor azota (Dadar i sar., 2018). Ova vrsta ima veoma plastičan diploidni genom od 14,4 mega baznih parova raspoređenih u 8 hromozoma. Kliničke izolate odlikuje raznovrsnost kariotipova. U odgovoru na različite stresore poput antifungalne terapije može doći do hromozomskih rearanžmana (Dadar i sar., 2018). Razmnožava se aseksualnim pupljenjem, ali i takozvanim paraseksualnim putem koji omogućava rekombinaciju genetičkog materijala bez mejoze (Forche i sar., 2008).

1.2. Bolesti izazvane vrstama roda *Candida*

Gljive roda *Candida* sastavni su deo mikrobioma različitih članova životinjskog carstva, prevashodno njihovog gastrointestinalnog, respiratornog i urogenitalnog trakta. Ptice, konji svinje samo su neke od vrsta podložnih infekcijama ovom gljivom (Dadar et al., 2018). Takođe su sastavni deo i ljudskog mikrobioma, pa se kod zdravih osoba mogu naći kao komensalni mikroorganizmi na mukoznim membranama i koži. Vrste roda *Candida* nalaze se u usnoj duplji kod oko 75% populacije gde njihovo prisustvo u najvećem broju slučajeva prolazi bez štetnih posledica (Mayer i sar., 2013). Međutim, *Candida* je i jedan od najčešćih uzročnika oportunističkih mikoza - bolesti do kojih dolazi kada se mikrogljive, koje kod zdravih osoba ne dovode do bolesti, namnože do te mere da postanu opasne po zdravlje čoveka. Od oko 200 vrsta koje pripadaju ovom rodu za 20 je potvrđeno da mogu biti izazivači bolesti ljudi (Hofs i sar., 2015; Dadar i sar., 2018), a među njima najčešći uzročnik bolesti je *C. albicans* (Sawant i Khan, 2017). Pored ove vrste kao izazivači infekcija sreću se i *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida krusei* i *Candida kyfer* (Mayer i sar., 2013). U Evropskim zemljama više od polovine slučajeva kandidijaze uzrokovano je *C. albicans*, dok je procenat ostalih ne-*Candida albicans* infekcija 14% za *C. glabrata*, 14% *C. parapsilosis*, 7% *C. tropicalis* i 2% *C. krusei* (Tortorano i sar., 2006). Poslednjih godina prvi put su zabeleženi slučajevi infekcije izazvani vrstom *Candida auris*, koja pored toga što je rezistentna na antifungalni tretman dovodi i do bolničkih

infekcija koje se šire izuzetnom brzinom (Chowdhary i sar., 2017). U Srbiji nije bilo zabeleženih slučajeva infekcije izazvane *C. auris* (Arsenijević i sar., 2018).

Češći slučajevi infekcija vrstama roda *Candida* primećeni su kod ljudi sa oslabljenim imunitetom (oboleli od HIVa, malignih oboljenja ili pacijenti koji imaju transplahirane organe) kod kojih gljive lako prelaze iz komensalne u patogenu formu i izazivaju kako lokalizovane tako i sistemske infekcije (Sawant i Khan, 2017). Faktor rizika za kandidijazu je i dugotrajno korišćenje antibiotika koji redukcijom bakterijske populacije na određenoj lokaciji u organizmu stvaraju prostor u kome je omogućen nesmetan rast različitih gljiva. Diabetes *mellitus* kao i povećan nivo estrogena usled korišćenja oralnih kontraceptiva ili trudnoće takođe olakšavaju put kolonizaciji kvasaca (Hofs i sar., 2015). Gljive roda *Candida* uzročnici su različitih tipova infekcija, od površinskih, oralnih i vaginalnih, do invazivne kandidijaze, stanja koje karakteriše značajna stopa smrtnosti (Antinori i sar., 2016). Oralna kandidijaza obuhvata infekcije izazvane *C. albicans* koja naseljava orofarinks (srednji deo ždrele) i/ili jednjak pacijenata i javlja se najčešće kod obolelih od HIVa (Mayer i sar., 2013) (**Slika 1**).



Slika 1. Usna duplja pacijenta sa hroničnim tonzilofaringitisom i belim naslagama na jeziku koje su posledica prekomernog rasta *C. albicans* (fotografija Dr Snežana Sanković Babić).

Pored prisustva u različitim delovima digestivnog trakta, *C. albicans* se javlja i na sluzokoži vagine žena u reproduktivnoj dobi. Vulvovaginitis, zapaljenje sluzokože vagine izazvano ovom gljivom makar jednom u životu se javi kod čak 75% žena, a značajan procenat pati i od ponovljenih infekcija (Neves i sar., 2005). Oralna i

vaginalna kandidijaza spadaju u češća oboljenja, međutim *C. albicans* može izazvati i neka ređa, ali znatno opasnija stanja. U pitanju su invazivne kandidijaze i kandidemije koje nastaju kada gljiva dospe u krvotok obolelog. Ove bolesti se smatraju trećim ili četvrtim uzročnikom infekcija krvotoka povezanih sa boravkom u bolnicama, sa stopom smrtnošću do čak 47% (Pappas i sar., 2016).

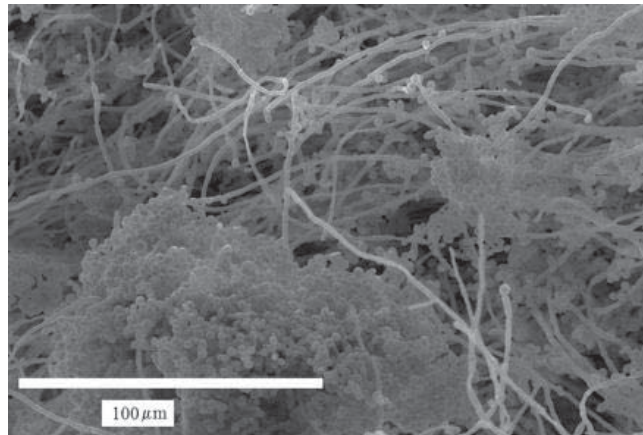
1.3. Faktori virulencije *Candida albicans*

Faktori virulencije obuhvataju različite osobine mikroorganizama koji dovode do njihove patogenosti, odnosno sposobnosti da izazovu bolest. Definitivna potvrda da je neka osobina faktor virulencije je gubitak patogenosti nakon što se izbriše kodirajuća sekvenca gena u oba alela koji određuju potencijalni faktor virulencije mikroorganizama (Calderone i Fonzi, 2001). U faktore koji dovode do povećanja virulentnosti *C. albicans* spadaju: morfološki prelazak iz kvasolikog u hifalni oblik, ekspresija proteina bitnih za adheziju i invaziju, formiranje biofilma, tigmotropizam (promena pravca rasta u zavisnosti od sredinskih stimulusa), fenotipska tranzicija (spontano nastajanje kolonija sa promenjenom morfologijom, u većem procentu nego što je moguće postići somatskim mutacijama) i sekrecija hidrolitičkih enzima (Jain i sar., 2008; Dadar i sar., 2018). Među faktore virulencije koji su do sada najviše ispitivani spadaju sposobnost *C. albicans* da formira biofilm i njena morfološka tranzicija.

1.3.1. Biofilm *Candida albicans*

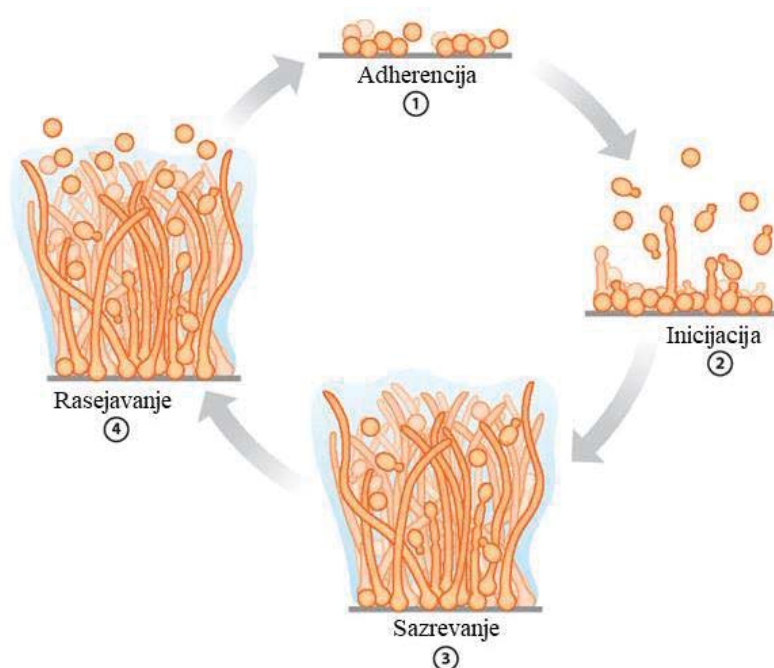
Ćelije mikroorganizama, kako bakterija tako i gljiva, mogu se međusobno povezati i obaviti ekstraćelijskim matriksom formirajući strukturu koja se naziva biofilm (**Slika 2**). U okviru vrsta roda *Candida* formiranje biofilma je najčešće povezivano sa *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* i *C. parapsilosis* (Pannanusorn i sar., 2013), a *C. albicans* se koristi i kao model sistem za fungalni biofilm (Bonhomme i d'Enfert, 2013). Biofilm može biti formiran na različitim površinama, biotskim (živi organizmi) ili abiotskim (najčešće površine medicinskih uređaja). Biofilm formiran na abiotskim površinama poput medicinskih implanata i katetera ima visok uticaj na povećanje smrtnosti pacijenata (Bonhomme i d'Enfert, 2013). Bolničke infekcije mogu

biti posledica razvoja mikroorganizama i formiranja biofilmova na različitim medicinskim aparatima a oko 20% njih izazvano je upravo *C. albicans* (Tsui i sar., 2016). Među biotskim površinama biofilm *C. albicans* se uglavnom razvija na oralnoj i vaginalnoj mukozi (Rai Rima i sar., 2018) gde predstavlja žarište infekcije i polaznu tačku u nastanku sistemskih infekcija (Nobile i Johnson, 2015). Sistemske infekcije izazvane vrstom *C. albicans* imaju stopu smrtnosti veću od 50% (Tsui i sar., 2016).



Slika 2. Skenirajuća elektronska mikroskopija ćelija *C. albicans* u biofilmu (Khot i sar., 2006).

Nastanak biofilma *C. albicans* započinje prijanjanjem ćelija kvasca i kolonizacijom podloge praćenom formiranjem bazalnog sloja ćelija. S obzirom da je *C. albicans*, pored *C. dubliniensis*, jedina vrsta roda *Candida* koja ima sposobnost morfološkog prelaska iz kvasolike u hifalnu formu, njen biofilm je kompleksna struktura različitih morfoloških oblika (Bonhomme i d'Enfert, 2013). Tokom sazrevanja biofilma neke od kvasolikih ćelija prelaze u hifalnu formu i stvara se ekstraćelijski matriks koji popunjava trodimenzionalni prostor ove formacije. Ćelije zrelog biofilma mogu se odvojiti i nastaniti na drugom mestu gde otpočinju ponovni ciklus formiranja biofilma (Rai Rima i sar., 2018) (**Slika 3**).

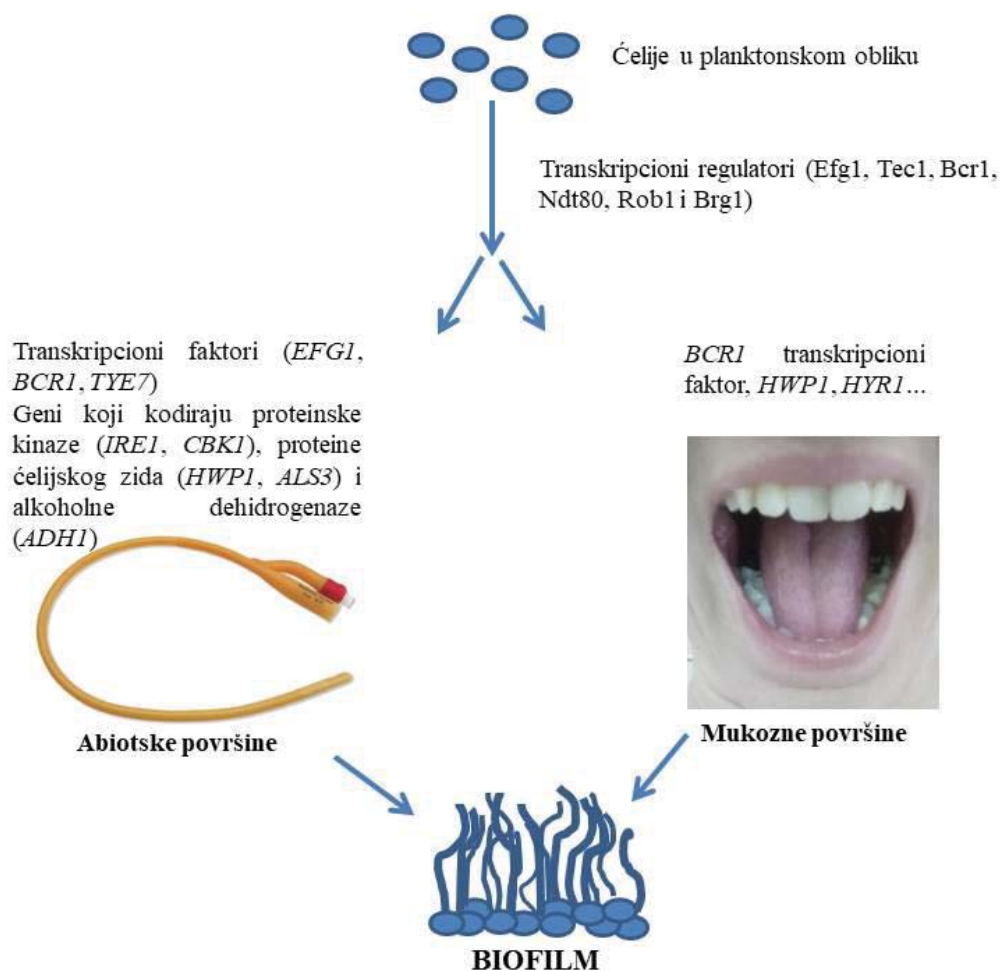


Slika 3. Faze u formiranju biofilma *C. albicans*. 1- adherencija kvasolikih ćelija, 2- inicijacija ćelijske proliferacije, formiranje bazalnog sloja, 3- sazrevanje biofilma koje uključuje formiranje hifa i ekstraćelijskog matriksa, 4- rasejavanje pomoću kvasolikih ćelija koje na drugoj lokaciji mogu otpočeti formiranje novog biofilma (Nobile i Johnson, 2015).

Ekstraćelijski matriks je deo biofilma sastavljen od ekstraćelijskih polimera i ekstraćelijske DNK zajedno uključenih u održavanje strukture biofilma i rezistenciju na antimikrobni tretman (Hirota i sar., 2017). Komponente ekstraćelijskog matriksa, β -1,3-glukani, doprinose povećanoj otpornosti biofilma na antifungalni tretman jer zadržavaju antimikrobne lekove čime im onemogućavaju kontakt sa ciljnim ćelijama. Potvrđeno je da ćelije u biofilmu oslobađaju više β -1,3-glukana u ekstraćelijski prostor nego planktonske ćelije, a čak i egzogeno dodati β -1,3-glukani dovode do povećanja otpornosti na antifungalni tretman (Bonhomme i d'Enfert, 2013).

Fenomen koji ima bitnu ulogu u formiranju biofilma je i međućelijska komunikacija, tzv. „Quorum sensing“ - QS, zasnovan na tome da je ponašanje mikroorganizma ili njegov odgovor na neki stimulus uslovljen gustinom ćelija i sintezom signalnog molekula. Najviše proučavan QS molekul *C. albicans* je farnezol, jedinjenje koje se sekretuje van ćelije i akumulira u supernatantu zrelog biofilma (Tsui i sar., 2016). Geni

uključeni u formiranje biofilma *C. albicans* podjeljeni su u više kategorija, a mnogi od njih povezani su i sa regulacijom prelaska iz kvasolike u hifalnu formu. Oni povezani sa formiranjem biofilma nose informaciju za sintezu proteina sa funkcijama transkripcionih faktora, proteina ćelijskog zida, alkoholnih dehidrogenaza, proteinskih kinaza, efluks pumpi i drugih (Finkel i Mitchel, 2011). Transkripciona mreža koja reguliše formiranje biofilma sastoji se od 6 glavnih transkripcionih regulatora (Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Rob1 i Brg1) koji regulišu ekspresiju oko 1000 gena (Slika 4).

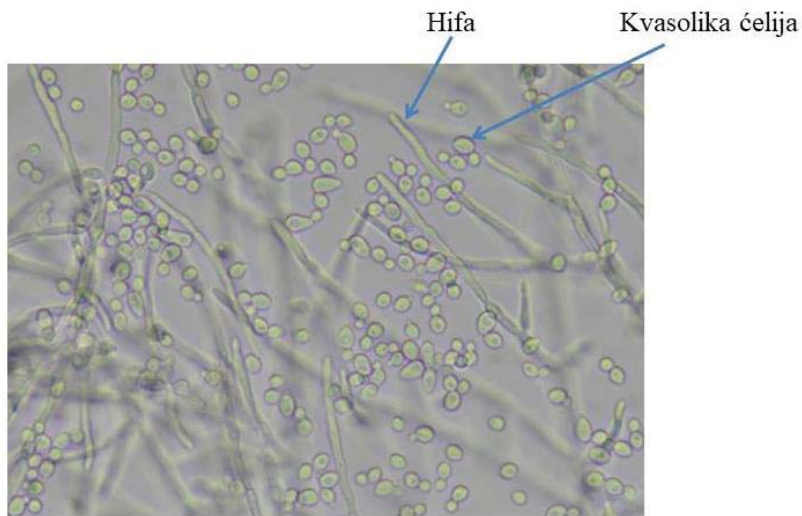


Slika 4. Različiti regulatori uključeni u formiranje biofilma na abiotskim i biotskim površinama (prikazani su samo neki od gena čija se ekspresija menja pri formiranju biofilma).

Formiranje biofilma kako *in vitro* tako *in vivo* nije moguće ukoliko sojevi nemaju makar jedan od ovih 6 transkripcionih regulatora. Smatra se da pored navedenih postoji još regulatora čije je prisustvo esencijalno (Fox i Nobile, 2012). Različiti geni su eksprimirani u zavisnosti od toga da li se formiranje biofilma odvija na abiotskoj ili biotskoj površini. Oni koji su bitni za formiranje biofilma na abiotičkim površinama spadaju u transkripcione faktore (npr. *EFG1*, *BCR1*, *TYE7*), gene koji kodiraju za proteinske kinaze (npr. *IRE1*, *CBK1*), proteine ćelijskog zida (npr. *HWP1*, *ALS3*) i alkoholne dehidrogenaze (*ADHI*). Za formiranje biofilma na mukoznim površinama neophodan je *BCR1* transkripcioni faktor (**B**iofilm and **C**ell **W**all **R**egulator) čiji je glavni target *HWP1* (**H**yp**h**al **W**all **P**rotein). Formiranje biofilma kod *BCR1* mutanata je moguće ukoliko im se poveća ekspresija *HWP1*. Protein Hwp1 ima ulogu u adheziji jer se povezuje sa transglutaminazama na ćelijama domaćina. Još jedno ciljno mesto Bcr1 regulatora je i *HYR1* (**H**yp**h**ally **R**egulated gene), koji omogućava invaziju na epitelno tkivo domaćina i štiti ćelije *C. albicans* od delovanja neutrofila. *HYR1* nema bitnu ulogu u formiranju biofilma na abiotkim površinama *in vitro*, jer je on prvenstveno uključen u povezivanje sa ćelijama domaćina, dok *HWP1* ima ulogu u oba slučaja. Kod biofilma na mukoznim površinama protein Hwp1 je bitan za međusobno povezivanje sa ćelijama domaćina, dok je na abiotkim eksprimiran kao enzim koji je nezavistan od domaćina i ima funkciju adhezina (Ganguly i Mitchell, 2011). Tokom formiranja biofilma pored gena koji su direktno uključeni u njegovo formiranje menja se i nivo ekspresije gena koji su indirektno povezani sa različitim karakteristikama biofilma. Dolazi do porasta nivoa ekspresije gena uključenih u metabolizam amino kiselina koje sadrže sumpor, što je naročito karakteristično za ćelije koje su u dubljim slojevima biofilma. Pretpostavlja se da ovaj vid metabolizma omogućava ćelijama da prežive glad i oksidativni stres, s obzirom da su amino kiseline sa sumporom uključene u sintezu antioksidantnih molekula. Ćelije u biofilmu formiraju hipoksično okruženje i povećano eksprimiraju gene uključene u glikolizu, metabolizam masnih kiselina i sintezu ergosterola (Bonhomme i d'Enfert, 2013).

1.3.2. Prelazak *Candida albicans* iz kvasolikog u hifalni oblik

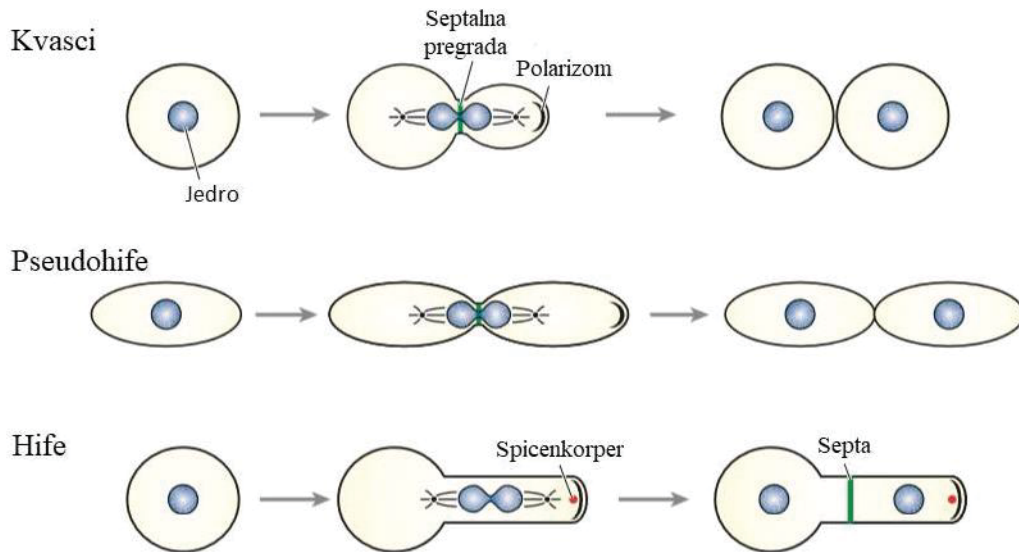
Karakteristična osobina *C. albicans* je sposobnost promene morfologije ćelije u odgovoru na promenu sredinskih uslova. Ova vrsta prelazi iz kvasolike u hifalnu formu, i obratno, sa pseudohifalnim oblikom kao prelaznom formom između njih (**Slika 5**). U nepovoljnim životnim uslovima formira i hlamidospore, aseksualne spore koje su 3 do 4 puta veće od kvasolike ćelije (Staib i Morschhäuser, 2007).



Slika 5. Različiti tipovi ćelija *C. albicans*, 40x uvećanje, mikroskop Nikon eclipse E200, Holandija.

Morfološki prelazak *C. albicans* započinje pupljenjem blastospore čime se formira nova ćelija. Jedra se razdvajaju preko septalne pregrade na spoju majke i ćerke ćelije (**Slika 6**). Usmeren rast ćerke ćelije je definisan polarizmom, kompleksom proteina koji formiraju strukturu oblika polumeseca na vrhu rastućeg pupoljka. Kod ćelija koje rastu u pseudohifalnom obliku podela jedara određena je septalnom pregradom, dok je polarizovan rast obezbeđen polarizmom. Pseudohifalne ćelije su izduženije od kvasolikih i ostaju povezane i nakon citokineze. Hifalni rast je pored polarizoma određen i strukturom koja se naziva Spicenkorper (engl. Spitzenkorper). Ova struktura još uvek nije dovoljno okarakterisana, a nalazi se na vrhu rastuće hife. Jedro hifalnih ćelija deli se u predelu germinativne tube, a izvan regiona koji bi predstavljao

eventualnu septu. Jedno jedro se nakon deobe vraća majci ćeliji a drugo se pomera dalje ka središtu germinativne tube (**Slika 6**) (Whiteway i Bachewich, 2007).



Slika 6. Formiranje različitih morfoloških oblika *C. albicans* (Whiteway i Bachewich., 2007).

C. albicans se nalazi u kvasolikoj formi rasta dok je prisutna kao sastavni deo mikrobioma zdravih ljudi. Pri prelasku u patogeni oblik dolazi i do promene ćelijske morfologije iz kvasolike u hifalnu. Hifalna forma je invazivna, ćelije u ovom obliku ulaze u tkivo domaćina i oštećuju ga, što je potvrđeno histološkim preparatima obolelog tkiva na kojima se uglavnom vide hifalne ćelije. Dok su hifalne ćelije bitne za formiranje biofilma i invaziju ćelija domaćina, kvasolika forma se smatra značajnijom za širenje infekcije (Jacobsen i sar., 2014). Efikasan prelazak iz jednog u drugi oblik od velikog je značaja za dostizanje maksimalne virulentnosti gljive, mutanti kojima je onemogućen nisu sposobni da dovedu do bolesti (Heilmann i sar., 2011).

Hife ulaze u tkivo domaćina indukovanom endocitozom i aktivnom penetracijom. Indukovana endocitoza je proces posredovan invazinom asociranim sa hifama (Als3) i zavisna je od aktivnosti domaćina (čak i mrtve hife podležu endocitozi ako je protein Als3 eksprimiran na njihovoj površini). Aktivna penetracije je, nasuprot endocitozi, proces koji je zavistan od aktivnosti gljive, a ne od aktivnosti domaćina. Oba puta

invazije zahtevaju hife, mutanti defektni u hifalnom rastu ne mogu vršiti invaziju na ćelije domaćina (Wilson i sar., 2016).

Nekoliko signalnih puteva uključeno je u nastanak hifa, a najznačajnijim se smatra protein kinaza A zavisna od cAMP-a (ciklični adenzin monofosfat) (Lu i sar., 2011). Formiranje hifa povezano je i sa povećanjem nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) u ćelijama *C. albicans*. RKV imaju ulogu u zapaljenju i oštećenju tkiva domaćina jer reaguju sa polinezasićenim masnim kiselinama u ćelijskim membranama, sulfhidrilnim vezama u proteinima kao i sa nukleotidima (Schröter i sar., 2000). Oštećenju ćelija domaćina doprinosi i protein kandidalizin (engl. candidalysin) koji je povezan sa hifalnim rastom a deluje kao citolitički toksin. Kada se kandidalizin sekretuje u dovoljnoj količini ubacuje se u membrane epitelnih ćelija gde povećava propustljivost i indukuje liziranje. Prisustvo holesterola u ćelijama domaćina povećava aktivnost kandidalizina (Wilson i sar., 2016). Različiti faktori spoljašnje sredine mogu biti okidač za prelazak iz kvasolike u hifalnu formu rasta, uključujući serum, N-acetilglukozamin, neutralan pH i temperaturu od 37 °C (Lu i sar., 2014).

1.4. Faktori koji doprinose smanjenoj osetljivosti *Candida albicans* na antifungalne agense

C. albicans ima sposobnost da se adaptira na promene sredinskih uslova a između ostalog i da vremenom postane sve otpornija na tretman antifungalnim lekovima. Upravo to je jedan od razloga zašto njeno efikasno suzbijanje predstavlja izazov za kliničku praksu. Rezistencija je najčešće primećivana pri odgovoru na dugotrajan tretman azolnim lekovima, koji su sa druge strane među najviše korišćenim za lečenje kandidijaze (White i sar., 2002, Kanafani i sar., 2008).

Različiti procesi u ćeliji povezani su sa razvitkom otpornosti na tretman azolnim jedinjenjima. Među njima su i povećana ekspresija *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* i *ERG11*. Geni *CDR1* i *CDR2* (**C**andida **D**rug **R**esistance) kodiraju proteine koji spadaju u grupu ABC (**A**TP-**b**inding **c**assette) transportera. Ove pumpe koriste energiju ATP-a kako bi izbacivale male hidrofobne molekule iz ćelije. Povećana aktivnost ovih proteina između ostalog dovodi i do povećanog izbacivanja antifungalnih lekova čime se smanjuje njihova koncentracija u ćeliji, pa su neophodne više koncentracije antifungalnih agenasa

kako bi se postigao antimikrobni efekat (Akins, 2005; Kofla i sar., 2011). *CDR1* i *CDR2* regulisani su cis regulatornim elementom DRE (**D**rug-**R**esponsive **E**lement) kao i transkripcionim faktorom Tac1p (**T**ranscriptional **A**ctivator of *CDR* genes). Tac1p se vezuje za DRE elemente uzvodno od *CDR1* i *CDR2* i odgovoran je za prolaznu povećanu ekspresiju oba *CDR* gena u prisustvu inducera (Akins, 2005; Coste i sar., 2009; Schneider i Morschhäuser, 2015). Kod sojeva koji su osetljivi na azolne lekove *CDR1* i *CDR2* se povećano eksprimiraju samo u prisustvu inducera, dok su kod rezistentnih sojeva uvek povećano eksprimirani (Coste i sar., 2009). Drastična indukcija ekspresije *CDR1* postiže se tretmanom *C. albicans* hormonima (progesteronom, β -estradiolom), antimikoticima (mikonazolom, nistatinom) i fizičkim tretmanom temperaturnim šokom. Flukonazol indukuje ekspresiju *CDR1* *in vitro*, ali tek nakon dužeg, prekonoćnog, izlaganja subinhibitornim koncentracijama (Akins, 2005). Supstrati Cdr1 i Cdr2 pumpi pored azola mogu biti i različiti steroidi i lipidi (Sanglard i sar., 2009).

Povećanom izbacivanju antifungalnih lekova iz ćelije doprinosi i porast u ekspresiji *MDR1* (**M**ulti-**D**rug **R**esistance), gena koji kodira za membranski transportni protein, efluks pumpu, koja kao energiju za transport koristi protonski gradijent na ćelijskoj membrani. Ekspirira se kod svih ćelija *C. albicans* u manjoj količini, dok je kod onih koje su otporne na tretman flukonazolom njegova ekspresija značajno povećana (Hiller i sar., 2006). Povećana ekspresija *MDR1* je zabeležena i nakon tretmana benomilom ili hidrogen peroksidom (Harry i sar., 2002). Promotori *MDR1* gena i kod osetljivih i kod rezistentnih sojeva imaju istu sekvencu, a regulisani su cis-regulatornim elementima (Eckert i Mühlischlegel, 2009). Mutacije u transkripcionom faktoru Mrr1 (**M**ultidrug **R**esistance **R**egulator) dovode do povećane ekspresije *MDR1* (Schneider i Morschhäuser, 2015). Klinički izolati koji povećano eksprimiraju *MDR1* pored smanjene osetljivosti na flukonazol pokazuju i smanjenu osetljivost na lekove poput cerulenina i brefeldina A. Za razliku od drugih mehanizama rezistencije, povećana ekspresija *MDR1* dovodi do rezistencije na flukonazol, ali ne i na druge lekove iz grupe azola (Sanglard i sar., 2009).

Mehanizam pomoću kog azoli dovode do zaustavljanja rasta *C. albicans* je inhibicija enzima lanosterol 14 α -demetilaze (CYP51), što dovodi do nagomilavanja toksičnih intermedijera biosinteze ergosterola, 14-metilergosta-8,24(28)-dien-3,6-diola. Protein

CYP51 kodiran je genom *ERG11*. Povećana ekspresija ovog gena dovodi do porasta količine ciljnog molekula za antifungalne lekove što koncentraciju lekova koja je ranije inhibirala sav enzim čini nedovoljnom te dolazi do razvoja rezistencije. Povećana ekspresija *ERG11* se javlja kao posledica mutacije u transkripcionom regulatoru Upc2 (Sterol Uptake Control protein 2) ili povećanog broja kopija hromozoma 5 (hromozom na kome se nalazi *ERG11*) (Flowers i sar., 2015).

Svi pomenuti mehanizmi rezistencije su prisutni među kliničkim izolatima *C. albicans* i u studiji White i saradnika (2002) prikazano je da oko 85% izolata pokazuju povećanu ekspresiju efluks pumpi, 65% ima mutiran *ERG11*, dok 35% povećano eksprimira *ERG11*.

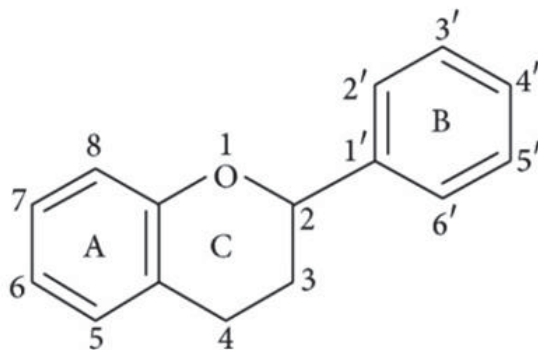
1.5. Flavonoidi, terpeni i različita jedinjenja sintetskog porekla

Pronalazak novih antifungalnih lekova za tretman kandidijaza predstavlja poseban izazov jer su ćelije i patogeni i domaćina eukariotske, te kao takve dele zajedničke karakteristike i ograničavaju broj potencijalnih antifungalnih targeta (McCarthy i sar., 2017). Posledica toga je znatno smanjen broj lekova koji se mogu koristiti za tretman fungalnih infekcija u odnosu na one koji mogu lečiti infekcije izazvane bakterijama (Roemer i Krysan, 2014). Trenutno, najveći broj jedinjenja prirodnog porekla čija je aktivnost prema *Candida albicans* ispitana zabeležen je u Aziji i Americi (44,37%, odnosno 28,17%) dok je procenat jedinjenja ispitanih u Evropi znatno niži (6,34%) (Zida i sar., 2017). U prirodi se i dalje nalazi širok spektar jedinjenja koja su nedovoljno ispitana u cilju lečenja infekcija izazvanih *C. albicans*. Među njima su i flavonoidi i terpeni, široko raširena prirodna jedinjenja, koja karakteriše raznovrsna biološka aktivnost i mogući pozitivan učinak na zdravlje (Sulsen i sar., 2017), a istovremeno je nedovoljno poznat njihov uticaj na *C. albicans*. Pored prirodnih, veliki je broj i hemijski sintetisanih molekula, među kojima se možda krije neki budući antifungalni lek. Ukoliko se uzme u obzir da je prethodnih 30 godina razvijena samo jedna nova klasa antifungalnih lekova (Roemer i Krysan, 2014), stiče se uvid u ogroman neistraženi potencijal različitih grupa jedinjenja i u konstantno rastuću potrebu za pronalaskom novih antifungalnih agenasa.

1.5.1. Flavonoidi

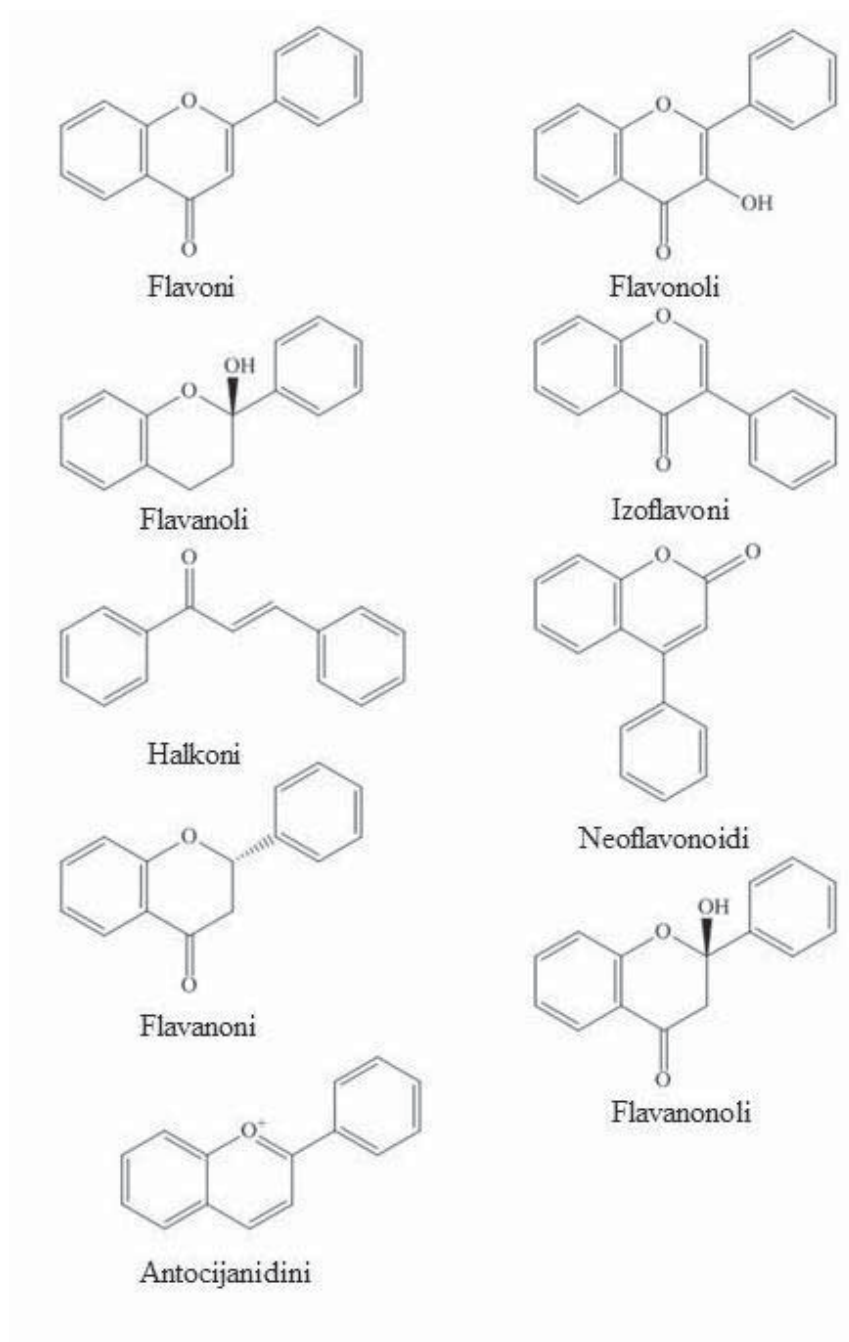
Struktura pigmenata koji daju boju biljkama definisana je krajem 19. veka. Početkom 20. veka strukture flavonoida su okarakterisane i otpočelo se sa njihovom sintezom u laboratorijama. Fokus tadašnjih istraživanja je bio na njihovoj ulozi kao pigmenata. Tek oko 1930. otpočeto je ispitivanje flavonoida kao supstanci koje mogu doprineti poboljšanju zdravlja ljudi. Izučavanje flavonoida počelo je pronalaskom tzv. „vitamina P“, sastojka pomorandži za koji se kasnije ispostavilo da nije vitamin već flavonoid, rutin. Porast istraživanja korisnih efekata ove grupe jedinjenja podstaklo je i otkriće takozvanog „francuskog paradoksa“. Ovaj paradoks se odnosi na činjenicu da je u populaciji ljudi na Mediteranu niža stopa smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti, što je povezano sa povećanom konzumacijom crnog vina i zasićenih masti. Kako su flavonoidi važan sastojak crnog vina, mogu se smatrati delimično odgovornim za ovaj efekat (Nijveldt i sar., 2001). Danas su istraživanja koja se bave različitim aktivnostima flavonoida veoma intenzivna, naročito na teritoriji Kine (Perez-Vizcaino i sar., 2018).

Flavonoidi su grupa polifenola, derivati 2-fenil-benzo- γ -pirona. Mogu se naći u brojnim biljkama, voću, povrću gde imaju ulogu u davanju boje, mirisa i ukusa. Flavonoidi se sastoje od dva benzenova prstena (A i B) povezana heterocikličnim pirenskim prstenom (C) (Slika 7). Zajednički deo hemijske strukture svih flavonoida je ugljenični skelet baziran na flavanskoj strukturi (C6-C3-C6, dva prstena od šest ugljenika sa 3 ugljenika između, 15 atoma ugljenika ukupno).



Slika 7. Osnovna struktura flavonoida (Kumar i Pandey, 2013)

Prema hemijskoj strukturi podjeljeni su na flavone, flavonole, flavanole, izoflavone, halkone, neoflavonoide, flavanone, flavanonole i antocijanidine (Slika 8) (Tsao, 2010; Sun i sar., 2012).



Slika 8. Hemijske strukture najzastupljenijih klasa flavonoida (Smiljković i sar., 2018)

U biljkama se flavonoidi uglavnom javljaju kao aglikoni, glikozidi ili kao metilovani derivati. Njihova sinteza se odvija fenilpropanoidnim putem, transformacijom fenilalanina u 4-kumaril-koenzim A koji se potom uključuje u put biosinteze flavonoida. U zavisnosti od biljne vrste različiti enzimi, uglavnom hidrolaze i reduktaze, modifikuju osnovni flavonoidni skelet što rezultuje nastankom različitih tipova flavonoida. Poslednji u nizu, transferaze, modifikuju skelet flavonoida dodajući šećere i metil ili acil grupe (Zakaryan i sar., 2017). Sinteza flavonoida se odvija u citoplazmi odakle se transportuju u vakuole ili druge delove ćelije gde obavljaju svoju funkciju (Zhao, 2015). Aglikoni flavonoida slabo su rastvorljivi u vodi i smanjeno se absorbuju u crevima, što sprečava pojavu akutne toksičnosti koja se može javiti kao posledica obilne konzumacije. Pored rastvorljivosti, absorpcija flavonoida zavisi i od njihove veličine, strukture, lipofilnosti, kao i od aktivnosti hidrolitičkih enzima gastrointestinalnog trakta, sastava mikrobioma i ćelijskih transportera crevnog epitela. Na absorpciju utiče i to da li su flavonoidi glikozilovani ili ne; aglikoni se absorbuju odmah u tankom crevu, dok glikozilovane forme prvo moraju biti prevedene u aglikonski oblik. Nakon absorpcije, flavonoidi se vezuju za albumin i transportuju do jetre gde se konjuguju putem glukuronidacije, sulfacije ili metilacije, ili se metabolizuju do manjih fenolnih jedinjenja, čime se smanjuje njihova toksičnost i povećava brzina eliminacije. Usled konjugacije, u urinu se nikad ne mogu naći slobodni flavonoidni aglikoni, izuzev katehina. Flavonoidi se putem žuči izbacuju u creva, a oni koji se ne absorbuju bivaju razgrađeni u debelom crevu. Bakterije u crevima pomažu degradaciju flavonoida. Među različitim grupama flavonoida, izoflavoni imaju najbolju biodostupnost (procenat aktivne supstance koji dospeva u krvotok i može ostvariti svoju aktivnost). Biodostupnost različitih flavonoida zavisi i od njihovog izvora, pa je na primer absorpcija kvercetina iz luka četiri puta veća nego iz jabuke (Nijveldt i sar., 2001, Kumar i Pandey, 2013).

Od različitih bioloških aktivnosti flavonoida, najviše je ispitivana antioksidantna. Konfiguracija, substitucija i ukupan broj hidroksilnih grupa utiče na mehanizam antioksidantne aktivnosti. Naročito su značajne hidroksilne grupe na B prstenu (**Slika 7**), jer ove grupe doniraju vodonik i elektron hidroksilnim, peroksilnim i peroksinitratnim radikalima čime ih stabilizuju, a i flavonoidi postaju relativno stabilni flavonoidni radikali. Flavonoidi mogu dovoditi do antioksidantnog efekta i na druge

načine, poput inhibicije enzima uključenih u sintezu RKV (Kumar i Pandey, 2013). Ostale uloge koje mogu imati su antiinflamatorna, uloga u prevenciji ateroskleroze, malignih obolenja, antimikrobna i druge (Tripoli i sar., 2007).

Flavonoidi do sada nisu bili ispitani u kliničkim studijama za lečenje kandidijaze. Podaci o kliničkim ispitivanjima flavonoida za druge indikacije postoje. Baikalein je ispitan u prvoj fazi kliničkih ispitivanja kao novi lek za tretman Parkinsonove bolesti gde je pokazano da je bezbedan za upotrebu, pacijenti ga dobro podnose i nije toksičan za jetru i bubrege (Li i sar., 2014). Jabuke su se zahvaljujući kori bogatoj flavonoidima u kliničkoj studiji sprovedenoj od strane Bondonno i sar., (2018) pokazale kao agensi značajni za prevenciju kardiovaskularnih bolesti.

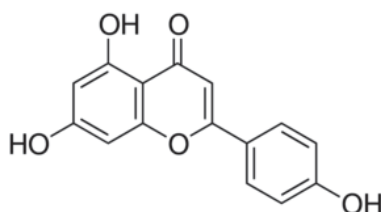
1.5.1.1. Flavoni

Flavoni su grupa flavonoida koja ima dva aromatična prstena povezana heterocikličnim piranskim prstenom sa dvostrukom vezom između C2 i C3 i strukturom keto grupe na C4 (**Slika 8**) (Jiang i sar. 2016). Imaju raznovrsne uloge u biljnom carstvu - kao pigmenti, prirodni pesticidi, ali i signalni molekuli (Hostetler i sar., 2017). Ispoljavaju biološke aktivnosti poput antiinflamatorne, antimikrobne, antitumorske i drugih (Verma i Pratap., 2010). U ovu grupu spadaju neki od flavonoida koji su najzastupljeniji u prirodi: apigenin, apigetrin, viteksin, luteolin i drugi.

1.5.1.1.1. Apigenin

Apigenin, 4', 5, 7,-trihidroksiflavon, se može naći u čaju od kamilice, crvenom vinu i pivu, kao i u različitom povrću uključujući peršun i celer, ali i u origanu gde je uglavnom u formi glikozida. Neglikozilovana forma je prisutna u čaju kamilice koji sadrži 0,8 – 1,2 % apigenina (Shankar i sar., 2017) (**Slika 9**). U obliku je žutih iglica. Karakterističan je po formiranju *O*-glikozida. Sintetiše se sa citoplazmatične strane endoplazmatičnog retikuluma (Nabavi i sar., 2018). Ispoljava različita korisna dejstva uključujući antioksidantno, antiinflamatorno i antitumorsko (Shankar i sar., 2017). Apigenin nije toksičan i nema mutageni efekat, što je pokazano na ćelijskim kulturama *in vitro* (Tang i sar., 2017). Iako ima nisku biodostupnost (slabo je rastvorljiv u vodi),

spora farmakokinetika (24,8% apigenina se zadržava u tkivima i 10 dana nakon unosa) mu omogućava da postigne željeni efekat (Shankar i sar., 2017).

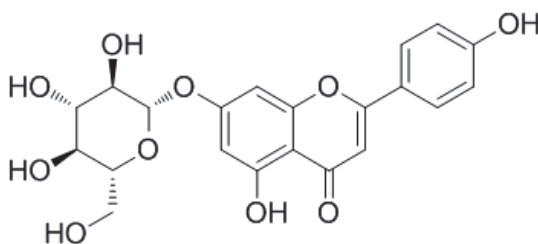


Slika 9. Struktura apigenina

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/smb00702?lang=en®ion=US>).

1.5.1.1.2. Apigetrin

Apigetrin, apigenin-7-*O*-glukozid, je oblik u kom se apigenin nalazi u prirodi (Shukla i Gupta, 2010) (**Slika 10**). Glikozilovanjem (dodatkom šećerne komponente) se povećava rastvorljivost apigenina u vodi. Apigetrin poseduje biološke aktivnosti poput antiinflamatorne, anksiolitičke i antitumorske (Smiljković i sar., 2017a). Nije toksičan za zdrave ćelije i organe, dok je *in vivo* eksperimentima pokazana toksičnost za tumorske ćelije (Sun i sar., 2018).

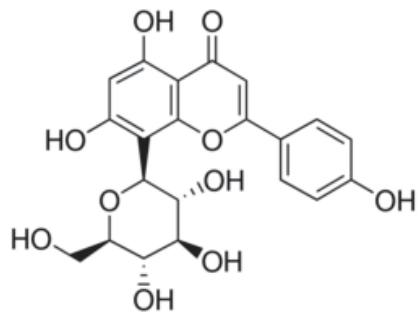


Slika 10. Apigetrin (<https://www.medchemexpress.com/Apigenin-7-glucoside.html>).

1.5.1.1.3. Viteksin

Viteksin, apigenin-8-*C*-glukozid, aktivna je komponenta mnogih biljaka tradicionalne kineske medicine poput bambusa i mimoze (**Slika 11**). Poseduje brojne biološke aktivnosti uključujući antitumorsku, antioksidantnu, antiinflamatornu, antihipertenzivnu. Najviše je ispitan njegov uticaj na sprečavanje zapaljenja koji je

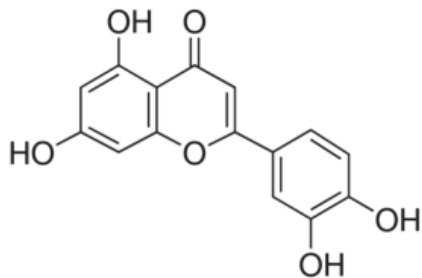
posledica inhibitornog delovanja na proinflamatorne citokine zajedno sa uticajem na povećanu aktivnost anti-inflamatornih citokina. Viteksin nije citotoksičan, što je pokazano u eksperimentima *in vitro*. Na osnovu studije sprovedene na pacovima tretman viteksinom u dozi od 10 mg/kg se smatra bezbednim za jetru i crevnu mukožu (He i sar., 2016).



Slika 11. Viteksin (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/49513?lang=en®ion= SX>).

1.5.1.1.4. Luteolin

Luteolin, 3',4',5,7-tetrahidroksiflavon, je prisutan u različitom povrću i voću poput šargarepe, kupusa, celera i jabuke (Luo i sar., 2017) (**Slika 12**), kao i u mnogim biljkama koje su deo tradicionalne medicine različitih zemalja (Nabavi i sar., 2015). Posедуje antioksidantnu i antiinflamatornu aktivnost (Park i sar., 2018), a ispoljava i pozitivan učinak na zdravlje srca (Yang i sar. 2018). Antioksidantna aktivnost posledica je njegove sposobnosti da uništava reaktivne kiseonične i azotne vrste (Nabavi i sar., 2015). Smatra se da je prisustvo hidroksilnih grupa na 5, 7, 3' i 4' ugljenicima kao i 2-3 dvostruke veze uzrok različitih farmakoloških aktivnosti ovog jedinjenja (Nabavi i sar., 2015). Nije toksičan po ćelije jetre i mitohondrije (Seydi i sar., 2018).



Slika 12. Luteolin

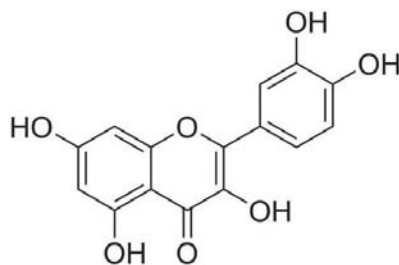
(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/19283?lang=en®ion= SX>).

1.5.1.2. Flavonoli

Flavonoli su grupa flavonoida koja ima 3-hidroksiflavonski skelet sa OH grupom na različitim pozicijama (**Slika 8**), i poznati su po raznovrsnim biološkim ulogama uključujući antitumorsku, antidijabetes i anti-inflamatornu, dok je najviše pažnje posvećeno istraživanju njihove antioksidantne sposobnosti (Survay i sar., 2011). U ovu grupu, između ostalih, spadaju kvercetin i njegovi glikozilovani oblici.

1.5.1.2.1. Kvercetin

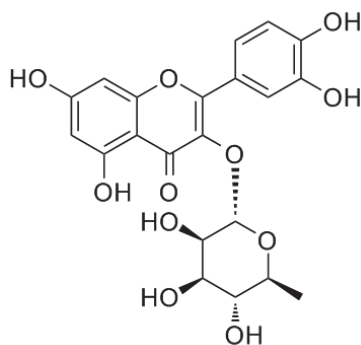
Kvercetin, 3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon, jedan je od najčešćih polifenola prisutnih u hrani, njegove glikozidne forme su obilno prisutne u luku i jabukama (Lee i Mitchell, 2012) (**Slika 13**). U Italiji je značajan unos kvercetina posledica obilne konzumacije vina, dok su luk i jabuke dominantan izvor kvercetina u SAD, Finskoj, Grčkoj, ali i republikama bivše Jugoslavije. Studija sprovedena u SAD zaključila je da od ukupne količine flavonola i flavona unetih ishranom (20-22 mg/danu) čak 73% - 76% čini kvercetin (Erlund, 2004). Kvercetin poseduje antioksidantnu, antiinflamatornu, imunoprotektivnu i antitumorsku aktivnost. Smatra se bezbednim za ljudsku upotrebu koja je u Italiji, na primer, ograničena na maksimalnih 200 mg dnevnog unosa (Andres i sar., 2018).



Slika 13. Kvercetin (<https://www.stemcell.com/quercetin.html>).

1.5.1.2.2. Kvercitrin

Kvercitrin, kvercetin-3-ramnozid, je glikozilovana forma kvercetina obilno prisutna u voću i povrću (Wagner i sar., 2006) (**Slika 14**).

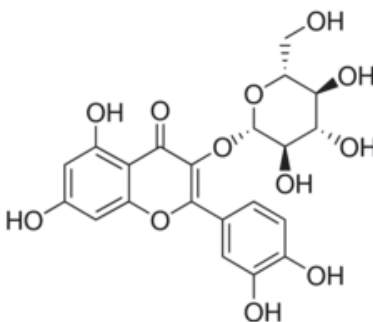


Slika 14. Kvercitrin (<https://www.medchemexpress.com/Quercitrin.html>).

Poseduje antioksidantnu i antitumorsku aktivnost (Cincin i sar., 2014). Prisustvo šećera u molekulu kvercitrina omogućava mu veću rastvorljivost od aglikonske forme, kvercetina, što može usloviti bolju absorpciju u digestivnom traktu i time izraženije biološke aktivnosti (Ma i sar., 2016). Testovima na miševima je utvrđeno da nije toksičan (Ambrose i sar., 1952).

1.5.1.2.3. Izokvercitrin

Izokvercitrin, kvercetin-3-O- β -D-glukopiranozid, je monoglukozid kvercetina koji se može naći u voću, povrću, žitaricama, čaju i vinu (**Slika 15**). U različitim *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima se pokazao kao efikasan agens u borbi protiv dijabetesa, kardiovaskularnih poremećaja, oksidativnog stresa i drugih stanja. Absorbuje se efikasnije od kvercetina, kvercitrina i rutina, a pokazuje i najbolju biodostupnost. Smatra se bezbednim za upotrebu u maksimalnoj koncentraciji od 5,4 mg/kg/danu (Valentova i sar., 2014).

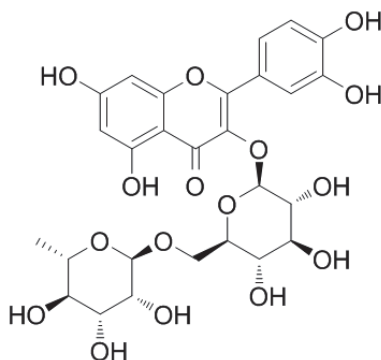


Slika 15. Izokvercitrin

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/isoquercitrin4643848235911?lang=en®ion= SX>)

1.5.1.2.4. Rutin

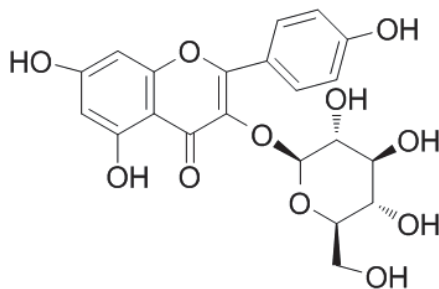
Rutin, 3',4',5,7-tetrahidroksi-flavon-3-rutinozid, je flavonolni glikozid koji se može naći u preko 60 biljnih vrsta uključujući kajsije i banane (**Slika 16**). Među njegove brojne biološke aktivnosti spadaju antimikrobna, antiinflamatorna i antidijabetes. Za razliku od kvercetina koji se absorbira još u tankom crevu, apsorpcija rutina teče sporije jer je neophodno prvo ukloniti šećernu komponentu bakterijama sa ramnozidaznom aktivnošću (Hosseinzadeh i sar., 2014). Rutin se preporučuje za svakodnevnu oralnu upotrebu u dozama od 500-2000 mg dnevno, a može se primenjivati u periodu dugom do 6 meseci (Gullon i sar., 2017).



Slika 16. Rutin (<https://www.medchemexpress.com/Rutin.html>)

1.5.1.2.5. Astragalin

Astragalin, kaempferol-3-O-glikozid, ekstrahovan je iz biljaka poput astragalusa i belog duda (**Slika 17**).



Slika 17. Astragalin (<https://www.medchemexpress.com/Astragalin.html>).

Njegova biološka aktivnost obuhvata antiinflamatornu, antioksidantnu, može štiti od dermatitisa (Pei i sar., 2016), a potencijalnu primenu može naći i u kozmetičkoj industriji jer inhibira kolagenazu i dovodi do smanjenja bora (Riaz i sar., 2018). Primena astragalina u kliničke svrhe je pod znakom pitanja zbog njegove niske rastvorljivosti u vodi koja vodi sporijoj resorpciji i nižoj biodostupnosti (Jeon i sar., 2018). Kako bi se prevazišao ovaj problem rastvorljivosti sintetisan je astragalin galaktozid, jedinjenje sa čak 1500 puta većom rastvorljivošću od astragalina. Ovo jedinjenje je zadržalo antioksidantnu aktivnost i sposobnost inhibicije angiotenzin konvertujućeg enzima (Han i sar., 2017). Nije poznato da li zadržava i antimikrobnu aktivnost. Za sada postoje podaci o citotoksičnom efektu na ćelije raka, ali ne o uticaja astragalina na zdrave ćelije (Ahmed i sar., 2016).

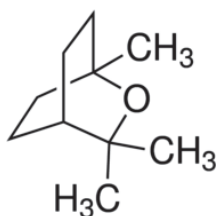
1.5.2. Terpeni

Terpeni su jedna od najvećih grupa jedinjenja prirodnog porekla, česta komponenta biljaka prisutna u većini komercijalnih esencijalnih ulja. Grupu terpena sačinjava preko 40000 jedinjenja. Većina ih je biljnog porekla, a neki mogu biti sintetisani i od strane drugih organizama, poput bakterija i kvasaca, kao deo primarnog ili sekundarnog metabolizma (Rodriguez-Garcia i sar., 2017). Pored strukturnih, fizioloških i metaboličkih funkcija terpeni imaju ulogu i u komunikaciji i odbrani biljaka. Često se nalaze u lekovitim biljkama a neki od njih, poput artemizina i taksola, se već koriste u farmaceutskoj industriji za lečenje malarije odnosno za lečenje raka (Goto i sar., 2010). Prema broju izoprenskih jedinica koje sačinjavaju njihov skelet dele se na monoterpene, koji sadrže dve izoprenske jedinice, seskviterpene sa tri izoprenske jedinice, diterpene sa četiri izoprenske jedinice, triterpene sa šest i tetraterpene sa osam izoprenskih jedinica. Uopšteno gledano, terpeni poseduju širok spektar aktivnosti poput antimikrobne, antiinflamatorne, kardio stimulante i drugih (Thoppil i Bishayee, 2011; Rodriguez-Garcia i sar., 2017). U prirodi se nalaze u slobodnom ili u glikozilovanom obliku. Biosintetski put terpena uključuje kombinaciju dva prekursora izoprenil-difosfata i dimetilalil-difosfata. Ovi prekursori nastaju iz različitih biosintetskih puteva - mevalonatnog, ne-mevalonatnog i dezoksisilulozil-fosfatnog puta. Preniltransferaze

katalizuju nastanak acikličnih intermedijera, geranil-difosfata (GPP), farnezil-difosfata (FPP) i geranil-geranil difosfata (GGPP). Na ove intermedijere deluju terpen ske sintaze i od GPP nastaju monoterpeni, od FPP seskviterpeni, a iz GGPP diterpeni. Kod viših biljaka i većine algi aktivna su dva puta biosinteze izoprenoidnog metabolizma: mevalonatni koji se odvija u citoplazmi i vrši sintezu seskviterpena i ne-mevalonatni koji se odvija u plastidima i vrši sintezu monoterpena i diterpena (Dewic, 2002). Karakteriše ih niska rastvorljivost u vodi i shodno tome niska biodostupnost, ali usled visokog značaja koji imaju za farmaceutsku, kozmetičku kao i industriju hrane, intenzivno se radi na prevazilaženju ovog problema (Papada i sar., 2018).

1.5.2.1. Eukaliptol

Eukaliptol, 1,8 cineol, spada u grupu monoterpena i uglavnom se dobija iz esencijalnog ulja eukaliptusa (**Slika 18**). Koristi se za lečenje bolesti disajnih puteva, a poseduje i antioksidantnu i antiinflamatornu aktivnost (Lai i sar., 2017). Eukaliptol se generalno smatra bezbednim, ali isto tako je pokazano da eukaliptol primenjen oralno na miševima u koncentraciji od 3849 mg/kg ubija 50% populacije (LD₅₀) (Xu i sar., 2014).



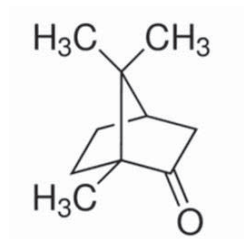
Slika 18. Eukaliptol

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c80601?lang=en®ion=XX>).

1.5.2.2. Kamfor

Kamfor je monoterpenoid dobijen iz drveta kamforovca koje raste u Aziji, ali je uvedeno i u druge delove sveta (**Slika 19**). Kamfor se još u kineskoj medicini koristio kao stimulans cirkulacije i analeptik. Prisutan je na komercijalnom tržištu kao aromatična komponenta, a u naučnim ispitivanjima pokazao je antimikrobni, antiviralni

i antitusivni efekat (Chen i sar., 2013). Američka uprava za hranu i lekove dozvoljava njegovu upotrebu u različitim proizvodima u koncentraciji do 11% (Love i sar., 2004).



Slika 19. Kamfor

(https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w526606?lang=en®ion=SX&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold2-2).

1.5.3. Jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže azot i predloženi mehanizam delovanja

Azoli su heterociklična jedinjenja sa prstenom od 5 atoma koji sadrži atom azota i makar još jedan atom koji nije ugljenik (azot, sumpor, kiseonik) kao deo heterocikličnog prstena. Azoli koji se koriste kao antifungalni lekovi su sintetičkog porekla, iako se neke komponente azolne strukture mogu naći u prirodi (Eicher i Hauptmann, 2006; Kumar i sar., 2013). Među azotna jedinjenja, pored azola, mogu se ubrojati sva ona koja sadrži atom azota, poput nitratnih estara, za koje se pretpostavlja sličan mehanizam delovanja (Smiljković i sar., 2017b).

1.5.3.1. Nitratni estri heterocikličnih jedinjenja

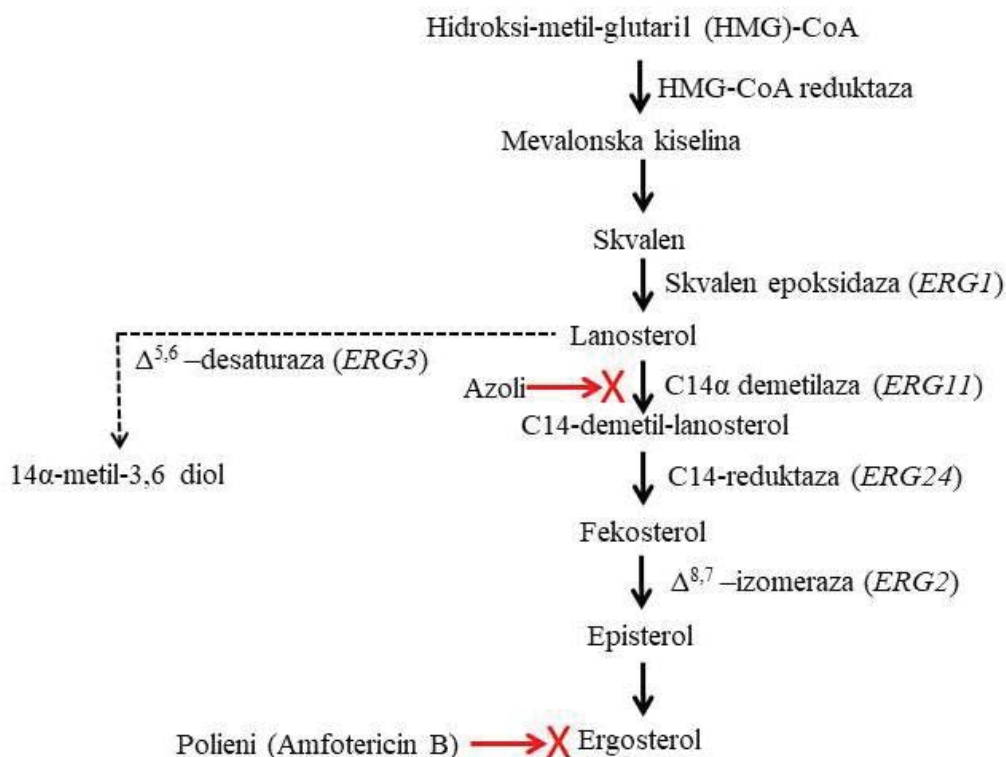
Heterociklična jedinjenja u svom sastavu imaju prsten od makar dva različita atoma. Veliki procenat lekova koji su u skorije vreme dospeli na farmaceutsko tržište u svom hemijskom sastavu sadrži različite heterociklične strukture. Razlog tome je što jedinjenja sa ovakvim strukturama ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti uključujući antifungalnu, antiinflamatornu, antialergijsku (Saini i sar., 2013).

Nitratni estri su jedinjenja koja sadrže nitroksi funkcionalnu grupu ($-ONO_2$), a zabeleženo je da ispoljavaju aktivnosti poput antiinflamatorne i kardioprotektivne (Thatcher i sar., 2004). Za nitratne estre je u studiji Kutty i sar, 2013 utvrđeno da mogu

remetiti međućelijsku komunikaciju bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Usled navedenih literaturnih podataka se za jedinjenja koja sadrže i heterocikluse i nitroksi grupu može očekivati širok dijapazon bioloških aktivnosti.

1.5.3.2. Ergosterol kao ciljno mesto antifungalnog delovanja

Azoli sprečavaju rast *C. albicans* inhibicijom enzima lanosterol 14 α -demetilaze. Ovaj enzim spada u grupu citohrom P450 zavisnih enzima (CYP51) a kodira ga gen *ERG11*. Enzim ima funkciju demetilacije lanosterola što je jedan od koraka u sintezi ergosterola, lipida esencijalnog za strukturu ćelijske membrane gljiva (Šema 1).

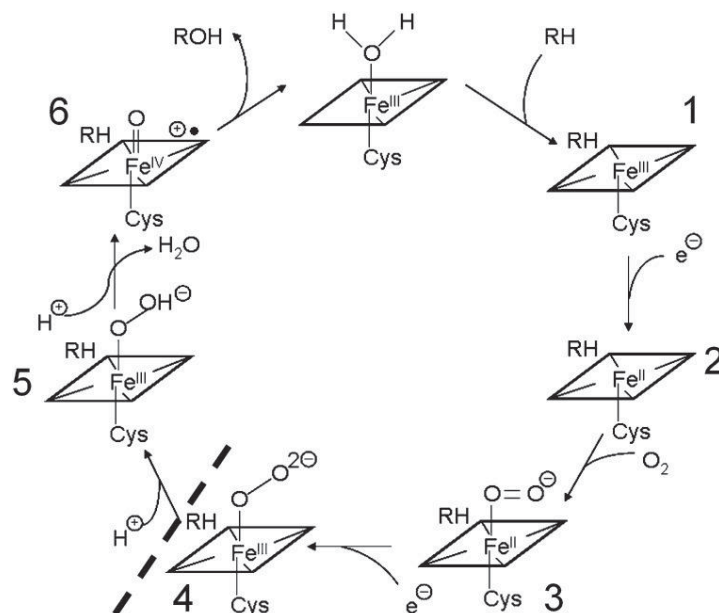


Šema 1. Mehanizam delovanja antifungalnih lekova kojima je ciljno mesto ergosterol (azoli i polieni). Sa desne strane se nalaze enzimi uključeni u sintezu ergosterola, a geni koji ih kodiraju su dati u zagradama. Antifungalni lekovi su dati sa leve strane a crvenim strelicama je označen korak biosinteze ergosterola na koji deluju (adaptirano prema Lupetti i sar., 2002).

Pri inhibiciji enzima lanosterol 14 α -demetilaze dolazi do inkorporiranja nusprodukata sinteze, poput 14 α -metil-3,6 diola, umesto ergosterola u ćelijsku membranu što vodi remećenju njenog integriteta (Lupetti i sar., 2002; Becher i Wirsel, 2012). Pored uticaja na biosintezu ergosterola i direktno vezivanje za njega može dovesti do fungicidnog efekta, što je mehanizam delovanja karakterističan za lekove iz grupe poliena (Scorzoni i sar., 2017).

1.5.3.3. Citohromi P450 i CYP51 kao njihov član

Citohromi familije P450 (CYP) su grupa proteina koja katalizuje monooksigenaciju. Prisutni su u svim biološkim carstvima. CYP superfamilija ima veliki broj članova sa esencijalnom ulogom u metaboličkim putevima i metabolizmu ksenobiotika. Kod eukariota, proteini CYP familije imaju različite uloge poput biosinteze holesterola, steroidnih hormona i vitamina. Ovi proteini kontrolišu i fiziologiju kardiovaskularnog sistema, imaju ulogu u održavanju krvnog pritiska, metabolizmu lekova i mnoge druge (Podust i sar., 2007; Becher i Wirsel, 2012). CYP proteini su podeljeni u 10 klasa i 267 familija, među kojima je i CYP51. Za razliku od ostalih članova CYP superfamilije, proteini CYP51 su sačuvali usku funkciju, tj. uklanjanje 14-metil grupe sa prekursora sterola i tokom evolucije zadržali su visoku specifičnost za substrat (Becher i Wirsel, 2012). Imaju ulogu u biosintezi ergosterola kod gljiva, holesterola kod sisara i različitih C-24-modifikovanih sterola kod biljaka i protozoa (Podust i sar., 2007). CYP51 proteini gljiva i sisara su 38-42% identični na aminokiselinskom nivou (Rozman i sar., 1996). Nalaze se na spoljašnjoj strani endoplazmatičnog retikuluma (Parker i sar., 2014). Aktivno mesto enzima sadrži protoporfirinski prsten sa gvožđem (Campoy i Adrio, 2017). Ovo gvožđe je posrednik u transportu elektrona koji dovodi do oksigenacije substrata tokom katalitičkog ciklusa P450 enzima (**Šema 2**). Katalitička reakcija inhibicije CYP51 lekovima iz grupe azole počinje tako što se slobodan elektronski par azota azolnog prstena vezuje za atom gvožđa u hem prostetičkoj grupi CYP51 u aktivnom mestu enzima; a grupa koja je N1 substituent interaguje sa aminokiselinama smeštenim oko džepa aktivnog mesta enzima. Specifičnost pri delovanju azolnih jedinjenja zavisi od interakcije sporednih grupa azola i CYP51 (Parker i sar., 2014).

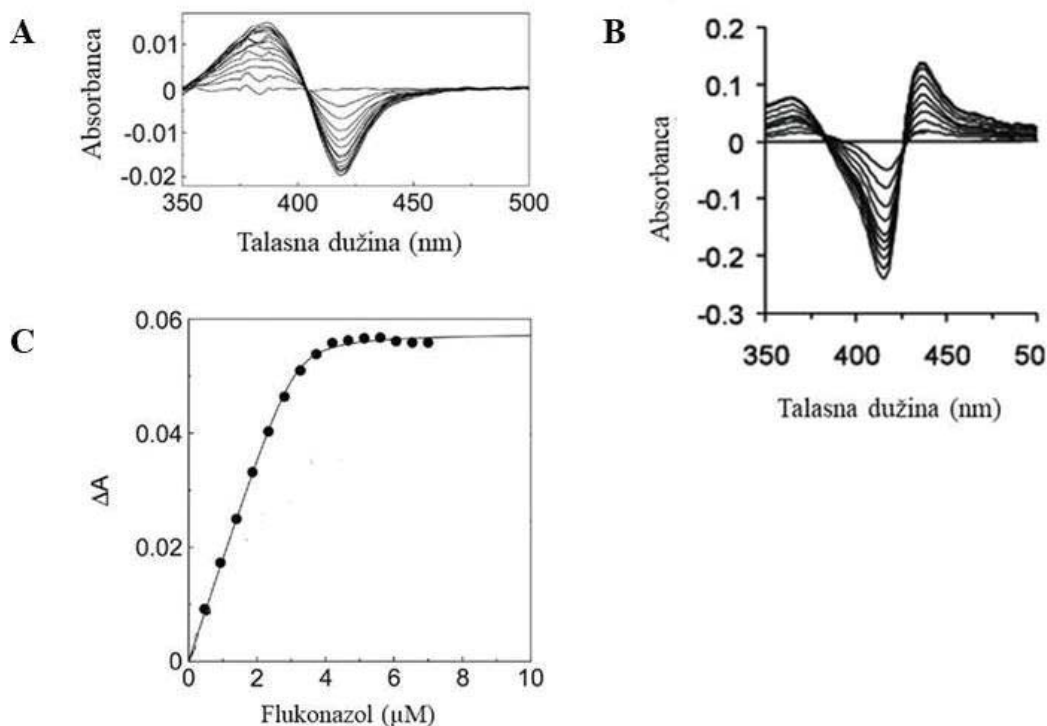


Šema 2. Katalitički ciklus P450 enzima počinje vezivanjem substrata (**korak 1**). Ovo je okidač za otpuštanje prvog elektrona koji redukuje gvožđe hem grupe. Potom se molekularni kiseonik vezuje za atom gvožđa (**korak 2**) formirajući Fe²⁺-OO (**korak 3**). Otpušta se drugi elektron i vezuje za kompleks gvožđa i kiseonika stvarajući ferični perokso intermedijer (Fe³⁺-O-O²⁻) (**korak 4**). Protonacija kiseonika dovodi do formiranja feričnog hidroperokso intermedijera (Fe³⁺-O-OH⁻) (**korak 5**), a druga protonacija kiseonika dovodi do heterolitičkog sečenja O-O veze i oslobađanja vode, čime se stvara gvožđe⁴⁺okso porfirin katjonski radikal (Por⁺•Fe⁴⁺=O) (**korak 6**) koji se ponaša kao katalitički aktivno mesto. U ovom koraku substrat je oksigenisan a gvožđe se vraća u prvobitno stanje (Hargrove i sar., 2012)

1.5.3.4. Spektrofotometrijske karakteristike proteina CYP51

CYP51 enzimi za substrat imaju sterole. Progresivna titracija enzima odgovarajućim substratima (lanosterol kod sisara i kvasaca) dovodi do takozvanog tipa 1 diferencijalnog spektra koji ima maksimalnu absorbancu na 380-390 nm, a minimalnu na 415-420 nm (**Slika 20a**). Tip 1 vezujući spektar (engl. Type I binding spectra) se formira kada substrat (ili neki drugi molekul) istisne molekule vode koji se nalazi vezan za hem prostetičnu grupu, što dovodi do promene konformacije hema (**Slika 20a**)

(Parker i sar., 2014). Tip 2 vezujućeg spektra je karakterističan za vezivanje azolnih inhibitora za protein CYP51 (Slika 20b).



Slika 20. A- Tip 1 vezujućeg spektra karakterističan za vezivanje substrata za CYP51; B- Tip 2 vezujućeg spektra, karakterističan za vezivanje inhibitora; C- Kriva zasićenja flukonazolom (Podust i sar., 2007; Parker i sar., 2014).

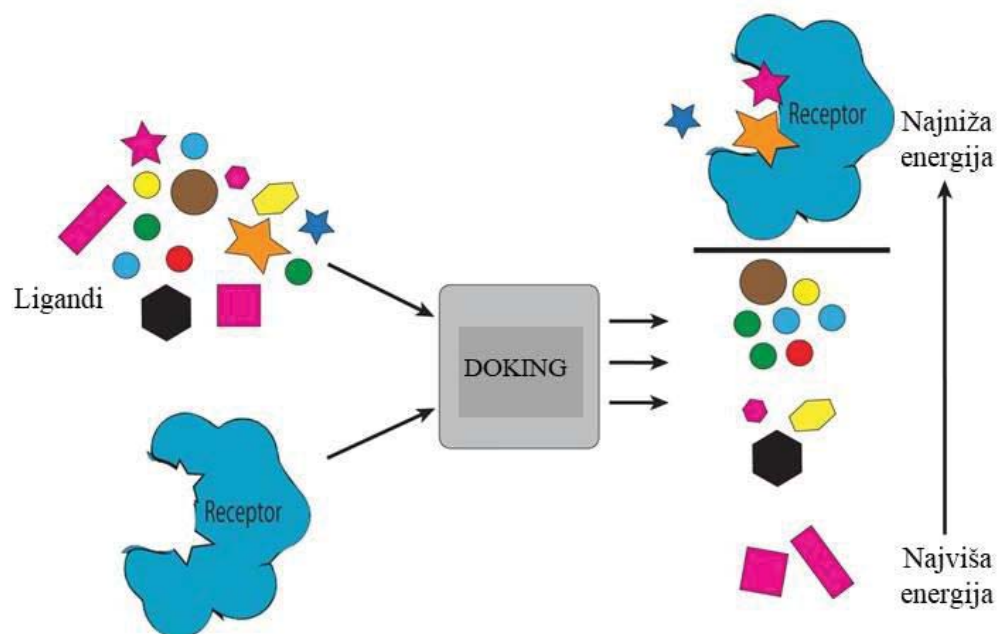
Tokom ovih promena absorbance je minimalna na oko 416 nm, a najveća na oko 436 nm, što je posledica zamene molekula vode jačim ligandom, uglavnom jedinjenjem koje ima alifatičnu ili aromatičnu grupu sa azotom. Prilikom vezivanja tipa 2 ne dolazi do promene spina i koordinativnog stanja gvožđa hem grupe (Podust i sar., 2007). Vezujući spektri se koriste za ispitivanje afiniteta substrata za enzim. Pravljenjem krive zasićenja (odnos promene absorbance i koncentracije substrata) može se izračunati konstanta disocijacije za kompleks enzim-substrat (K_D) (Slika 20c) (Parker i sar., 2014)

1.6. *In silico* metode kojima se može vršiti odabir potencijalnog liganda

Poslednjih decenija, pored *in vivo*, *in vitro* i *in situ* pristupa u različitim ispitivanjima, sve se više koriste i *in silico* metode. Izraz “*in silico*” se odnosi na istraživanja koja se izvode pomoću kompjutera. *In silico* metode se često primenjuju u farmakološkim hipotezama, a uključuju ispitivanja različitih baza podataka, farmakofora, homologa modelovanja, molekularni doking, molekularnu dinamiku i druge. Ova istraživanja su trenutno u razvoju a kao krajnji cilj između ostalog imaju i pronalazak novih lekova koji bi inhibirali određeni biološki target (Ekins i sar, 2007).

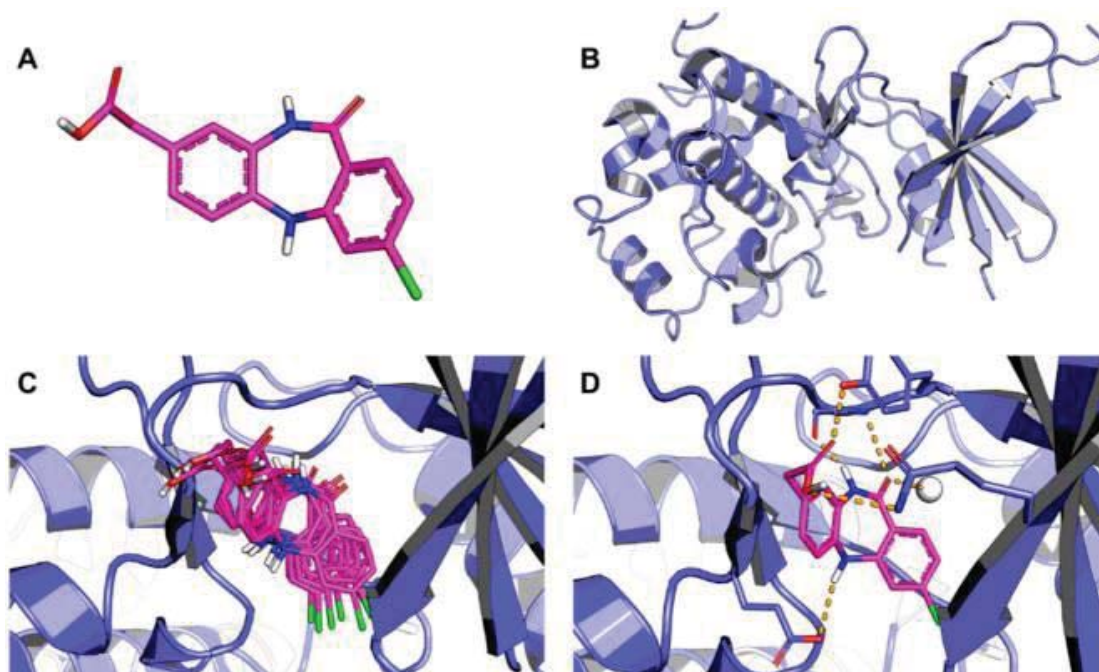
1.6.1. Molekularni doking

Molekularni doking (engl. Molecular docking) je ključni alat u strukturnoj molekularnoj biologiji i dizajnu lekova pomoću kompjutera. Cilj molekularnog odnosno ligand-protein dokinga je predviđanje najverovatnijeg načina vezivanja liganda za protein poznate trodimenzionalne strukture (**Slika 21**) (Morris i Lim-Wilby, 2008). Doking na osnovu atomskih koordinata dva atoma predviđa njihov način vezivanja (Halperin i sar., 2002). Koristi se za pretpostavljanje optimalne pozicije i orijentacije malih molekula u proteinskom targetu (Śledź i Caflisch, 2018). Može se koristiti i kako bi se pretražile velike biblioteke jedinjenja, uporedili rezultati i postavila hipoteza o načinu na koji ligand inhibira ciljni protein (Morris i Lim-Wilby, 2008).



Slika 21. Uprošćen princip molekularnog dokinga – raznovrsni ligandi mogu da se vezuju za receptor, oni se najvećim potencijalom se odabiraju na osnovu energije vezivanja (Jacob i sar., 2012).

Proces dokinga se sastoji od dva glavna koraka: predviđanja konformacije liganda i njegove pozicije u okviru aktivnog mesta proteina kao i predviđanja afiniteta vezivanja (**Slika 22**). Poznavanje mesta vezivanja na proteinu znatno povećava efikasnost dokinga (Meng i sar., 2011). Pri određivanju osobina mesta vezivanja na proteinu koristi se trodimenzionalna (3D) struktura ciljnog molekula koja može biti dobijena eksperimentalno (metodom kristalografije X zracima ili nuklearnom magnetnom rezonancom) ili kompjuterskim tehnikama (homologo modelovanje) (Salmaso i Moro, 2018). Homologo modelovanje se vrši poređenjem sekvence proteina od interesa sa proteinom najbližije sekvence čija je 3D struktura poznata. Trodimenzionalna struktura proteina iste familije je konzerviranija od njihove primarne sekvence. Stoga, ukoliko dva proteina imaju sličnu sekvencu može se pretpostaviti da postoji sličnost i njihovih trodimenzionalnih struktura (Fiser i Šali, 2003).



Slika 22. Faze u procesu dokinga **A-** trodimenzionalna struktura liganda, **B-** trodimenzionalna struktura receptora, **C-** ligand je spojen („docked“) sa aktivnim mestom receptora i pretpostavljene konformacije se istražuju, **D-** najverovatnija konformacija kompleksa ligand-receptor i odgovarajuće intermolekularne interakcije su određeni. Atomi ugljenika liganda su obojeni pink, a aminokiseline aktivnog mesta receptora tamno plavo. Isprekidanim linijama označene su vodonične veze (Ferreira i sar., 2015).

Početak istraživanja mehanizma vezivanja liganda i receptora je takozvana teorija ključa i brave, po kojoj se ligand i receptor uklapaju kao ključ i brava. Najranije metode dokinga bile su bazirane na njoj, odnosno posmatrale su i ligand i receptor kao rigidna tela. Kasnije je razvijena teorija takozvanog indukovano spajanja (engl. induced-fit theory), po kojoj se aktivno mesto proteina stalno menja pod uticajem liganda, jer su i ligand i protein fleksibilne strukture, što omogućava veću preciznost u predviđanjima. Usled ograničenih kapaciteta kompjutera, trenutno većina istraživanja tretira ligand kao fleksibilnu, a protein kao rigidnu strukturu. Radi se na razvoju efikasnijih metoda koje bi uzele u obzir i fleksibilnost proteina (Meng i sar., 2011). Od značaja za napredak molekularnog dokinga bio je razvoj proteinske baze podataka (Protein Data Bank, PDB)

odakle su se mogle koristiti kristalne strukture različitih proteina, kao i razvoj softvera za doking poput DOCK i GRID (Halperin i sar., 2002).

1.6.2. Molekularna dinamika

Prilikom vezivanja liganda, često inhibitora određene funkcije ciljnog molekula, ne dolazi samo do konformacione promene ciljnog proteina, već se i ligand menja kroz vreme. Molekularni doking predviđa položaj i energiju vezivanja malih molekula, ali ne uzima u obzir ove konformacione promene jer najčešće tretira receptor kao rigidnu strukturu i jedino fleksibilnost liganda uzima u razmatranje. Takođe, doking ne uzima u obzir efekat rastvarača na vezivanje. Molekularna dinamika prati vremensku evoluciju molekulskih sistema, razmatrajući i efekte rastvarača i fleksibilnost liganda i targeta. Informacije dobijene molekularnom dinamikom mogu se iskoristiti za razvoj novih lekova, jer pomažu u dobijanju detaljnih informacija o načinu delovanja inhibitornih molekula (Meller, 2001; Durrant i McCammon, 2011; Borhani i Shaw, 2012).

Simulacije molekularne dinamike koriste podatke o svim atomima koji interaguju, a ti podaci mogu biti dobijeni kristalografijom, NMR spektroskopijom ili modeliranjem na osnovu homologije dva molekula. Molekularna dinamika koristi tzv. polje sila (engl. Force field) koje opisuje zavisnost energije sistema od položaja njegovih delova. Polje sila se koristi za približno određivanje sile koja deluje na svaki atom u datom trenutku vremena (van der Kamp i sar., 2008), a predstavlja skup parametara kojima se određuje potencijalna energija sistema tokom simulacija. To je matematička jednačina koja opisuje zavisnost energije sistema od koordinata njegovih delova. Koristi se za određivanje povezanosti različitih delova sistema i njihovih međusobnih interakcija (Gonzales, 2011). Simulacije molekularne dinamike baziraju se na drugom Njutnovom zakonu:

$F=m*a$ (F-sila, m-masa atoma, a-ubrzanje).

U molekularnoj dinamici ova jednačina integraljuje na:

$$F_i = m_i d^2r_i(t)/dt^2$$

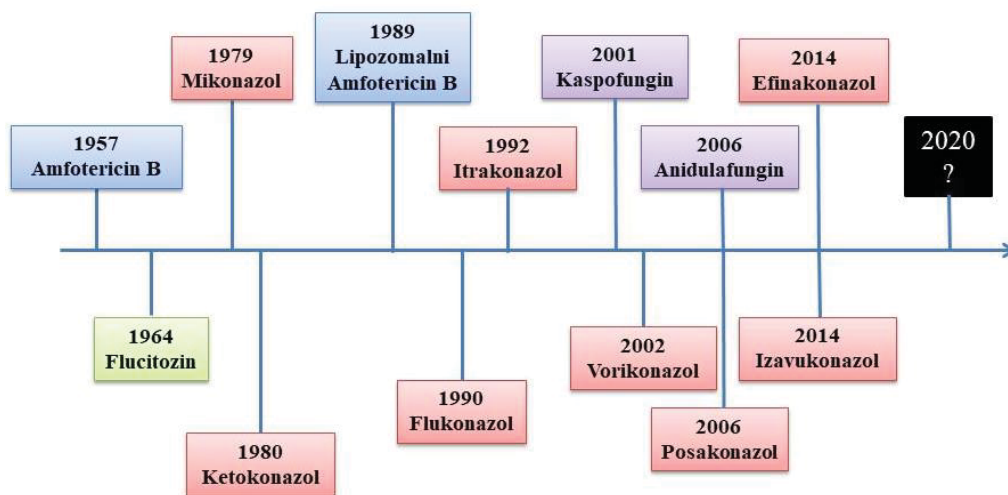
gde je F_i sila koja deluje na atome (i) mase m_i u toku vremenskog interval (t), dt predstavlja male vremenske intervale u toku kojih se prate promene konformacije, a r_i poziciju svakog atoma (Meller, 2001; Lamberti i sar., 2002). Među programima koji se

koriste pri simulaciji molekularne dinamike najčešći su GROMACS, CHARMM, AMBER, i NAMD (Munz i Biggin, 2012).

1.7. Antimikotici u lečenju infekcija *Candida albicans*

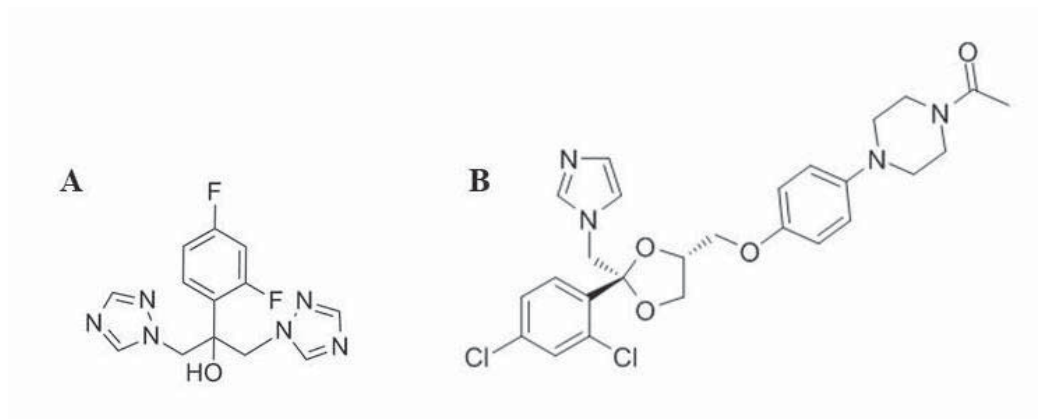
Procenjuje se da je period od 8 do 10 godina potreban kako bi se razvio nov antifungalni lek. Novi lekovi se razvijaju sa ciljem povećanja biodostupnosti, smanjenja toksičnosti i proširenja spektra dejstva (**Slika 23**) (Scorzoni i sar., 2016; Scorzoni i sar., 2017).

Od lekova koji se trenutno koriste za suzbijanje kandidijaza, najviše ima onih koji po hemijskoj strukturi spadaju u azole. I ako su prvi azoli sa antifungalnom aktivnošću pronađeni još 1944. godine, sa kasnijim godinama i napretkom istraživanja veliki broj novih jedinjenja koja spadaju u ovu grupu je pronađen (Sheehan i sar., 1999).



Slika 23. Vremenski tok razvitka novih antifungalnih lekova, plavo – polieni; zeleno – pirimidinski analog, crveno – azoli, ljubičasto – ehinokandini.

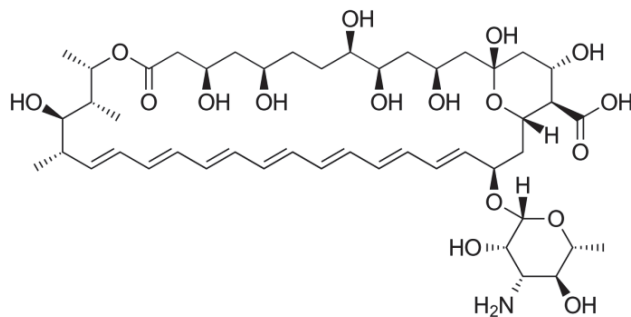
Među azolnom grupom lekova naročito je česta upotreba flukonazola koji se izdvaja zahvaljujući niskoj ceni, niskoj toksičnosti i mogućnosti za oralnu primenu (Whaley i sar., 2017). Spisak azola koji se koriste za lečenje kandidijaze obuhvata i ketokonazol, itrakonazol, vorikonazol, mikonazol i druge (**Slika 24**). Najnoviji među njima su izavukonazol i efinkonazol (Campoy i Adrio, 2017).



Slika 24. A- flukonazol, **B-** ketokonazol (strukture preuzete sa: <https://www.medchemexpress.com/>).

Flukonazol ispoljava fungistatično delovanje, što dovodi do toga da nakon njegove primene postoji verovatnoća da neke ćelije gljive ostanu žive. Ćelije koje prežive delovanje leka mogu postati otporne na njegovu buduću primenu. U SAD kod pacijenata obolelih od kandidemije 7% *C. albicans* je rezistentno na flukonazol (Cleveland i sar., 2012). U Španiji je među izazivačima kandidemije taj procenat znatno niži (< 1%), ali smrtnost kod pacijenata zaraženih ovim sojevima ide do 74% (Marcos-Zambrano i sar., 2014). Pored razvijanja otpornosti na jedan azolni lek, postoji i mogućnost razvitka višestruke rezistencije na ketokonazol, flukonazol, itrakonazol i vorikonazol među obolelima od HIVa i decomp sa orofaringealnom kandidijazom (Müller i sar., 2000). Od kada su se azolni lekovi prvi put pojavili na farmaceutskom tržištu zabeležena su različita neželjena dejstva (Sheehan i sar., 1999; Bondaryk i sar., 2013). U njih spadaju oštećenja jetre do kojih dovodi upotreba ketokonazola i itrakonazola (García Rodríguez i sar., 1999). Oštećenje kože, povećanje aktivnosti transaminaza, encefalopatija ili halucinacije su neželjena dejstva koja se mogu javiti kao posledica upotrebe vorikonazola, dok posakonazol može dovesti do gastrointestinalnih tegoba i glavobolja (Kathiravan i sar., 2012).

Među lekovima koji po stukturi nisu azoli, amfotericin B jedan je od najčešće korišćenih (**Slika 25**).



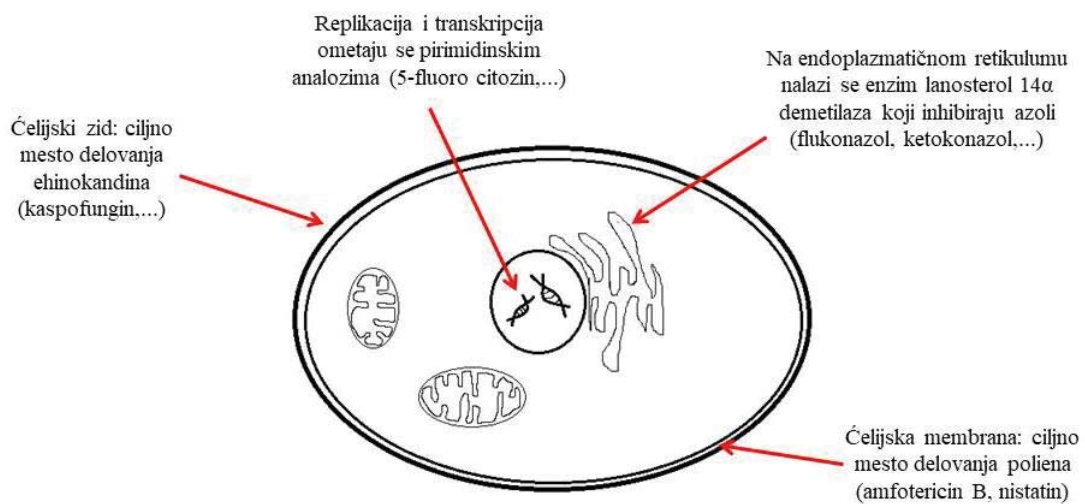
Slika 25. Amfotericin B (https://en.wikipedia.org/wiki/Amphotericin_B).

On spada u grupu poliena i ispoljava svoje dejstvo tako što se vezuje za ergosterol, esencijalan lipid ćelijske membrane gljiva, dovodeći do narušavanja integriteta ćelije (**Slika 26**) (Gray i sar., 2012). Njegova upotreba je praćena brojnim neželjenim dejstvima, najčešće nefrotoksičnošću, pa je razvijena formulacija lipozomalnog amfotericina B (amfotericin B obavijen lipozomnim dvoslojem) koji izaziva manje sporednih efekata (Stone i sar., 2017). Nistatin takođe spada u grupu poliena i deluje na isti način kao amfotericin B, praveći pore u membrani.

Pirimidinski analozi poput 5-fluoro citozina deluju tako što se umesto odgovarajućih nukleotida inkorporiraju u lanac DNK/RNK prilikom replikacije i transkripcije. Veliki procenat *C. albicans* je rezistentan na ovu grupu lekova čineći njenu upotrebu ograničenom (Spampinato i Leonardi, 2013).

Ehinokandini su grupa antifungalnih lekova pronađena još 70ih godina prošlog veka. Međutim, kako su u kliničku praksu ušli nekih tridesetak godina kasnije, spadaju u najnoviju generaciju antifungalnih agenasa (Roemer i Krysan, 2014). Oni inhibiraju (1,3)-D-b-glukan sintazu čime remete sintezu ćelijskog zida (**Slika 26**) (Cannon i sar., 2007). Kaspofungin je prvi član ove grupe koji je prošao klinička testiranja, dok su nešto kasnije i mikafungin i anidulafungin ispitani i odobreni od strane Američke agencije za hranu i lekove (Grover, 2010).

Trenutno se radi na razvoju vakcine koja bi se koristila u sprečavanju fungalnih infekcija. Iako je više vakcina do sada predloženo, samo su neke od njih dospele do kliničkih istraživanja. Najveći problem u razvoju vakcina predstavljaju imunokompromitovani pacijenti koji su podložniji infekcijama od prosečne populacije a nemaju funkcionalan imunski odgovor (Wang i sar., 2015).



Slika 26. Ciljna mesta delovanja lekova koji se koriste za lečenje infekcija izazvanih *C. albicans*.

2. Ciljevi

Različite formulacije antifungalnih lekova trenutno su dostupne rastućem broju pacijenata koji se bore sa infekcijama izazvanim vrstom *C. albicans*. Upotreba mnogih od njih povezivana je kako sa neželjenim efektima po čoveka tako i sa mogućnošću da dovedu do nastanka rezistencije među fungalnim sojevima. Stoga, postoji sve veća potreba u farmaceutskoj industriji, a samim tim i sve veća težnja u naučnoj zajednici, ka pronalasku efikasnijih agenasa kojima bi se suzbio razvoj *C. albicans* kao patogena. Među jedinjenjima koja se mogu ispitivati zastupljena su sintetska, ali i jedinjenja poreklom iz prirode koja se u narodu uglavnom smatraju bezbednijim izborom za različite medicinske aplikacije.

Kako bi se ispitao i upoređio mehanizam antifungalne aktivnosti odabranih jedinjenja, ali i procenio njihov potencijal da nađu ili zadrže svoje mesto u različitim farmaceutskim formulacijama, neophodno je bilo ostvariti sledeće ciljeve:

- izolacija i identifikacija sojeva *C. albicans* iz usne duplje pacijenata;
- određivanje antifungalne aktivnosti odabranih jedinjenja;
- ispitivanje inhibitornog potencijala testiranih jedinjenja na:
 - * faktore virulencije *C. albicans*: formiranje biofilma i prelazak iz kvasolike u hifalnu formu,
 - * faktore rezistencije *C. albicans*: ekspresiju gena povezanih sa povećanom otpornošću na antifungalni tretman (*CDR1*, *CDR2* i *MDR1*);
- ispitivanje predloženih mehanizma antimikrobnog delovanja odabranih jedinjenja:
 - * inhibicija lanosterol 14 α -demetilaze: sposobnost jedinjenja da inhibiraju ciljani protein ili dovedu do promene nivoa ekspresije gena koji ga kodira,
 - * *in silico* predikcija načina vezivanja i stabilnosti odabranih jedinjenja u kompleksu sa lanosterol 14 α -demetilazom,
 - * narušavanje integriteta fungalne ćelijske membrane;
- određivanje citotoksične aktivnosti odabranih jedinjenja i to na primarnim ćelijama jetre.

3. Materijali i metode

3.1. Odabrana jedinjenja i hranljive podloge

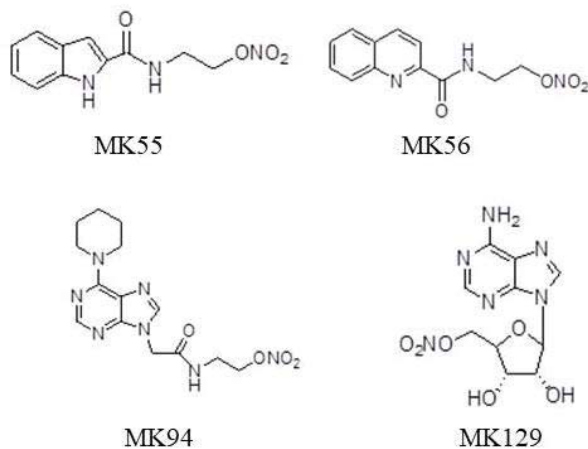
U eksperimentima su korišćeni odabrani predstavnici dve grupe prirodnih jedinjenja, flavonoida i terpena. Ispitivani su sledeći flavonoidi: apigenin, apigetrin, astragalin, kvercetin, kvercitrin, izokvercitrin, rutin, luteolin i viteksin. Od terpena su korišćeni kamfor i eukaliptol. Flavonoidna i terpenska jedinjenja (**Tabela 1**) su rastvarana u etanolu (30%).

Tabela 1. Jedinjenja prirodnog porekla korišćena tokom izrade doktorske disertacije.

Naziv jedinjenja	Grupa	Proizvodjač
Apigenin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Apigetrin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Astragalin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Kvercetin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Izokvercitrin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Rutin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Luteolin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Viteksin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Kvercitrin	Flavonoid	Extrasynthese, Genay Cedex, France
Kamfor	Terpen	Sigma, Germany
Eukaliptol	Terpen	Sigma, Germany

Ispitivana su i 4 nitratna estra heterocikličnih jedinjenja prethodno sintetisana na Nacionalnoj Helenskoj Istraživačkoj Fondaciji Atina, Grčka (Fotopoulou i sar., 2008; Koufaki i sar., 2012). Ispitivana su sledeća jedinjenja: N-(2-nitrooksietil)-1H-indol-2-karboksamid (MK55), N-(2-nitrooksietil)-kvinolin-2-karboksamid (MK56), N-(2-nitrooksietil)-6-(piperidin-1-il)-9H-purin acetamid (MK94), 5'-O-nitro adozin (MK129) (**Slika 27**). Nitratni estri heterocikličnih jedinjenja rastvarani su u DMSO (dimetil sulfoksid, 5%) u koncentraciji 1 mg/mL. Komercijalni antifungalni lekovi

ketokonazol (Sigma, SAD), amfotericin B (Sigma, SAD) korišćeni su kao pozitivne kontrole.



Slika 27. Strukture nitratnih estara heterocikličnih jedinjenja (Smiljković i sar., 2017b)

Podloge

Tryptic Soya Agar/Broth (TSA/TSB)

kazein pepton.....15g
soja pepton.....5g
natrijum hlorid.....5g
agar.....15g
destilovana voda.....1l
pH=7,3±0,2 (reguliši se uz pomoć 1N NaOH)

Sabouraud Dextrose Agar/Broth (SDA/SDB)

glukoza.....40g
pepton.....10g
agar.....15g
destilovana voda.....1l
pH=5,6±0,2 (reguliši se uz pomoć 1N NaOH)

Yeast Pepton Agar/Broth (YPA/YPD)

pepton.....10g
ekstrakt kvasca.....5g
dekstroza.....20g
agar.....15g
destilovana voda.....1l
pH=7,0±0,2 (reguliši se uz pomoć 1N NaOH)

3.2. Izolacija i identifikacija *Candida albicans*

Uzorkovanje *C. albicans* vršeno je u saradnji sa Klinikom za Otorinolaringologiju, Kliničko bolničkog centra Zvezdara, Beograd, Srbija u periodu 2014-2015. Uzorkovanje mikroorganizama odobreno je od strane Etičkog odbora Kliničko bolničkog centra Zvezdara, Srbija (**Prilog 1**).

Kod pacijenata kod kojih je posmatranjem utvrđeno postojanje belih naslaga u usnoj duplji sterilnim brisom je prelaženo preko sluzokože usne duplje čime su sakupljeni uzorci. Brisevi su utrljavani na Sabouraud Dekstrozni Agar (SDA, Torlak, Srbija) i inkubirani na 37 °C, 24 h. Kolonije sa podloga gde je bio primetan rast mikroorganizama presejavane su na selektivnu podlogu (CHROMagar, Biomerieux, Francuska) gde se nakon inkubacije (na 37 °C, 24 h) *Candida albicans* boji zeleno. Kolonije *C. albicans* gajene su na 37 °C, 24 h u 2 mL podloge čime su dobijene prekonocne kulture mikroorganizma. Od prekonocnih kultura pravljene su štokovi mikroorganizama koji će se dalje čuvati na -80 °C (u 40% sterilnom glicerolu) kao i razblaženja *C. albicans* koja će se koristiti u daljim eksperimentima. Svi mikroorganizmi su deponovani u Mikoteci mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

3.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti jedinjenja metodom mikrodilucije

Antifungalna aktivnost jedinjenja utvrđivana je mikrodilucionom metodom (Daouk i sar., 1995; EUCAST, 2002). Određivane su minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne

fungicidne koncentracije (MFK) svih jedinjenja navedenih u **Odeljku 3.1.** Dva komercijalna antifungalna agensa, ketokonazol i amfotericin B, korišćeni su kao pozitivne kontrole. *C. albicans* su inkubirane u SDB medijumu na 37 °C, 24 h. Čelijske suspenzije su standardizovane primenom denzitometra DEN1B (Biosan, Litvanija) tako da finalna koncentracija u jednom polju mikrotitar ploče iznosi 1×10^5 ćelija (100 µL je ukupna zapremina). Inokulumi su čuvani na hladnom (+ 4 °C) do upotrebe. Minimalne inhibitorne i minimalne fungicidne koncentracije određivane su serijskim razblaženjima jedinjenja u TSB medijumu u mikrotitar pločama sa ravnim dnom, 96 sistem (Spektar, Čačak). Poslednji red u mikrotitar ploči korišćen je kao kontrola (dodavan je samo medijum i *C. albicans*) a pretposlednji kao blank (dodavan je samo čist medijum). Ploče su inkubirane na 37 °C, 24 h. Nakon inkubacije, radi lakšeg posmatranja rezultata, u bunarčice je dodato po 40 µl p-jodonitrotetrazolijum boje (0,2 mg/mL, INT, I 8377–Sigma, SAD) koja žive ćelije boji roze. Minimalna inhibitorna koncentracija je određivana kao najmanja koncentracija na kojoj nije bilo vidljivog rasta *C. albicans* nakon inkubacije (oko 3 h ili duže) sa bojom. Dodatno, minimalne fungicidne koncentracije su određivane reinokulisanjem po 10 µL sadržaja iz bunarčica odgovarajuće koncentracije u 100 µL sterilnog medijuma u mikrotitracionim pločama i inkubiranjem još 24 h na 37 °C. Koncentracija koja ubija 99,5% gljiva u odnosu na kontrolnu grupu smatrana je za MFK. Uzevši u obzir sličnu osetljivost sojeva na antifungalni tretman za sva dalja ispitivanja odabran je soj *C. albicans* 475/15.

3.4. Potencijal testiranih jedinjenja da ometaju faktore koji doprinose virulentnosti *Candida albicans*

Ispitivanje testiranih jedinjenja (15 jedinjenja predstavljenih u **Odeljku 3.1.** kao i 2 komercijalna antifungalna agensa) u koncentracijama nižim od fungicidnih rađeno je u cilju određivanja njihovog potencijala da remete formiranje biofilma *Candida albicans* i prelazak iz kvasolike u hifalnu fazu rastanja.

3.4.1. Inhibiranje formiranja biofilma *Candida albicans*

Uticaj različitih jedinjenja na proces formiranja biofilma *C. albicans* određen je mikrodilucionom tehnikom (Ramage i sar., 2002) sa modifikacijama. Prekonoćne kulture mikroorganizama su standardizovane denzitometrom na finalnu koncentraciju od 1×10^5 ćelija/polju mikrotitar ploče. Biofilm je formiran u mikrotitar pločama sa adhezivnim dnom (Sarsted, SAD) dodatkom 10 μ l ćelijske suspenzije ispitivanih mikroorganizama i 90 μ l prethodno određenih (**Odeljak 3.3.**) subinhibitornih koncentracija ispitivanih jedinjenja u YPD broth medijumu. Mikrotitar ploče su inkubirane na 37 °C, 24 h. Nakon inkubacije sadržaj ploče je odstranjen pipetiranjem, a svaki bunarčić tri puta ispran fiziološkim rastvorom. Adherirane ćelije su fiksirane sa po 100 μ L metanola (Carlo Erba, Španija) i potom sušene 30 min na vazduhu. Posle sušenja u svaki bunarčić je dodavano 100 μ l kristal violet boje (0,1%, rastvarana u destilovanoj vodi) (Bio-Merieux, Francuska). Bojenje je trajalo 30 minuta, nakon čega su ploče isprane vodom i osušene na vazduhu. Da bi se resuspendovala boja, u svaki bunarčić je dodato po 100 μ l 96% etanola (Zorka, Šabac) i sadržaj je homogenizovan. Absorbanca je čitana na automatizovanom Elisa čitaču na talasnoj dužini od 620 nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific).

Procenat inhibicije formiranja biofilma računat je po sledećoj formuli:

$$[(O_G \text{ kontrola} - O_G \text{ uzorak}) / O_G \text{ kontrola}] \times 100.$$

O_G -optička gustina

3.4.2. Ometanje prelaska *Candida albicans* iz kvasolike u hifalnu fazu

Potencijal testiranih jedinjenja (**Odeljak 3.1.**) da utiču na sprečavanje prelaska iz kvasolike u hifalnu fazu ispitan je kako mikroskopski, posmatranjem morfologije ćelija, tako i merenjem nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV).

3.4.2.1. Određivanje procenta ćelija koje rastu u hifalnom obliku

Ćelije *C. albicans* (10^6 ćelija/mL) su inkubirane sa prethodno određenim minimalnim inhibitornim koncentracijama svih testiranih jedinjenja na 37 °C, 4 h, u medijumu za

indukciju hifa (YPD + 10% Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, Germany). Po 50 μ L uzorka je sipano na hemocitometar, a potom je broj ćelija koje rastu u kvasolikoj formi kao i hifa i germinativnih tuba prebrojavan u 5 različitih polja (Nikon, Eclipse, TS2, Holandija), uveličanje 40X. Za svako jedinjenje, kao i kontrolu (samo *C. albicans* u medijumu za indukciju hifa), računat je procenat ćelija koje rastu u hifalnom obliku u odnosu na ukupan broj ćelija.

3.4.2.2. Nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćeliji i vanćelijskom prostoru nakon tretmana testiranim jedinjenjima

Merenje nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) u ćelijama *C. albicans* i u vanćelijskom prostoru rađeno je po modifikovanoj metodi prvobitno opisanoj od strane Paez i sar., (2010). *C. albicans* (10^6 ćelija/mL) je inkubirana 24 h na 37 °C sa jedinjenjima predstavljenim u **Odeljku 3.1.** u njihovim prethodno određenim minimalnim inhibitornim koncentracijama. Potom je 0,4 mL *C. albicans* inkubirano sa 0,5 mL nitro plavog tetrazolijuma (1 mg/mL, Sigma-Aldrich, Germany) na 37 °C, 30 min. Nakon što je dodato 0,1 mL 0,1 M hlorovodonične kiseline uzorci su centrifugirani 10 min na 1500 g (Heraeus biofuge stratos centrifuge, Thermo electron corporation, MA, SAD). Nivo RKV prisutnih u ekstraćelijskom prostoru određivan je merenjem absorbance supernatanta na 575 nm (Shimadzu UV1601, Japan). Procenat smanjenja RKV je izračunat poređenjem sa kontrolnim, netretiranim ćelijama. U cilju posmatranja promene nivoa RKV unutar ćelija u talog je dodavan dimetilsulfoksid (DMSO, 0,6 mL) i TSB medijum (0,8 mL). Merenjem absorbance na 575 nm određivan je nivo intraćelijskih RKV. Rezultat je takođe izražavan kao procenat inhibicije u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije.

3.5. Uticaj antifungalnog tretmana na ekspresiju gena povezanih sa rezistencijom *Candida albicans*

Nivoi genske ekspresije *CDR1* i *MDR1* gena u ćelijama *C. albicans* su određivani nakon uticaja svih 15 testiranih jedinjenja i dva komercijalna antifungalna leka na *C. albicans* u minimalnoj inhibitornoj koncentraciji. Za jedinjenja za koja je pokazano da utiču na

nivo ekspresije *CDR1* utvrđivan je i potencijal da remete ekspresiju gena *CDR2*. Pri određivanju nivoa ekspresije *CDR1* i *CDR2* flufenazin je korišćen kao pozitivna kontrola, dok je pri utvrđivanju nivoa ekspresije gena *MDR1* pozitivna kontrola bio benomil (Schneider i Morschhäuser, 2015).

3.5.1. Izolovanje RNK

C. albicans 475/15 (50 µL prekonocne kulture) je inkubirana u 5 mL YPD medijuma u inkubatoru sa šejkerom na 30 °C (ISF-1-V, Adolf Kuhner, Švajcarska) tokom 6-8 sati. Po dostizanju optimalne gustine ćelija ($O_G > 0,4$, spektrofotometar Pharmacia Biotech, SAD) dodavane su MIK odabranih jedinjenja i inkubacija je produžena još 30 min u istim uslovima. Uzorci su centrifugirani na 4600 rpm, 4 °C, 5 min (Rotanata 460 R, Hettich, Nemačka) nakon čega je supernatant bačen. Talog je rastvoren u RNK puferu i prebačen u tube sa vijalom. U uzorke je dodato 200 µL staklenih kuglica tretiranih DEPCom (Diethyl pirokarbonat, Sigma-Aldrich, Nemačka) i 300 µL Fenol-Hloroform-Izoamil alkohola (Sigma-Aldrich, Nemačka). Homogenizovani su na 4500 rpm, 10 s (Precellys Evolution tissue homogenizer, Bertion instruments, Francuska) i zatim centrifugirani (14000 rpm, 4 °C, 1 min (Universal 32 R, Hettich, Nemačka)). Supernatant (200 µL) je prebačen u nove tube (1,5 mL LoBind Protein Tube, Eppendorf), dodato je 250 µL Fenol-Hloroform-Izoamil alkohola i uzorci su vorteksovani 10 s. Nakon centrifugiranja (14000 rpm, 4 °C, 1 min) 200 µL supernatanta je prebačeno u nove tube. U svaki uzorak je dodato po 400 µL hladnog 100% etanola, inkubirani su na suvom ledu 10 min nakon čega su centrifugirani (14000 rpm, 4 °C, 2 min). U pelet je dodato 200 µL 70% hladnog etanola, izvršeno je centrifugiranje (1 min, 14000 rpm, 4 °C) i zatim je supernatant eliminisan. Talog je ostavljen da se osuši na sobnoj temperaturi tokom 10 min pa je rastvoren u 50 µL vode tretirane DEPCom. Koncentracije uzoraka i njihov kvalitet određivani su na Nanodropu (ND-1000, Witec AG, Švajcarska).

RNK pufer:

0,1 M Tris-HCl pH 7,5 (Tris(hidroksimetil)aminometan)

0,1 M LiCl (Litijum hlorid)

10 mM EDTA (Etilendiaminotetrasirćetna kiselina)

0,5 % SDS (Natrijum dodecilsulfat)

3.5.2. Uklanjanje DNK iz uzoraka i sinteza cDNK

RNK (10 µg) je razblažena u 50 µL vode tretirane DEPCom i inkubirana sa 5 µL DNAza pufera i 1 µL DNAze (2U/µL) (DNA-free™ DNA Removal Kit, Ambion) na 37 °C, 30 min. Nakon inkubacije u svaku tubu je dodato po 5 µL DNAza inaktivacionog reagensa i uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min uz povremeno mešanje. Supernatant je posle centrifugiranja (14000 rpm, 4 °C, 2 min) prebačen u nove tube, a koncentracija i kvalitet RNK su određivani na aparatu Nanodrop (ND-1000, Witec AG, Švajcarska).

Sinteza cDNK (komplementarna DNK, engl. complementary DNA) je vršena kitom Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche, Švajcarska). RNK (1 µg) je inkubirana sa 60 µM prajmerom nasumičnih heksamera (engl. Random Hexamer primers) u ukupnoj zapremini od 11,4 µL na 65 °C, 10 min. U svaki uzorak dodavano je 8,6 µL reakcione smeše (**Tabela 2**) čime je finalna zapremina svakog uzorka bila 20 µL. Inkubirani su na 50 °C, 30 min i potom na 85 °C, 5 min.

Tabela 2. Reakciona smeša komponenata za sintezu cDNK (kit Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis, Roche). *DTT – ditiotreitol.

Komponenta	Zapremina (µL)
Reakcioni pufer za transkriptazu 5X	4
Miks dezoksinukleotida	2
DTT*	1
Inhibitor RNaze	0,5
Transcriptor High Fidelity reverzna transkriptaza	1,1
Ukupno	8,6

3.5.3. Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja polimerazom

Po 10 μL uzorka (**Tabela 3**) je dodavano u svaki bunarčić qPCR ploče (MicroAmp Fast 96-Well Reaction plate (0,1 mL), Applied Biosystems, SAD).

Tabela 3. Komponente reakcione smeše za qPCR, *Master Mix – iTaq Universal Probes Supermix, Biorad, SAD.

Komponenta	Zapremina	Finalna koncentracija
cDNK (100x razblažena)	2 μL	
2 x Master Mix*	5 μL	1 X
Direktan prajmer (10 μM)	0,2 μL	200 nM
Reverzni prajmer (10 μM)	0,2 μL	200 nM
Proba	0,1 μL	100 nM
Voda	2,5 μL	
Ukupna zapremina	10 μL	

Sekvence prajmera i proba korišćenih u kvantitativnoj reakciji lančanog umnožavanja polimerazom (qPCR – quantitative polymerase chain reaction) date su u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Sekvence prajmera i proba korišćenih za qPCR (Lohberger i sar., 2014)

Prajmer	Sekvenca
CDR1-ORF-F	ATGACTCGAGATATTTTGATA
CDR1-ORF-R	TTAACAGCAATGGTCTTTA
MDR1-ORF-F	GAGAAATATTTAGCCGATTAC
MDR1-ORF-R	TGTTATTGGAAGATGATGAT
ERG11-ORF-F	ATTGTTGAAACTGTCATTG
ERG11-ORF-R	CCCCTAATAATATACTGATCTG
ACT-ORF-F	GCATCACACTTTTACAAT
ACT-ORF-R	AAACATAATTTGAGTCATCTTT
Proba	Sekvenca
CDR1-P2	CATTATGAGACCTGGTGAACCTACT
MDR1-P2	AACCAACTCTTGCTGATGATACAA
ERG11-P2	TTTGTCCCTTAGTGTTACACA
ACT1-P2	TTGCTCCAGAAGAACATCCAGT

Analiza nivoa genske ekspresije je rađena u StepOnePlus Real Time PCR sistemu (Thermo Fisher Scientific) u ciklusima opisanim u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Koraci, trajanje i broj ponovaka različitih segmenata qPCR-a

Faza	Korak	Temperatura	Trajanje	Broj ponavljanja
Početna faza	Korak 1	50 °C	2 min	1
	Korak 2	95 °C	10 min	
Faza ciklusa	Korak 1	95 °C	15 s	50
	Korak 2	60 °C	1 min	

Kalibrator je u svim eksperimentima bila kontrola, uzorak koji nije tretiran ni sa jednim jedinjenjem, i njegova RQ vrednost (relativna kvantifikacija, odnos promene ekspresije gena u testiranim uzorcima u poređenju sa kalibratorom, engl. relative quantification) je uvek 1. Svaki uzorak je analiziran u tri tehnička i dva biološka ponavljanja sa *ACT1* genom kao endogenom kontrolom. U analizama su korišćene Taqman probe, oligonukleotidne probe koje su na 5' kraju obeležene fluorescentnom bojom (tzv. reporter, u ovoj studiji FAM), a na 3' kraju imaju prigušivač (tzv. quencher, u ovom ispitivanju TAMRA).

3.6. Inhibicija procesa sinteze ergosterola kao potencijalni mehanizam antifungalnog delovanja

Ispitivan je uticaj svih 15 testiranih jedinjenja i 2 komercijalna antifungalna agensa na ekspresiju gena *ERG11* kao i njihova sposobnost da inhibiraju protein lanosterol 14 α -demetilazu (Erg11). Za jedinjenja koja inhibiraju ciljni protein *in silico* predikcijama je određena stabilnost kompleksa i delovi ligand-protein strukture koji učestvuju u interakciji.

3.6.1. Nivo ekspresije *ERG11* nakon antifungalnog tretmana

Za određivanje nivoa ekspresije *ERG11* izolacija RNK, tretman DNazom, sinteza cDNK i qPCR su urađeni kao što je opisano u **Odeljku 3.4.3**. Prajmeri korišćeni u qPCR reakciji prikazani su u **Tabeli 4**.

3.6.2. Inhibicija lanosterol 14 α -demetilaze kao mehanizam antifungalnog delovanja

Ispitivani protein CYP51 izolovan je na Hemijskom Institutu, Ljubljana, Slovenija od strane Zelenko i sar. (2014). Vezivanje proteina CYP51 humanog porekla i proteina poreklom iz *C. albicans* je ispitivano UV vidljivom spektroskopijom (UV 1800 Shimadzu TCC 240A, Japan). Protein (1 μ M) je inkubiran sa različitim koncentracijama svih testiranih jedinjenja (0, 2, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 300 μ M) u titracionom puferu (50 mM kalijum fosfat pH 7,5, 10% glicerol, 100 mM NaCl). Absorbanca je merena u rasponu od 350 do 500 nm. Spektroskopske promene koje su znak vezivanja detektovane su kao Tip 2 spektralnog odgovora karakterističan za vezivanje inhibitora za protein CYP51. Za jedinjenja koja su se vezala za ciljni protein pomoću podataka o promeni absorbance na oko 410 i 425 nm izračunavana je konstanta disocijacije. Za određivanja konstante disocijacije korišćena je Mihaelis-Mentenova jednačina:

$$\Delta A = \Delta A_{\max} \times \frac{[L]}{K_D + [L]}$$

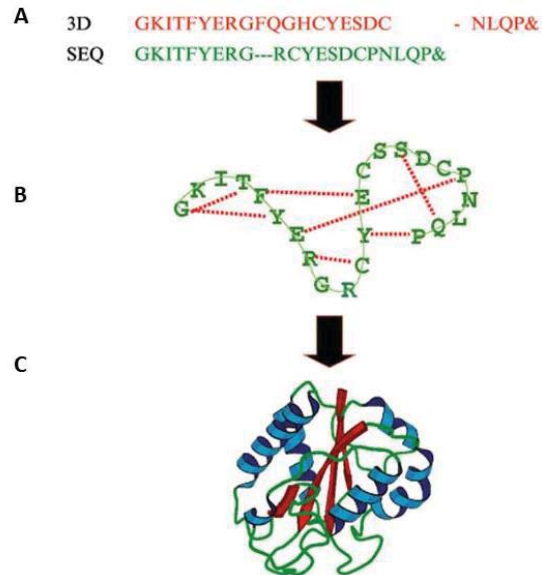
gde je ΔA promena absorbance između njenog absorpcionog maksimuma i minimuma kod diferencijalnog spektra, ΔA_{\max} je maksimalna promena absorbance, $[L]$ je koncentracija liganda korišćena u titraciji, a K_D konstanta disocijacije za kompleks ligand-enzim (Warrilow i sar., 2010).

Za jedinjenja koja su se vezala za protein poreklom iz *C. albicans* utvrđivano je da li se vezuju za protein humanog porekla, istom metodom.

3.6.3. *In silico* priprema proteina CYP51 i molekularni doking

Protein CYP51 *C. albicans* (Uniprot kod P10613) je podvrgnut homologom modelovanju pomoću programa MODELLER 9.17 (Webb i Sali, 2014), korišćenjem kristalne strukture proteina CYP51 poreklom iz *Saccharomyces cerevisiae* u kompleksu sa flukvinkonazolom (fluquinconazole) (PDB kod 5EAF) kao osnove. Prostorna organizacija krajnjeg modela je procenjena posmatranjem i metodom diskretne optimizovane energije (**D**iscrete **O**ptimized **E**nergy (DOPE)) (Shen i Sali, 2006). DOPE je statistička metoda koja procenjuje homologe modele prilikom predviđanja 3D

proteinske strukture. Deo je MODELLER programa i procenjuje energiju proteinskog modela koji nastaje nakon brojnih ponavljanja različitih varijanti, a kao krajnji produkt daje homologni model koji zadovoljava prostorna ograničenja (**Slika 28**).



Slika 28. Koraci MODELLER programa prilikom pravljenja homolognog modela. **A-** poređenje primarne sekvence proteina sa sekvencom njegovog homologa poznate 3D strukture, **B-** prostorna ograničenja koja obuhvataju razdaljine između atoma i dihedralne uglove se izdvajaju pomoću sekvence proteina koji služi kao osnova (template), **C-** model se optimizuju kako bi maksimalno zadovoljio prostorna ograničenja (Fiser i Šali., 2003).

Jedinjenje MK55, za koje je utvrđeno da se vezuje CYP51, je korišćeno u *in silico* eksperimentima, dok je MK56, jedinjenje koje se nije vezalo za CYP51, korišćeno kao negativna kontrola.

Jedinjenja su podvrgnuta fleksibilnom dokingu pomoću programa AutoDock Vina (Trott i Olson, 2010). Prilikom fleksibilnog dokinga programu je omogućeno da modifikuje parametre poput uglova veze, torzionih uglova i dužine veze (Lexa i Carlson, 2012).

Program The AutoDockTools je korišćen za pripremu PDBQT protein datoteke. Format PDBQT je sličan formatu PDB, ali sadrži i informaciju o delimičnom naelektrisanju i tipu atoma (da li određeni atom ostaje rigidan ili fleksibilan tokom dokinga).

Za CYP51 modelovan receptor naelektrisanje gvožđa je podešeno na +2. Tokom procesa dokinga receptor je bio krut dok je ligandu omogućeno da bude fleksibilan.

Simulacija dokinga je vršena korišćenjem kutije sa koordinatnom mrežom (engl. grid box) dimenzija 25x25x25 Å i prostorom pretrage od 20 načina vezivanja, dok je parametar pretrage bio podešen na 5. Kutija sa koordinatnom mrežom predstavlja celokupan prostor oko proteina od interesa u okviru koga se ispituju različiti načini vezivanja liganda, obično je oko 3 puta veća od samog liganda, a svakako njena minimalna veličina treba da nadmaši veličinu aktivnog mesta proteina. Kao minimalna dimenzija bilo koje veličine ove kutije uzima se 22,5 Å (Feinstein i Brylinski, 2015). Uglavnom se predikcija programom AutoDock sprovodi nekoliko puta kako bi se dobilo više konformacija ligand-protein. Konformacija sa najmanjom energijom se bira kao najbolja, odnosno najverovatnija doking struktura.

3.6.4. Simulacije molekularne dinamike (MD)

Simulacije molekularne dinamike su vršene korišćenjem GROMACS v5.1 softvera (Abraham i sar., 2015). Na osnovu strukturnog modela urađena je minimizacija topologije receptora kako bi se uklonile sterne smetnje među aminokiselinama. Sterne smetnje se javljaju kod homogenih modela, kao i kod struktura niske rezolucije, a karakterišu ih preklapanja među atomima različitih bočnih lanaca koja fizički nisu moguća (Ramachandran i sar., 2011).

Receptor je unešen u prethodno ekvilibrisanu koordinativnu kutiju sa vodom i 0,15 M Na i Cl jonima. Za simulacije molekularne dinamike korišćeno je najnovije AMBER99SB-ILDN polje sile (Lindorff-Larsen i sar., 2010) zajedno sa TIP3P modelom vode. TIP3P model vode (Transferable Intermolecular Potential 3P) je model koji ima tri interagujuća mesta koja potiču od tri atoma koja čine molekul vode. Modeli sa tri interagujuća mesta se zbog svoje preciznosti i efikasnosti najčešće koriste u simulacijama molekularna dinamike (Mark i Nilsson, 2001).

Parametri polja sile za ligande su određeni korišćenjem generalnog Amber polja sile (general Amber force field (GAFF)) i HF/6-31G* RESP atomskih naelektrisanja (Bayly i sar., 1993). Parametri za hem kompatibilni sa AMBERom su preuzeti od Shahrokh i sar., 2012. Svaki sistem se sastojao od proteina, liganda, ~1500 molekula vode, ~160

jona u 10x10x10 nm simuliranoj kutiji. Energija model sistema je minimalizovana i podvrgnuta 10 ns MD ekvilibraciji sa pozicionim ograničenjima proteinskih koordinata. Ova ograničenja su olakšana i 20 ns MD putanje su napravljene sa stalnom temperaturom od 300K korišćenjem odvojenih termostata za protein, peptid i molekule rastvarača. Korišćeni su takozvani “velocity-rescaling” termostati koji u svakom koraku podešavaju temperaturu u zavisnosti od brzine partikula sistema. Vremenski period je podešen na 2 fs i sve veze su ograničene korišćenjem LINCS algoritma (**LI**Near **C**onstraint **S**olver, takozvani “constraint” algoritam koji se koristi kako bi simulacija zadovoljila drugi Njutnov zakon). Lennard-Jones interakcije (matematički modeli koji predviđaju intermolekulske interakcije dva atoma) su izračunate korišćenjem vrednosti 10 Å a elektrostatičke interakcije su tretirane pomoću PME (**p**article-**m**esh **E**wald, algoritam koji se koristi u izračunavanju elektrostatskih sila).

3.7. Integritet ćelijske membrane nakon tretmana jedinjenjima

Uticaj odabranih jedinjenja na integritet ćelijske membrane *C. albicans* 475/15 određen je prema metodi opisanoj od strane Tang i sar., (2008) sa nekim modifikacijama. Jedinjenja ispitana u ovom eksperimentu su odabrana na osnovu izražene aktivnosti u prethodnim esejima (uticaj na redukciju različitih faktora virulencije *C. albicans* i ekspresiju gena povezanih sa antifungalnom rezistencijom).

Prekonoćna kultura *C. albicans* isprana je i resuspendovana u 10 mM PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4), do koncentracije od 10^8 ćelija/mL. Inkubirana je sa odabranim jedinjenjima u 1½ MIK tokom vremenskog interval od 0, 15, 30, 45, 60 i 90 min. Kao kontrola korišćena je *C. albicans* inkubirana u 10 mM PBS (pH 7,4). Uzorci su filtrirani kroz 0,22 µm filtere kako bi se otklonile ćelije kvasca. Absorbanca filtrata određivana je na spektrofotometru Agilent/HP 8453 UV-Visible Spectrophotometer Agilent Technologies, SAD, na sobnoj temperaturi. Povećanje absorbance na 260 nm (nukleinske kiseline) i 280 nm (proteini) je signal da je membrana oštećena i da ćelijski sadržaj izlazi van. Kao blank su korišćena jedinjenja u 1½ MIK rastvorena u 10 mM PBS (pH 7,4).

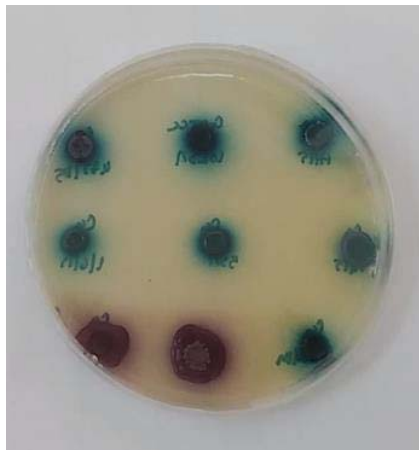
3.8. Citotoksičnost odabranih jedinjenja

Ćelijska kultura je pripremljena od ćelija jetre svinje i dizajnirana je kao PLP2 (primarne ćelije jetre svinje, **Porcine Liver Primary cells**) (Guimarães i sar., 2013). Tkivo jetre je isprano u Hankovom balansiranom slanom rastvoru (Sigma Aldrich, Germany) koji je sadržao 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina i podeljeno je na 1×1 mm³ eksplante. Neki od eksplanata su prebačeni u 25 cm² flask sa DMEM medijumom (**Dulbecco's Modified Eagle Medium**, ThermoFisher Scientific) obogaćenim 10% fetalnim goveđim serumom (Sigma-Aldrich, Germany), 2 mM neesencijalnim aminokiselinama, 100 U/mL penicilinom, 100 mg/mL streptomicinom i inkubirani su na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Medijum je menjan svaka 2 dana. Kultivacija ćelija je nastavljena uz direktno posmatranje svaka 2 do 3 dana korišćenjem faznog kontrastnog mikroskopa. Ćelije su subkultivisane i zasejane u ploče sa 96 polja u gustini od 1,0×10⁴ ćelija/polju i kultivisane u DMEM medijumu sa 10% fetalnim goveđim serumom, 100 U/mL penicilinom i 100 µg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich, Germany). Korišćen je Sulforodamin B esej. Rezultati su predstavljeni korišćenjem GI₅₀ vrednosti (koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ćelija). Elipticin je korišćen kao pozitivna kontrola.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Prikupljanje i identifikacija *Candida albicans*

Tokom 2014 i 2015 godine na Klinici za otorinolaringologiju, Kliničko bolničkog centra Zvezdara, prikupljeno je 38 briseva od kojih je kod 12 potvrđeno prisustvo *C. albicans*. Pored *C. albicans* bio je prisutan i jedan soj *C. krusei* i jedan soj *C. glabrata* (Slika 29). Svi sojevi su deponovani u Mikoteci mikološke laboratorije, Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, u glicerolskim štokovima na -80 °C. Procenat vrsta roda *Candida* koje su izolovane u ovoj studiji u odnosu na ukupan broj sakupljenih uzoraka (oko 30%) nešto je niži nego u prethodnim istraživanjima gde je iznosio oko 50%, dok je *C. albicans* prisutna kao najčešća vrsta u svim ispitivanjima (Balan i sar., 2015; Sato i sar., 2017).



Slika 29. Rast vrsta roda *Candida* na hromogenoj podlozi koja omogućuje njihovu identifikaciju, *C. albicans* – zeleno, *C. krusei* – ljubičasto. Specifičnost identifikacije iznosi 99% (Odds i Bernaerts, 1994).

Istraživanjem sprovedenim 2016 godine utvrđeno je da u Srbiji 518 ljudi godišnje oboli od kandidemije, 135303 pati od rekurentnog vaginitisa izazvanog ovom gljivom a čak 208489 osoba pati od oralne kandidijaze (Arsenijević i Denning, 2018). S obzirom da je upravo *C. albicans* i najčešći uzročnik kandidijaza (Mayer i sar., 2013) odabrana je kao soj za dalja istraživanja. Ova vrsta prisutna je u usnoj duplji kod 30-45% zdravih, odraslih osoba, ali kod drugih grupa, poput HIV pacijenata, prisutna je kod čak 95%

populacije (Patil i sar., 2015). Studija sprovedena na Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu u periodu 2007-2008 utvrdila je povezanost prisustva vrsta roda *Candida*, a naročito *C. albicans* sa oralnim planocelularnim karcinomom (Čanković i Bokor-Bratić, 2010), što ukazuje na veliki značaj njene eliminacije u cilju poboljšanja zdravstvenog stanja ljudi.

4.2. Osetljivost različitih sojeva *Candida albicans* na komercijalne antifungalne lekove

Mikrodilucionom metodom određena je osetljivost različitih sojeva *C. albicans* na komercijalne antifungalne lekove, ketokonazol i amfotericin B. Ova dva antifungalna agensa odabrana su kao predstavnici različitih grupa lekova, azola i poliena. Ispitivani antifungalni lekovi su bili efikasni, a među izolovanim sojevima nije bilo rezistentnih na antifungalni tretman (**Tabela 6**). *C. albicans* je pokazala veću osetljivost na tretman amfotericinom B (MIK 0,63 µg/mL, MFK 1,25 µg/mL), na koji su svi sojevi identično reagovali. Osetljivost na amfotericin B je u skladu sa rezultatima dobijenim u studiji Brito i sar., (2011), gde je većina izolata *C. albicans* imala vrednost MIK oko 0,5 µg/mL. U poređenju sa amfotericinom B, ketokonazol je imao nešto više MIK i MFK vrednosti (MIK 1,6 – 3,1 µg/mL, MFK 6,2 – 50 µg/mL). MIK ketokonazola su znatno više nego kod sojeva testiranih od strane Brito i sar. (2011) (0,06 µg/mL), ali su rezultati u skladu sa prosečnim vrednostima dobijenim u studijama Badiee i Alborzi (2011) (MIK 0,002 - 16,00 µg/mL) i Ozcelik i sar., (2006) (MIK 0,03 - 4 µg/mL). Pri tretmanu ketokonazolom postojale su razlike u osetljivosti nekih sojeva (*C. albicans* 13/15 i *C. albicans* 10/15 imali su više minimalne fungicidne koncentracije). S obzirom na gotovo uniformnu osetljivost sojeva, za dalja ispitivanja antimikrobne aktivnosti odabrani su *C. albicans* 475/15, *C. albicans* 527/14, *C. albicans* 10/15 i *C. albicans* 13/15.

Tabela 6. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne fungicidne koncentracije (MFK) komercijalnih antifungalnih lekova.

Soj <i>C. albicans</i>	Ketokonazol		Amfotericin B	
	MIK	MFK	MIK	MFK
<i>C. albicans</i> 1/6/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 11/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 16/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 17/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 21/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 27/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 503/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 532/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 527/14	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 10/15	3,1±0,1	50±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 13/15	1,6±0,2	50±0,2	0,63±0,001	1,25±0,002
<i>C. albicans</i> 475/15	3,1±0,1	6,2±0,1	0,63±0,001	1,25±0,002

Koncentracije su izražene u $\mu\text{g/mL}$, i predstavljene kao prosečne vrednosti tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

4.3. Osetljivost *Candida albicans* na tretman odabranim flavonoidima, terpenima i nitratnim estrima heterocikličnih jedinjenja

Antimikrobna aktivnost svih jedinjenja određena je mikrodilucionom metodom. Najnižu minimalnu inhibitornu koncentraciju ispoljili su nitratni estri heterocikličnih jedinjenja, a potom flavonoidi. Najslabija aktivnost u ovom eseju zabeležena je za terpene (**Tabela 7**). Ipak, nijedno od testiranih jedinjenja nije imalo nižu MIK od komercijalnih antifungalnih lekova (**Tabela 6**), ketokonazola i amfotericina B (MIK 0,63 - 3,1 $\mu\text{g/mL}$).

4.3.1. Antimikrobna aktivnost nitratnih estara heterocikličnih jedinjenja

Od nitratnih estara heterocikličnih jedinjenja najbolju aktivnost su pokazali MK94 i MK56 (MIK 25 - 28 $\mu\text{g/mL}$), a nešto slabiju MK129 i MK55 (MIK 56 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela**

7). Prethodno ispitivana različita heterociklična jedinjenja su prema više testiranih sojeva *C. albicans* imala MIK od 8 do 64 µg/mL (Kumar i Narasimhan, 2018) dok je u studiji Attia i sar., (2013) najefikasniji derivat heterocikličnih imidazolnih estara imao višestruko nižu vrednost MIK 0,0833 µmol/mL. Od heterocikličnih jedinjenja ispitanih u ovoj doktorskoj disertaciji MK94 je imao najnižu molarnu inhibitornu koncentraciju (80,149 µM) te kao takav ima aktivnost sličnu prethodno objavljenom jedinjenju autora Attia i sar., (2013).

4.3.2. Antimikrobna aktivnost flavonoida

Među flavonoidima najniže MIK ispoljili su luteolin, kvercitrin, izokvercitrin i rutin (MIK 37,5 µg/mL) (**Tabela 7**). Ovi rezultati ukazuju da se visok potencijal za razvoj novih antifungalnih agenasa nalazi među glikozidima kvercetina (kvercitrin, izokvercitrin i rutin).

U buduća istraživanja se mogu uključiti i drugi glikozidi kvercetina kako bi se utvrdilo da li i na koji način razlike u šećernoj komponenti dodatoj kvercetinu doprinose antimikrobnoj aktivnosti. S obzirom da su glikozidi kvercetina široko zastupljeni u voću i povrću ovi rezultati ukazuju još jednom na neophodnost raznovrsne ishrane zarad celokupne blagodeti organizma.

Nešto više MIK vrednosti u grupi flavonoida zabeležene su za apigetrin (MIK 50 µg/mL), viteksin, kvercetin i astragalin (75 µg/mL), dok je najslabiju aktivnost ispoljio apigenin (MIK 100 µg/mL). Generalno, pokazalo se da glikozidi flavonoida imaju izraženiju antimikrobnu aktivnost u poređenju sa njihovim aglikonima, što je moguće objasniti povećanom rastvorljivošću glikozida u poređenju sa aglikonima.

4.3.2.1. Luteolin

Luteolin ispitivan u ovoj studiji ispoljio je MIK od 37,5 µg/mL (**Tabela 7**). Prethodne studije od strane Zajdel i sar., (2012), Salazar-Aranda i sar., (2015) i Mail i sar., (2017) pokazale su da luteolin ima ne tako perspektivnu antimikrobnu aktivnost (MIK od 3,1 mg/mL odnosno MIK > 83 µg/mL i > 1 mg/mL). Mogući razlog ovog neslaganja je odabir testiranih sojeva, te da su sojevi izolovani tokom izrade ove doktorske disertacije

osetljiviji na dejstvo luteolina od referentnih sojeva (Zajdel i sar., 2012; Mail i sar., 2017) ili kliničkih izolata iz krvi, cerebrospinalne tečnosti i sa noktiju (Salazar-Aranda i sar., 2015). Za razliku od navedenih istraživanja, Besbes i sar., (2016) su pokazali da luteolin ima MIK od 86 μM (= 24,6 $\mu\text{g/mL}$), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Neophodna su dalja ispitivanja luteolina različitim metodologijama, kao i na što većem broju izolata *C. albicans* kako bi se što preciznije utvrdio potencijal luteolina da remete njen rast.

4.3.2.2. Kvercitrin

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti kvercitrina ukazuju na odličnu aktivnost ovog flavonoida (MIK 37,5 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 7**). Studije drugih autora (Gehrke i sar., 2013; Sekita i sar., 2017) su utvrdile višu MIK od čak 100 $\mu\text{g/mL}$, odnosno MIK > 512 $\mu\text{g/mL}$. Bolja aktivnost kvercitrina testiranog u ovoj studiji može biti posledica razlike u sojevima, kao i u dužini inkubacije mikrotitar ploča sa jedinjenjima. Najosetljiviji su bili sojevi iz usne duplje pacijenata, potom referentni soj *C. albicans* (ATCC 10231) (Gehrke i sar., 2013), dok je najotpornija na tretman kvercitrinom bila *C. albicans* CAD1, soj za koji tačno poreklo nije naznačeno (Sekita i sar., 2017). Duža inkubacija takođe može biti razlog smanjene efikasnost kvercitrina jer su ćelije *C. albicans* u studijama Gehrke i sar., 2013 i Sekita i sar., 2017 izlagane dejstvu kvercitrina tokom 48 h, dok je u ispitivanjima tokom izrade ove doktorske disertacije inkubacija trajala 24 h.

4.3.2.3. Izokvercitrin

Izokvercitrin je bio efikasan u smanjivanju broja ćelija *C. albicans* kada je primenjen u koncentraciji od 80 μM (= 37,1 $\mu\text{g/mL}$) (Jun i sar., 2016), što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije gde je izmeren MIK od 37,5 $\mu\text{g/mL}$. Druga studija je pokazala da ima MIK od 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (Jun i sar., 2015), što je značajno manje od rezultata predstavljenih u **Tabeli 7**, moguće usled korišćenja izokvercitrina različitog porekla (izolovan iz biljke *Aster yomena* kod autora Jun i sar., 2015, odnosno komercijalno kupljen koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji). Dve studije odlikuje i različita

metodologija jer je studija Jun i sar., (2015) koristila MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid) esej a čitanje rezultata vršeno je pomoću ELISA čitača, dok je u ovoj doktorskoj disertaciji vizuelizacija rezultata vršena mikroskopski subkultivacijom uzoraka. Sojevi izolovani iz usne duplje pacijenata su bili osetljiviji na dejstvo izokvercitrina od referentnog soja *Candida albicans* ATCC 90028 (Jun i sar., 2015).

4.3.2.4. Rutin

Rutin se pokazao kao efikasan u suzbijanju rasta sojeva *C. albicans* iz usne duplje pacijenata (MIK 37,5 µg/mL) (**Tabela 7**). Slična aktivnost (MIK 40 µg/mL) je ustanovljena i prema *C. albicans* ATCC 10231 (Šiler i sar., 2014). Nešto slabiju aktivnost rutin je ispoljio u studiji Han i sar., (2009) gde je čak 1000 µg/mL rutina korišćeno za zaustavljanje rasta *C. albicans*. Pored studija koje su pokazivale visok ili osrednji antifungalni potencijal rutina, bilo je i onih koje su tvrdile da rutin nema inhibitornu aktivnost na rast *C. albicans* (Johann i sar., 2011; Araruna i sar., 2012).

Različiti su razlozi koji su mogli usloviti toliko slabiju aktivnost rutina u studijama Araruna i sar., (2012) i Johann i sar., (2011). U odnosu na studiju Šiler i sar., (2014) i ovu doktorsku disertaciju gde je kao hranljivi medijum za rast ćelija korišćen MA brot odnosno TSB, studije Johann i sar., (2011) i Araruna i sar., (2012) su koristile BHI i RPMI 1640. Takođe, postoji i mogućnost da su sojevi korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji i *C. albicans* 10231 (Šiler i sar., 2014) osetljiviji na dejstvo rutina od *C. albicans* ATCC 18804 (Johann i sar., 2011) i *C. albicans* ATCC 40227 (Araruna i sar., 2012). Još jedan razlog neslaganja u podacima o antifungalnoj aktivnosti rutina može biti i poreklo supstance; rutin firmi Extrasynthese i SigmaAldrich (korišćen u doktorskoj disertaciji i kod Šiler i sar., 2014) je pokazao bolju aktivnost od onog poreklom iz biljnog ekstrakta (Johann i sar., 2011) i od rutina firme Merck (Araruna i sar., 2012).

4.3.2.5. Apigetrin

Rezultati dobijeni za apigetrin ukazuju na njegovu dobru antifungalnu aktivnost (MIK 50 µg/mL). Ne postoje podaci drugih autora dobijeni sličnom metodologijom (metoda mikrodilucije). Prethodno je ovaj flavonoid istraživan jedino od strane Mamadalieva i sar., (2011) gde je doveo do zone inhibicije od 5 mm kada je primenjen u 1 mM koncentraciji (= 432 µg/mL). Viša koncentracija apigetrina neophodna za zaustavljanje rasta *C. albicans* može biti posledica različite metodologije (difuziona metoda), kao i duže inkubacije (48 h) u studiji Mamadalieva i sar., (2011).

4.3.2.6. Viteksin

Za viteksin je utvrđena vrednost MIK od 75 µg/mL (**Tabela 7**), a prethodno je ispitivan jedino od strane Teodoro i sar., (2015), gde nije pokazao antimikrobnu aktivnost prema *C. albicans*. Nedostatak antimikrobne aktivnosti viteksina u studiji Teodoro i sar., (2015) je mogao biti posledica različitih faktora. Studija Teodoro i sar., (2015) je koristila RPMI i viteksin firme Santa Cruz Biotechnologies, u poređenju sa medijumom TSB i viteksinom Extrasynthese korišćenim u ovoj doktorskoj disertaciji.

4.3.2.7. Kvercetin

U ovoj studiji kvercetin je pokazao antimikrobnu aktivnost sa MIK od 75 µg/mL (**Tabela 7**), a o njegovoj aktivnosti svedoči i obilje raznovrsnih podataka drugih autora. Prema studiji Ozcelik i sar., (2006) kvercetin ima odličnu aktivnost i MIK od 8 µg/mL, dok je nešto slabija aktivnost zabeležena u studijama Gehrke i sar., (2013) (MIK 100 µg/mL), Salazar-Aranda i sar., (2015) (MIK > 83 µg/mL) i Gao i sar., (2016) (MIK 128-512 µg/mL). Postoji velika razlika u rezultatima dobijenim prethodnim istraživanjima, među kojima se studija Ozcelik i sar., (2006) posebno ističe izrazito niskom vrednošću MIK, čiji uzrok može biti različiti proizvođač jedinjenja (Serva).

4.3.2.8. Astragalin

Astragalin je u poređenju sa ostalim flavonoidima imao prosečnu aktivnost (MIK 75 µg/mL) (Tabela 7). Ranijim ispitivanjima pokazano je da su sojevi *C. albicans* ATCC 14053 (Fattouch i sar., 2007) i *C. albicans* ATCC 10231 (Süzgeç-Selçuk i Birteksöz, 2011) neosetljivi na njegovo delovanje u koncentracijama nižim od 5000 µg/mL. Istraživanje Scognamiglio i sar., (2016) je utvrdilo da astragalin (128 µg/mL) sprečava rast *C. albicans* ATCC 10231 za više od 20 %.

Pored razlike u sojevima koji su korišćeni, uzrok različite inhibitorne aktivnosti astragalina može biti i hranljivi medijum u kom je rađena mikrodiluciona metoda. Tako je najbolja aktivnost zabeležena u TSB medijumu, nešto slabija u BHI brotu (Scognamiglio i sar., 2016), dok su studije kojima je utvrđeno da astragalin nema aktivnost koristile RPMI-1640 sa MOPSom (Süzgeç-Selçuk i Birteksöz 2011) i Potato count broth (Fattouch i sar., 2007). Još jedan razlog neslaganja navedenih istraživanja može biti u poreklu astragalina; sintetskom (Extrasynthese u ovoj doktorskoj disertaciji, SigmaAldrich kod Fattouch i sar., 2007) odnosno dobijenom direktno iz biljnog ekstrakta (Süzgeç-Selçuk i Birteksöz 2011; Scognamiglio i sar., 2016). Sve navedene razlike dobijene od strane različitih istraživača mogle su doprineti neslaganjima u utvrđenim MIK vrednostima astragalina prema *C. albicans*.

4.3.2.9. Apigenin

Od svih flavonoida najslabiju aktivnost u sprečavanju rasta *C. albicans* ispoljio je apigenin (MIK 100 µg/mL). Za razliku od ove studije, postoje istraživanja gde je apigenin pokazao odličnu antimikrobnu aktivnost indikovanu sa MIK od 8 µg/mL (Ozcelik i sar., 2011) i MIK 5 µg/mL (Lee i sar., 2018a). Studija Cheah i sar., (2014) je utvrdila sličnu aktivnost, odnosno MIK od 125 µg/mL. Nepostojanje inhibitornog efekta apigenina na rast *C. albicans* utvrđeno je u brojnim istraživanjima (Yordanov i sar., 2008; Mamadaliyeva i sar., 2011; Shahzad i sar., 2014; Martins i sar., 2016).

Oprečni rezultati koji se tiču antifungalnog potencijala apigenina su dobijeni različitim studijama, a mogu biti posledica različite metodologije koja je korišćena. Tako su najniže vrednosti dobijene mikrodilucionom metodom koja je pored ove studije

korišćena i u drugim istraživanjima (Ozcelik i sar., 2011; Cheah i sar., 2014 i Lee i sar., 2018a). Istraživanja kojima je utvrđeno da apigenin nema antifungalnu aktivnost koristila su disk difuzionu metodu i merenje zone inhibicije (Yordanov i sar., 2008, Mamadalieva i sar., 2011; Martins i sar., 2016). U studiji Shahzad i sar., (2014) korišćena je mikrodiluciona metoda, ali se razlog nepostignutog antimikrobnog efekta može naći u niskoj koncentraciji koja je testirana (maksimalna koncentracija apigenina korišćena u eksperimentu je bila 0,125 mg/mL).

4.3.3. Antimikrobna aktivnost terpena, kamfora i eukaliptola

Terpen **kamfor** je ispoljio dobru antimikrobnu aktivnost (MIK 125 µg/mL), ali ipak nešto slabiju od prethodno ispitanih jedinjenja, dok je aktivnost eukaliptola bila znatno slabija (MIK 23000 µg/mL).

Prethodna istraživanja kamfora kao antifungalnog agensa pokazala su da ulje kamfora ispoljava MIK aktivnost kada je primenjeno u koncentraciji od 0,5 % a MFK 1 % (Devkate i sar., 2005), kao i da može biti efikasan u koncentraciji od 0,5 % (w/v) (= 5000 µg/mL) (Manoharan i sar., 2017). Postoji i studija koja tvrdi da kamfor nema antimikrobnu aktivnost (Zuzarte i sar., 2011). Većina prethodnih studija kamfora je u svoja istraživanja uključivala kako kliničke izolate tako i referentne ATCC sojeve (Devkate i sar., 2005; Zuzarte i sar., 2011), tako da razlike u efikasnosti u suzbijanju rasta *C. albicans* utvrđene od strane različitih autora najverovatnije predstavljaju posledicu korišćenja različitih hranljivih medijuma i supstance različitog porekla. Ova studija je utvrdila najnižu vrednost MIK korišćenjem TSB medijuma i kamfora poreklom od firme SigmaAldrich. Kamfor istog porekla (SigmaAldrich) je korišćen i u studiji Manoharan i sar., 2017, te je lošija aktivnost kamfora utvrđena u toj studiji verovatno posledica korišćenja drugačije kao hranljive podloge (tečni medijum od krompira i dekstroze). U studiji (Zuzarte i sar., 2011) koja je utvrdila najslabiju antimikrobnu aktivnost ćelije gljive su inkubirane sa kamforom (Extrasynthese) u RPMI 1640 medijumu.

Eukaliptol je imao najviše MIK vrednosti od svih ispitanih jedinjenja (23 mg/mL). Ranijim eksperimentima od strane Hendry i sar., (2009) došlo se do nešto niže MIK a više MFK (MIK 8 mg/mL i MFK od 64 mg/mL) nego u ovoj studiji (**Tabela 7**).

Pregledom trenutno dostupne literature najslabija aktivnost eukaliptola ($MIC \geq 8\%$ (v/v)) je utvrđena od strane Dalleau i sar., (2008), dok je eukaliptol bio najefikasniji prilikom ispitivanja Raut i sar., (2013) sa vrednostima MIK od 4 mg/mL.

Za razliku od prethodno pomenutih jedinjenja, poreklo eukaliptola je u svim dosadašnjim studijama bilo isto (SigmaAldrich)., Uzrok neslaganja trenutno dostupnih podataka može se međutim potražiti u dužini inkubacije, medijumu koji je korišćen kao i u različitim sojevima *C. albicans* čija osetljivost je ispitivana. Eukaliptol je u ovom istraživanju kao i u onom sprovedenom od strane Hendry i sar., (2009) pokazao sličnu aktivnost, a u obe studije ploče su inkubirane tokom 24 h, za razliku od Raut i sar., (2013) i Dalleau i sar., (2008) čije vreme inkubacije je bilo 48 h. Postojale su i razlike u testiranim sojevima: u okviru ove doktorske disertacije ispitivani su izolati iz usne duplje, u studijama Hendry i sar., (2009) i Raut i sar., (2013) korišćeni su samo standardni referentni sojevi dok su Dalleau i sar., (2008) koristili i jedne i druge.

Tabela 7. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne fungicidne koncentracije (MFK) ispitivanih jedinjenja. Koncentracije su izražene u µg/mL i predstavljene kao prosečne vrednosti tri ponavljanja ± standardna devijacija.

	<i>C. albicans</i> 475/15		<i>C. albicans</i> 527/14		<i>C. albicans</i> 10/15		<i>C. albicans</i> 13/15	
	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK	MIK	MFK
Apigenin	100±10	150±20	100±10	200±20	100±10	200±20	100±10	150±10
Apigetrin	50±2	50±2	50±4	100±6	50±2	100±10	50±1	100±10
Viteksin	75±2	150±10	75±2	150±10	75±3	150±10	75±2	150±10
Luteolin	37,5±1	75±2	37,5±1	75±20	37,5±1	75±2	37,5±1	75±0,2
Kvercetin	75±2	150±10	75±2	150±10	75±3	150±20	75±10	150±20
Kvercitrin	37,5±2	75±3	37,5±2	75±3	37,5±2	75±3	37,5±1	75±3
Izokvercitrin	37,5±1	75±2	37,5±1	75±2	37,5±2	75±2	37,5±2	75±2
Rutin	37,5±1	75±1	37,5±1	75±1	37,5±1	75±2	37,5±1	75±2
Astragalin	75±20	150±20	75±1	150±20	75±2	150±20	75±1	150±2
Kamfor	125±10	250±20	125±10	250±20	125±20	250±20	125±20	250±20
Eukaliptol	23000±100	46000±00	23000±00	46000±200	23000±100	46000±200	23000±100	4600±0±200
MK55	56±1	112±2	28±1	56±2	56±1	112±10	28±1	56±1
MK56	28±1	56±1	28±1	56±1	56±1	112±10	28±1	56±2
MK94	28±2	56±1	28±2	56±2	28±1	56±2	28±2	56±2
MK129	56±1	122±2	28±1	56±1	56±2	112±10	28±1	56±2

4.4. Uticaj testiranih jedinjenja na formiranje biofilma *Candida albicans*

Biofilm predstavlja zajednicu ćelija mikroorganizama kojom se postiže lakše preživljavanje u sredini kao i otpornost na antimikrobni tretman. Sprečavanjem njegovog nastanka bilo bi omogućeno da se na razvoj infekcije deluje još u začetku, kada niže koncentracije antifungalnih agenasa mogu sprečiti razvoj ove invazivne i rezistentne grupacije fungalnih ćelija. Potencijal različitih jedinjenja da utiču na sprečavanje nastanka biofilma je do sada bio ispitivan. Potraga za efikasnim antibiofilm agensima vršena je kako među jedinjenjima prirodnog porekla (Liu i sar., 2017) tako i među sintetskim jedinjenjima (Feldman i sar., 2014; Morici i sar., 2016). Međutim, postoji dosta jedinjenja koja imaju potvrđenu antimikrobnu aktivnost i niske MIK vrednosti, ali njihov potencijal da remete biofilm *C. albicans* do sada nije ispitivan

(Smiljković i sar., 2018). Fungicidna koncentracija antimikrobnog agensa ubija ćelije i time automatski sprečava i nastanak biofilma. Stoga su za ispitivanja antibiofilm aktivnosti odabrane koncentracije jedinjenja koje dovode samo do inhibicije rasta (MIK) kao i koncentracije ispod njih (0,5 MIK, 0,25 MIK i 0,125 MIK) kako bi se utvrdilo da li jedinjenja u koncentracijama koje su dosta niže od inhibitornih (i do 8 puta) mogu remetiti patogenost ove gljive.

Sva testirana jedinjenja, osim amfotericina B, primenjena u minimalnim inhibitornim koncentracijama i koncentracijama nižim od MIK, pokazala su sposobnost da spreče formiranje biofilma *C. albicans* (**Grafik 1**). Najniža testirana koncentracija (0,125 MIK) je ujedno pokazala i najslabiju aktivnost. Kao koncentracija sa najviše potencijala za remećenje nastanka biofilma može se izdvojiti 0,5 MIK, jer iako je niža kod većine jedinjenja ima sličan efekat na sprečavanje formiranja biofilma kao i MIK. Poređenjem različitih grupa jedinjenja može se primetiti da najbolju aktivnost pokazuju nitratni estri heterocikličnih jedinjenja i ketokonazol, ali ni flavonoidi poput apigetrina i izokvercitrina ne zaostaju. Terpeni, kamfor i eukaliptol, su takođe pokazali obećavajući potencijal u sprečavanju formiranja biofilma (60 i 77% inhibicije sa 0,5 MIK). Amfotericin B je bio potpuno neaktivan u ovom eseju, dok je od ostalih sintetskih jedinjenja najbolju aktivnost pokazao nitratni ester MK56, a potom ketokonazol > MK55 > MK129 > MK94.

4.4.1. Antibiofilm aktivnost flavonoida

Aktivnosti flavonoida koji su primenjeni u 0,5 MIK vrednosti mogu se prikazati sledećim nizom: najbolju aktivnost je pokazao apigetrin, a potom slede izokvercitrin > apigenin > kvercetin = astragalin > viteksin > rutin > luteolin > kvercitrin. Primećena je i značajnija antibiofilm aktivnost flavonoidnih glikozida u poređenju sa aglikonima.

Jedinjenje **apigetrin** je pokazalo najbolju antibiofilm aktivnost od svih testiranih jedinjenja, što je ujedno i prvi podatak o ovom glukozidu apigenina kao potencijalnom antibiofilm agensu. Usled nedovoljne istraženosti antibiofilm aktivnosti apigetrina buduća istraživanja se mogu detaljnije pozabaviti ovom tematikom i uticajem apigetrina

kako na biofilm različitih sojeva *C. albicans* tako i na biofilmove drugih patogenih mikoorganizama.

Izokvercitrin je pokazao odličnu aktivnost na sprečavanje formiranja biofilma *C. albicans* (**Grafik 1**). Postoje i raniji podaci o njegovom potencijalu da remeti biofilm *C. albicans*, ali i biofilmove različitih bakterija, *Staphylococcus aureus* i *Fusobacterium nucleatum* (Sekita i sar., 2017). Izokvercitrin je u navedenoj studiji bio aktivniji u sprečavanju formiranja biofilma u poređenju sa ostalim ispitanim flavonoidima (rutin, kvercitrin i hiperin). Koncentracija koja je bila aktivna (200 µg/mL, Sekita i sar., 2017) znatno je veća od koncentracije ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji (< 37,5 µg/mL).

Apigenin primenjen u koncentraciji od ½ MIK sprečava formiranje biofilma *C. albicans* za čak 59% (**Grafik 1**). Za razliku od ove studije gde je apigenin ispoljavao antibiofilm aktivnost kada je primenjivan u koncentracijama 12,5 - 125 µg/mL, Shahzad i sar., (2014) su utvrdili da apigenin u koncentraciji od 125 µg/mL nema efekta na biofilm *C. albicans*. Sa druge strane, izuzetno niska koncentracija apigenina (5 µg/mL) je prema istraživanju Lee i sar., (2018a) dovoljna da redukuje biofilm *C. albicans*.

Velike razlike koje postoje među rezultatima navedenih ispitivanja antibiofilm potencijala apigenina mogu biti posledica kako različitih metoda tako i različitog materijala koji je korišćen u eskperimentima. Postoji mogućnost da mikrotitar ploče različitih proizvođača nisu standardizovanog kvaliteta, te da mogu uticati na krajnji rezultat analize, a isti je slučaj i sa poreklom jedinjenja. U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su mikrotitar ploče firme Sarstedt i apigenin proizvođača Extrasynthese. Studija Shahzad i sar., (2014) je neaktivnost apigenina (SigmaAldrich) utvrdila na pločama proizvedenim od strane Corning Incorporated, dok je najveći antibiofilm potencijal zabeležen za apigenin izolovan iz biljke i na pločama firme Falcon, Becton-Dickinson Labware (Lee i sar., 2018a).

Razlika u odabiru testiranih sojeva *C. albicans* može samo donekle biti razlog neslaganju podataka. Studija Shahzad i sar., (2018) utvrdila je neosetljivost fungalnog biofilma kako kliničkih tako i referentnih sojeva, dok je osetljivost biofilma na tretman apigeninom u ovoj disertaciji utvrđena jedino na izolatu iz usne duplje, a u studiji Lee i sar., (2018a) jedino na referentnom soju *C. albicans* ATCC 90028. Bitna razlika među ovim studijama je i tip eseja koji je korišćen, a varira od eseja sa kristal violetom koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji do XTT (Shahzad i sar., 2014) i MTT (Lee i sar.,

2018a) eseja. Sve tri metode su prihvaćene u naučnoj zajednici kao pouzdane za determinaciju biofilma vrsta roda *Candida* (Simitsopoulou i sar., 2016) i dok se kristal violet koristi za određivanje ukupne mase biofilma (boji i ćelije i vanćelijski matriks), XTT i MTT boje jedino metabolički aktivne ćelije u biofilmu (Kuhn i sar., 2003; Welch i sar., 2012).

Kvercetin je ispitan u koncentracijama ≤ 75 $\mu\text{g/mL}$ gde se pokazao kao dobar antibiofilm agens jer je sprečio formiranje biofilma za više od 50% (**Grafik 1**). Uticaj kvercetina na sprečavanje nastanka biofilma je ispitan i od strane Singh i sar., (2015) ali pomoću znatno veće koncentracije supstance (200 $\mu\text{g/ml}$) koja je u potpunosti sprečila nastanak ove patogene grupacije fungalnih ćelija. Mogući razlog neslaganja je to što je u studiji Singh i sar., (2015) koncentracija od 200 $\mu\text{g/mL}$ bila i jedina koncentracija koja je testirana, te postoji mogućnost da bi i koncentracije niže od nje sprečile formiranje biofilma, bar u nekoj meri. Takođe, u ovoj doktorskoj disertaciji jedinjenja su inkubirana sa ćelijama *C. albicans* 24 h nakon čega je posmatran njihov antibiofilm efekat, dok je kod Singh i sar., (2015) inkubacija trajala 48 h pa je zato bilo potrebno delovati u višoj koncentraciji.

Različite studije su ispitivale i uticaj kvercetina na već formiran biofilm, pa je tako prema Alves i sar., (2014) kvercetin dodat 24 h starom biofilmu efikasan u koncentraciji od 625 $\mu\text{g/mL}$, dok koncentracija od 156 $\mu\text{g/mL}$, koja je nešto približnija onoj testiranoj u ovoj studiji, nije dovela do značajnijih promena. Slabiji uticaj kvercetina na već formiran biofilm detektovan je i određivanjem MIK pri delovanju na sesilne ćelije (SMIK, ≥ 50 % redukcije biofilma). Tako je studija Shahzad i sar., (2014) utvrdila SMIK > 200 $\mu\text{g/mL}$, dok je u istraživanju od strane Gao i sar., (2016) ova koncentracija bila ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. Biofilm kada je jednom formiran postaje znatno otporniji na bilo kakav antifungalni tretman (Lewis, 2001), te su ovakvi rezultati očekivani.

Kvercetin je mogao sprečiti formiranje biofilma i kada je bio primenjen u obliku inkapsuliranih citokompatibilnih vlakana (Vashisth i sar., 2013), što predstavlja još jednu mogućnost za razvijanje novih antimikrobnih tretmana.

Sposobnost kvercetina da redukuje biofilm potvrđena je od strane Gao i sar. (2016) određivanjem nivoa ekspresije gena povezanih sa formiranjem biofilma. Nakon tretmana *C. albicans* kvercetinom došlo je do smanjenje ekspresije *ALS1*, *ALS3* (Familija gena sa sekvencom sličnom aglutininu, engl. Agglutinin Like Sequence gene

family), *HWPI* (gen koji kodira za protein zida hifa, engl. **Hyphal Wall Protein**) i *SUN41* (gen koji kodira za glikozidazu ćelijskog zida).

Astragalin sprečava formiranje biofilma *C. albicans* za više od 50% kada se primenjuje u koncentracijama od 75 i 37,5 µg/mL (**Grafik 1**). Ranije je njegov uticaj na biofilm *C. albicans* ispitivan jedino od strane Scognamiglio i sar., (2016), gde nije ispoljio značajniju antibiofilm aktivnost. Doveo je do manje od 10% inhibicije biofilma kada je primenjen u koncentraciji od 128 µg/ml, što je znatno više od koncentracije koja je dovela do inhibicije u ovoj studiji. Jedan od razloga za neslaganja u dobijenim rezultatima može biti različita metodologija dva istraživanja. U studiji Scognamiglio i sar., (2016) astragalin je dodavan biofilmu koji je bio star 24 h i time otporniji na antifungalni tretman, dok je u ovoj doktorskoj disertaciji delovano astragalinom pre nego što je biofilm formiran.

Viteksin je pokazao ne tako izraženu sposobnost da remeti nastanak biofilma *C. albicans*; dovelo je do inhibicije formiranja biofilma za manje od 50% i to kada je primenjen u najvećoj testiranoj koncentraciji od 75 µg/mL (**Grafik 1**). Do sada nije ispitivan kao inhibitor biofilma *C. albicans*, što ove rezultate čini osnovom za dalja ispitivanja njegovih uticaja na smanjenje virulencije gljiva. Jedini podaci dostupni u literaturi tiču se njegovog uticaja na bakterijske biofilme. Viteksin u subMIK koncentraciji (110 µg/mL) sprečava formiranje biofilma *P. aeruginosa* za više od 50% (Das i sar., 2016). U ovoj doktorskoj disertaciji niža koncentracija viteksina je dovela do manjeg smanjenja mase biofilma, što je u skladu sa rezultatima druge studije i njegovom uticaju na bakterijske biofilme i ukazuje na moguću doznu zavisnost antibiofilm efekta viteksina.

Pored rezultata ove studije gde je **rutin** pokazao sposobnost da spreči nastanak biofilma za najviše 45% (**Grafik 1**) postoji još jedino studija Sekita i sar., (2017) kojom je utvrđeno da rutin nema efekta na biofilm *C. albicans*. Sekita i sar., (2017) su utvrdili da rutin remeti jedino bakterijski biofilm meticilin-rezistentnog soja *Staphylococcus aureus* (MRSA). Ne postoje značajnije razlike u metodologiji ove doktorske disertacije i Sekita i sar., (2017) kada je utvrđivanje antibiofilm aktivnosti u pitanju. Postoji jedino razlika u korišćenim sojevima pa je moguće je da je biofilm soja *C. albicans* 475/15 osetljiviji na dejstvo rutina od biofilma *C. albicans* CAD1, kliničkog izolata za koji u studiji Sekita i sar., (2017) nije naznačeno kog je konkretno porekla.

Luteolin je ispoljio antibiofilm aktivnost kada je primenjivan u koncentracijama 9,38-37,5 $\mu\text{g/mL}$ (**Grafik 1**), dok prilikom istraživanja Alves i sar., (2014) čak ni u znatno višim koncentracijama (625-5000 $\mu\text{g/mL}$) nije bio aktivan. Razlika može biti posledica metodologije koja je korišćena, jer su Alves i sar., (2014) luteolin dodavali biofilmu koji je već bio formiran, dok je u ovoj disertaciji ispitivana jedino prevencija njegovog formiranja. Postoji razlika i u sojevima *C. albicans* korišćenim u istraživanjima, tako je biofilm izolata iz usne duplje čoveka bio osetljiv na tretman luteolinom za razliku od biofilma *C. albicans* ATCC 90028 (Alves i sar., 2014).

Pored ove doktorske disertacije gde je **kvercitrin** ispoljio nešto slabiji antibiofilm potencijal u odnosu na ostale flavonoide (**Grafik 1**) jedino je još studija Sekita i sar., (2017) ispitivala njegov efekat. U studiji Sekita i sar., (2017) kvercitrin je pokazao odličnu sposobnost redukcije biofilma MRSA soja, ali je njegov uticaj na biofilm *C. albicans* bio potpuno drugačiji, štaviše tretman kvercitrinom je vodio ka boljoj sposobnosti gljive da formira biofilm. S obzirom na slabu aktivnost kvercitrina na redukciju fungalnog biofilma potvrđenu obema studijama moguće je da buduća istraživanja ovog flavonoida treba preusmeriti na bakterijske biofilme, u čijem suzbijanju je bio efikasniji.

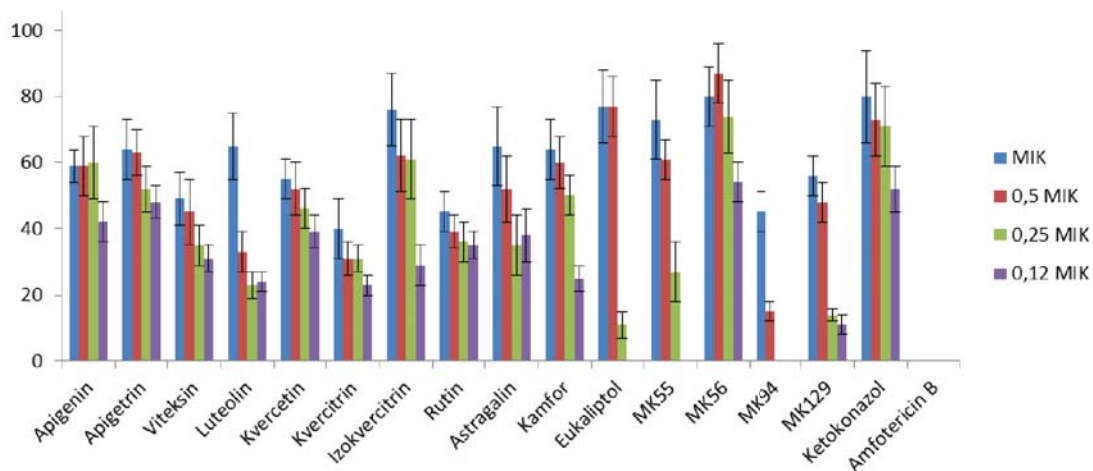
4.4.2. Antibiofilm aktivnost terpena

Terpeni, kamfor i eukaliptol, su ispoljili dobru antibiofilm aktivnost. Kamfor je testiran u znatno manjoj koncentraciji (125 $\mu\text{g/mL}$) u poređenju sa eukaliptolom (23000 $\mu\text{g/mL}$) pa je time njegov efekat značajniji. Za kamfor je ranijim istraživanjima utvrđeno da može značajno redukovati formiranje biofilma *C. albicans* DAY185 kada je primenjen u obliku 0,005 ili 0,01 % (w/v) rastvora (Manoharan i sar., 2017). Koncentracija kamfora korišćena u prethodnoj studiji (50 $\mu\text{g/mL}$ i 100 $\mu\text{g/mL}$) je slična onoj ispitanoj u ovoj doktorskoj disertaciji (31,25-125 $\mu\text{g/mL}$) te se kamfor može smatrati efikasnim antibiofilm agensom prema različitim sojevima *C. albicans*. Mehanizam kojim kamfor deluje na biofilm *C. albicans* uključuje smanjenje ekspresije gena bitnih za adheziju *C. albicans*, *HWPI*, *RBT1* (gen koji se reprimira transkripcionim represorom Tup1, **Repressed By Tup1**) i *EEDI* (gen neophodan za preživljavanje u epitelu domaćina, **Epithelial Escape and Dissemination 1**) (Manoharan i sar., 2017).

Eukaliptol je ispoljio visoku MIK (23 mg/mL) pa se njegova visoka efikasnost u suzbijanju nastanka biofilma (**Grafik 1**) može pripisati visokoj koncentraciji koja je primenjena. Eukaliptol je pokazao antibiofilm aktivnost prema *C. albicans* i kada je bio primenjen u koncentraciji $\geq 0,25$ % (v/v) (2,3 mg/mL) (Dalleau i sar., 2008). Druga studija potvrdila je njegovu efikasnost u smanjenju virulencije *C. albicans* jer inhibira formiranje biofilma u koncentracijama koje su niže od minimalnih inhibitornih za planktonske ćelije (MIK za ćelije u biofilmu bio je 4 mg/mL u poređenju sa 8 mg/mL za planktonske ćelije) (Hendry i sar., 2009). Studija Raut i sar., (2013) je takođe tvrdila da je eukaliptol (4 mg/mL) efikasan kao antibiofilm agens. Za uništenje već formiranog, zrelog biofilma eukaliptol je bio neefikasan u testiranoj koncentraciji (4 mg/mL), što je u skladu sa već pomenutom povećanom otpornošću formiranih biofilmova na antifungalni tretman. Navedenim studijama je utvrđena različita efikasnost eukaliptola i to u opsegu koncentracija od 2,3 mg/mL do 23 mg/mL. Prilikom istraživanja antibiofilm efekta korišćena je različita metodologija što umnogome otežava poređenje rezultata. Pored kristal violeta koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji, Hendry i sar., (2009) su antibiofilm uticaj procenjivali grebanjem formiranog biofilma sa dna ploče i posmatranje rasta mikroorganizama u odnosu na kontrolu, dok je XTT metabolički esej korišćen u radu Dalleau i sar., (2008) i Raut i sar., (2013).

4.4.3. Antibiofilm aktivnost nitratnih estara heterocikličnih jedinjenja

Nitratni estri heterocikličnih jedinjenja pokazali su izuzetan potencijal u suzbijanju razvoja biofilma *C. albicans* (**Tabela 7**). Uzevši u obzir da do sada nisu postojali literaturni podaci o aktivnosti 4 odabrana nitratna estra dobijeni rezultati predstavljaju početnu tačku ka daljim ispitivanjima antimikrobnih potencijala ove grupe jedinjenja. U trenutno dostupnoj literaturi postoje jedino podaci o heterocikličnim jedinjenjima različitih struktura, derivata tiazolidinediona i sukcinimida, kao inhibitora biofilma *C. albicans* (Kagan i sar., 2014) gde su ona testirana u koncentracijama 3,125 - 100 $\mu\text{g/mL}$, a neka od njih su pokazala i odličnu antibiofilm aktivnost.



Grafik 1. Procenat sprečavanja formiranja biofilma nakon tretmana minimalnim inhibitorym i sub-inhibitorym koncentracijama jedinjenja. Prosečna vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

4.5. Sposobnost jedinjenja da remete prelazak iz kvasolikog u hifalni oblik

Prelazak iz kvasolike u hifalnu formu još jedan je od faktora koji doprinosi virulentnosti *C. albicans*, pa pronalazak jedinjenja koja bi sprečila ovu morfološku tranziciju predstavlja izazov za aktuelnu nauku. Različita jedinjenja prirodnog (Chevalier i sar., 2012; Sun i sar., 2015), odnosno sintetskog porekla (Bar-Yosef i sar., 2017) do sada su bila ispitana kao potencijalni inhibitori morfološke tranzicije *C. albicans*, ali potraga za što efikasnijim agensima je i dalje u toku.

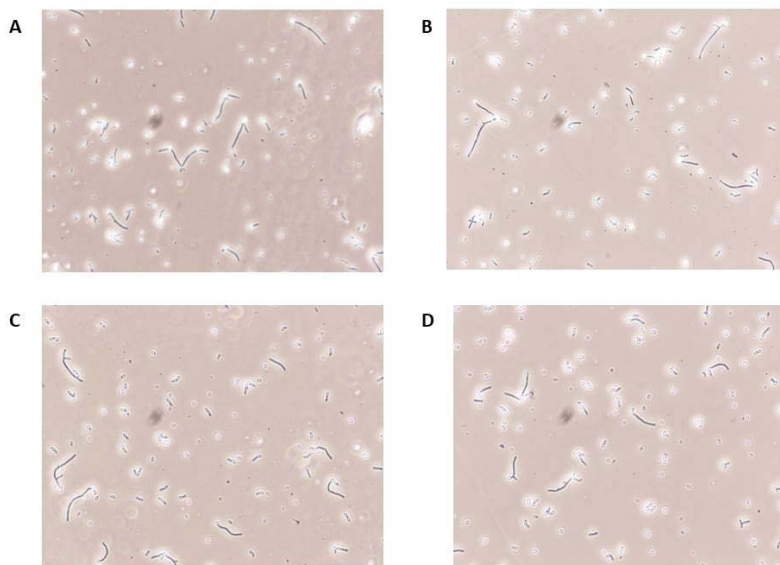
4.5.1. Uticaj jedinjenja na procenat ćelija *Candida albicans* u hifalnom obliku

Testiran je uticaj svih odabranih jedinjenja na prelazak ćelija *C. albicans* u hifalnu formu. U grupi kontrolnih, netretiranih, ćelija procenat onih koje su formirale hife iznosio je 33%, dok je u svim tretiranim grupama procenat ćelija koje rastu u hifalnom obliku bio manji (**Grafik 2**). U poređenju sa drugim grupama jedinjenja flavonoidi su imali značajniji efekat na sprečavanje morfološke tranzicije. Uticaj različitih jedinjenja

je bio slabiji na inhibiciju prelaska iz kvasolike u hifalnu formu u poređenju sa njihovom aktivnošću na sprečavanje formiranje biofilma.

4.5.1.1. Uticaj flavonoida na prelazak *Candida albicans* u hifalni oblik

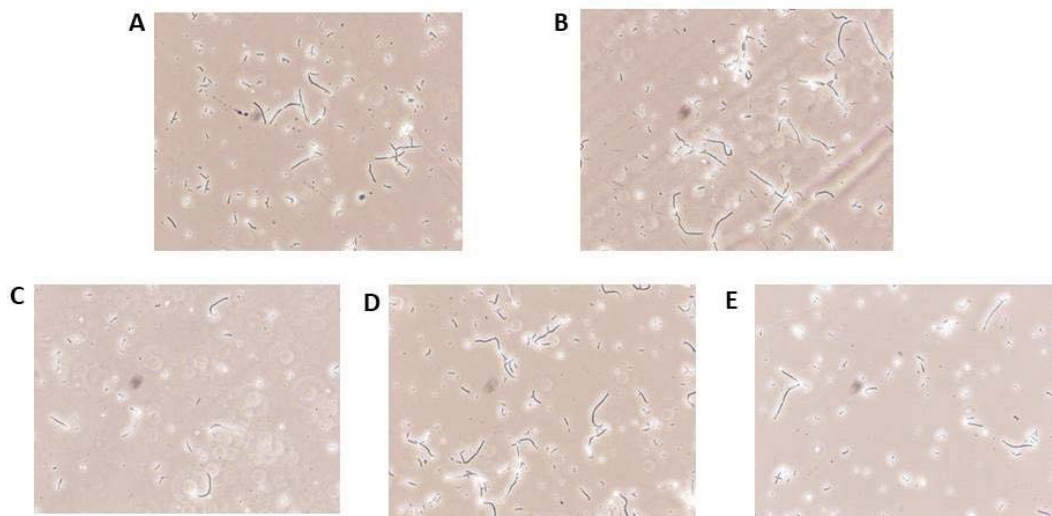
Najbolju aktivnost u sprečavanju formiranja hifalnih ćelija je pokazao apigetrin, a potom i ostali flavonoidi apigenin = izokvercitrin > astragalin > kvercetin > luteolin > rutin > viteksin > kvercitrin. U ovom eseju se glikozidi flavonoida nisu značajnije izdvajali po aktivnosti od odgovarajućih aglikona. **Apigetrin** i njegov aglikon, **apigenin**, ispoljili su značajan efekat na redukciju formiranja hifa (> 57% redukcije) (Slika 30).



Slika 30. Ćelije *C. albicans* nakon tretmana flavonima: **A**- apigeninom, **B**- apigetrinom, **C**- luteolinom, **D**- viteksinom. Slikano na mikroskopu Nikon Eclipse TS2, 40 X uvećanje.

Ova dva jedinjenja su imala i sposobnost da spreče nastanak biofilma za više od 50%, ukazujući na njihov širok potencijal za dalja ispitivanja kao potencijalnih inhibitora

virulentnosti *C. albicans*. **Izokvercitrin** i **astragalin**, flavonoidni glikozidi, takođe su imali efekta na sprečavanje nastanka hifalnih ćelija (**Slika 31**).



Slika 31. Ćelije *C. albicans* nakon tretmana flavonolima. **A-** kvercetin, **B-** kvercitrin, **C-** izokvercitrin, **D-** rutin, **E-** astragalin. Slikano na mikroskopu Nikon Eclipse TS2, 40 X uvećanje.

Prethodno je zabeležena niska vrednost MIK izokvercitrina ($37,5 \mu\text{g/mL}$) što ukazuje da je ovaj efekat ostvaren u najnižoj koncentraciji u odnosu na ostale flavonoide. Četiri flavonoida (apigetrin, apigenin, izokvercitrin, astragalin) koja su ispoljila najbolji efekat u sprečavanju prelaska iz kvasolike u hifalnu formu nisu u sličnim esejima ispitivana ranije, te postoji potreba za daljim i detaljnijim ispitivanjima potencijala ovih flavonoida u redukovanju virulentnosti patogenih mikroorganizama.

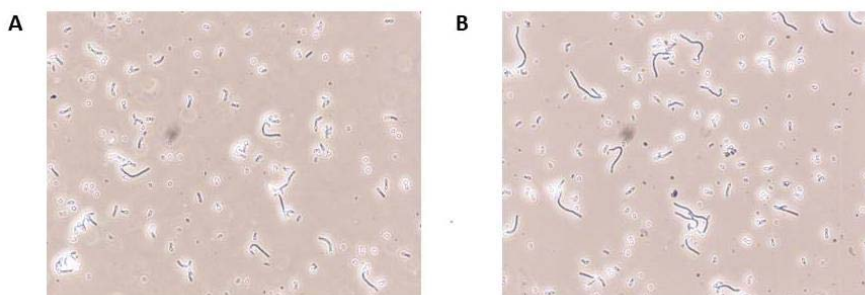
Kvercetin dovodi do redukcije nastanka hifalnih ćelija *C. albicans* za oko 21% kada je primenjen u koncentraciji od $75 \mu\text{g/mL}$ (**Grafik 2**). Prema Singh i sar., (2015) koncentracija od čak $200 \mu\text{g/mL}$ kvercetina sprečava morfološku tranziciju *C. albicans*, dok prema drugom istraživanju kvercetin u koncentraciji od $64 \mu\text{g/mL}$ efikasno redukuje prelazak iz kvasolike u hifalnu formu (Gao i sar., 2016). Postoji i podatak da tretman kvercetinom vodi povećanoj ekspresiji *PDE2*, gena koji je povezan sa rastom u hifalnom obliku, ali s druge strane vodi i smanjenju ekspresije drugih gena takođe povezanih sa hifalnim rastom, *UME6* i *ECE1* (Gao i sar., 2016). U poređenju sa drugim

studijama, a naročito Singh i sar., (2015), u ovoj doktorskoj disertaciji kvercetin je testiran u znatno manjoj koncentraciji pa je to mogući uzrok njegove manje aktivnosti.

Luteolin, rutin, viteksin i kvercitrin nisu ranije ispitivani kao potencijalni inhibitori prelaska iz kvasolike u hifalnu formu, a uzevši u obzir nisku aktivnost koju su pokazali u ovom testu (**Grafik 2**) njihova dalja ispitivanja možda treba preusmeriti ka nekoj drugoj potencijalnoj primeni.

4.5.1.2. Uticaj terpena na morfološku tranziciju

Nešto slabiju aktivnost od flavonoida na sprečavanje prelaska u hifalni oblik ispoljili su kamfor i eukaliptol (**Slika 32**).



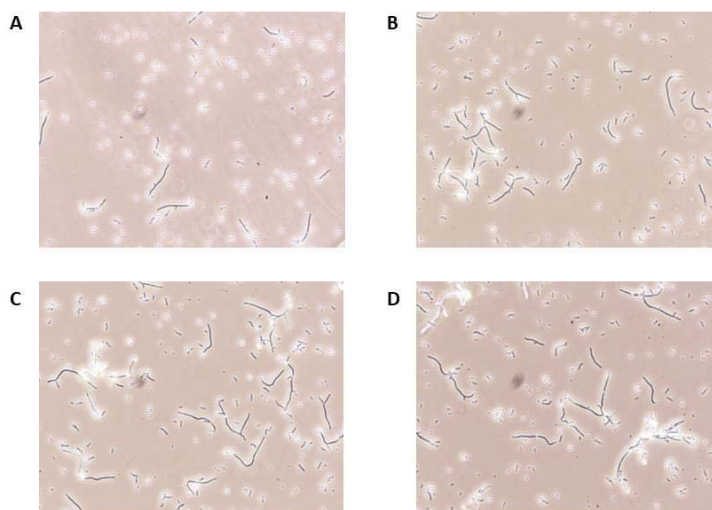
Slika 32. Čelije *C. albicans* nakon tretmana terpenima. **A-** kamfor, **B-** eukaliptol. Slikano na mikroskopu Nikon Eclipse TS2, 40 X uvećanje.

Kamfor (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) je doveo do 39% smanjenja broja hifalnih ćelija u odnosu na kontrolu, dok je slična koncentracija kamfora (0,01%, odnosno 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dovela do potpunog zaustavljanja nastanka hifalnih ćelija u istraživanju Manoharan i sar., (2017). U ove dve studije korišćena je različita metodologija - posmatranje na skenirajućem elektronskom mikroskopu nakon 24 časovne inkubacije (Manoharan i sar., 2017) i brojanje hifalnih ćelija nakon 4 časovne inkubacije (doktorska disertacija). Postoji mogućnost da je kamforu potrebno više vremena kako bi ispoljio svoj puni potencijal i da je upravo to razlog njegove veće efikasnosti izložene kod Manoharan i sar., (2017). Tretman kamforom vodi smanjenju ekspresije *ECE1* (gen uključen u hifalni rast ćelije, Extent of cell elongation) čak 14 puta (Manoharan i sar., 2017), te je to delimičan mehanizam njegovog antihifalnog efekta.

Eukaliptol primenjen u visokoj koncentraciji (23 mg/mL) sprečava rast *C. albicans*, a ista koncentracija je testirana i za utvrđivanje njegovog uticaja na morfološki prelazak ove gljive gde je za trećinu smanjila broj ćelija koje rastu u hifalnom obliku (**Grafik 2**) (**Slika 32**). Eukaliptol je ranije testiran ali u znatno nižoj koncentraciji (1 mg/mL) i u kraćem periodu (2 h) kada je doveo do redukcije nastanka hifa za preko 50% (Raut i sar., 2013). U studiji Raut i sar., (2013) koncentracija eukaliptola koja je smanjivala procenat ćelija koje rastu u hifalnom obliku bila je 4 puta manja od njegove minimalne inhibitorne, ukazujući na visok potencijal jedinjenja prirodnog porekla u ometanju patogenosti mikroorganizama.

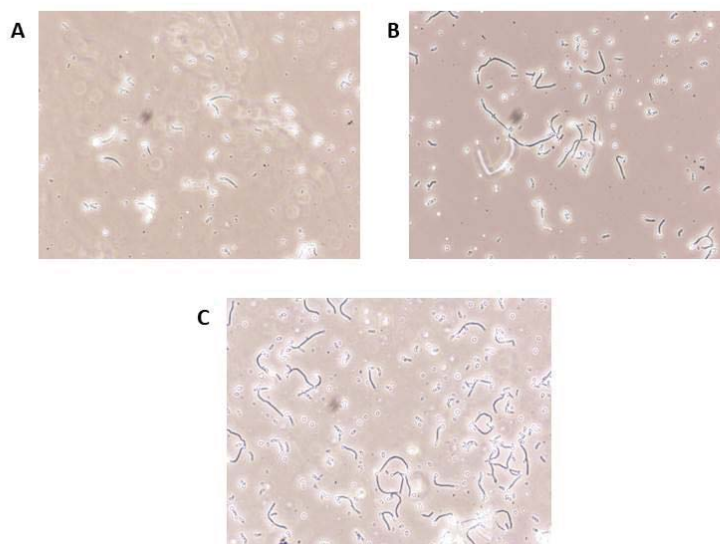
4.5.1.3. Uticaj jedinjenja sintetskog porekla na morfološku tranziciju

Najslabija aktivnost u sprečavanju nastanka hifalnih ćelija *C. albicans* zabeležena je za jedinjenja sintetskog porekla (**Slika 33**) (**Grafik 2**). Među sintetskim jedinjenjima kao najjači inhibitor prelaska u hifalnu formu istakao se MK55, a potom MK94 > MK56 > MK129 > ketokonazol > amfotericin B. **Nitratni estri heterocikličnih jedinjenja** testirani u ovoj doktorskoj disertaciji nisu ranije ispitivani kao inhibitori morfološke tranzicije *C. albicans*. Uprkos njihovoj visokoj antimikrobnoj aktivnosti (**Tabela 7**), **komercijalni antifungalni lekovi** imali su samo blagi efekat na sprečavanje formiranja hifalnih ćelija (**Slika 34**). **Ketokonazol** (3,1 µg/mL) nije doveo do značajnijeg smanjenja broja hifa, dok po podacima Ha i White, (1999) ketokonazol u manjoj koncentraciji (2 µg/mL) dovodi do smanjenja hifalnog rasta od 6-93%, u zavisnosti od soja *C. albicans*. Moguće je da je morfološka tranzicija soja *C. albicans* 475/15 manje osetljiva na tretman ketokonazolom od sojeva testiranih od strane Ha i White, (1999).

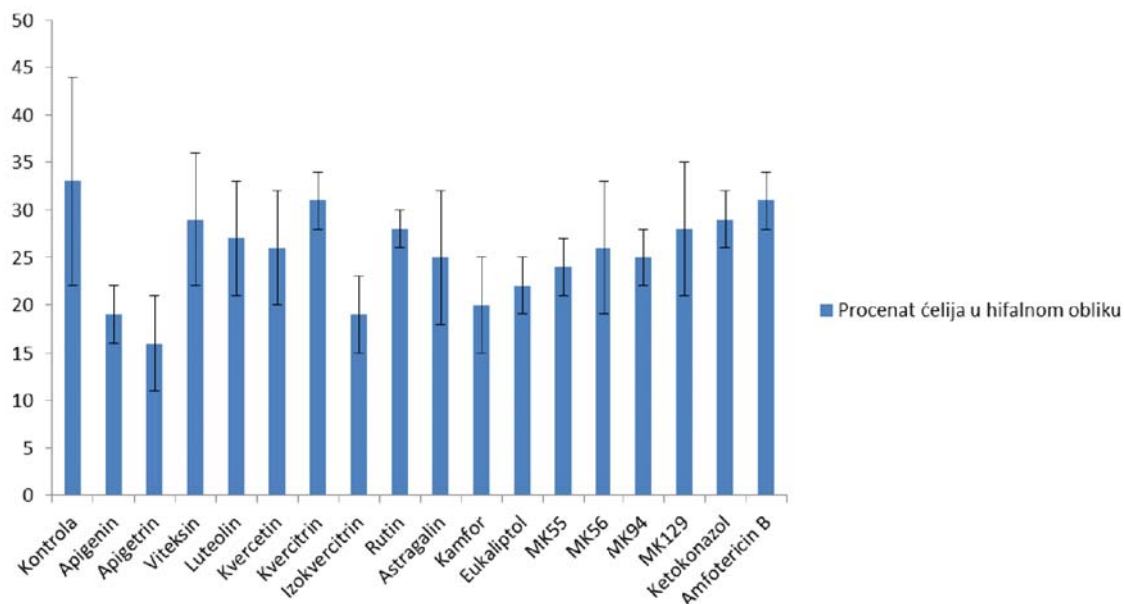


Slika 33. Čelije *C. albicans* nakon tretmana jedinjenjima sintetskog porekla. **A-** MK55, **B-** MK56, **C-** MK94, **D-** MK129. Slikano na mikroskopu Nikon Eclipse TS2, 40 X uvećanje.

Studija Laprade i sar., (2016) utvrdila je da su hifalne ćelije *C. albicans* rezistentnije na tretman **amfotericinom B** ($5 \mu\text{g/mL}$ i $8 \mu\text{g/mL}$) od ćelija koje rastu u kvasolikoj formi, sugerišući neosetljivost hifalne forme na ovaj vid antifungalnog tretmana, što je potvrđeno i ovom studijom (**Grafik 2**).



Slika 34. Čelije *C. albicans* **A-** nakon tretmana ketokonazolom, **B-** nakon tretmana amfotericinom B, **C-** kontrolne, netretirane čelije. Slikano na mikroskopu Nikon Eclipse TS2, 40 X uvećanje.



Grafik 2. Sposobnost jedinjenja da spreče prelazak iz kvasolike u hifalnu formu rasta *C. albicans*, izražen kao procenat ćelija u hifalnoj formi u odnosu na ukupan broj ćelija, prosečna vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

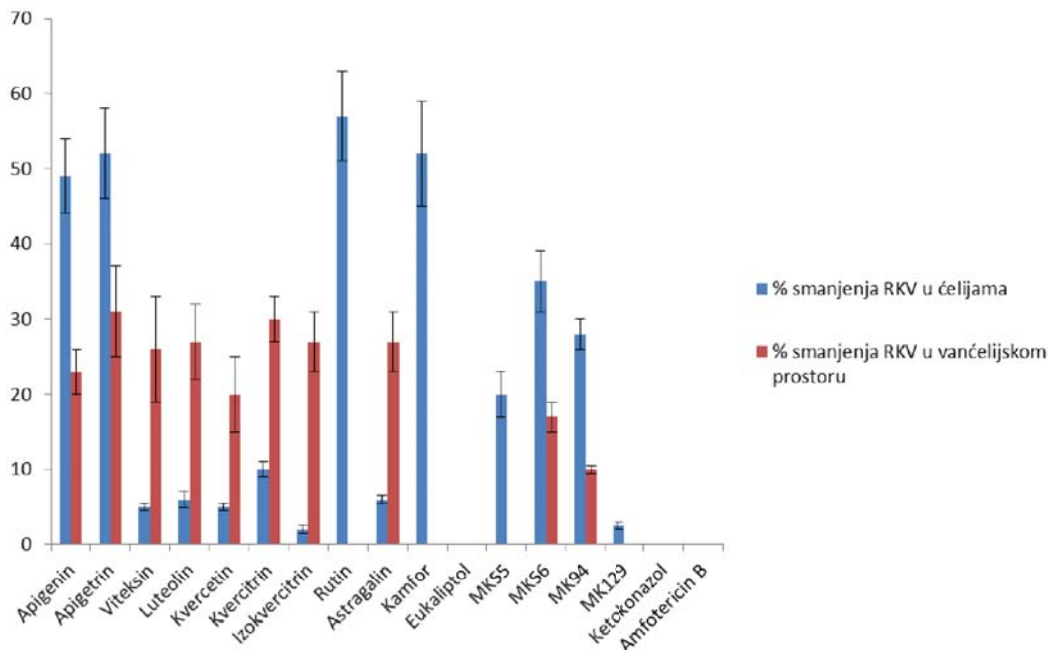
4.5.2. Sprečavanje rasta hifa inhibicijom reaktivnih kiseoničnih vrsta

Sposobnost *C. albicans* da formira hife i vrši invaziju na ćelije domaćina povezana je sa povećanjem nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) koje se stvaraju u ćeliji i dovode do destrukcije tkiva domaćina. Sprečavanjem nagomilavanja toksičnih intermedijera uticalo bi se na smanjenje patogenosti *C. albicans*.

Redukcija nivoa RKV u ćelijama *C. albicans* je bila najintenzivnija nakon tretmana rutinom, a nešto slabije i apigetrinom = kamforom > apigeninom > MK94 > MK56 > MK55 > kvercitrinom > astragalinom = luteolinom > kvercetinom = viteksinom. Jedinjenja poput amfotericina B, ketokonazola, izokvercitrina, eukaliptola i MK129 pokazala su slab efekat na smanjenje nivoa RKV u ćelijama *C. albicans* (**Grafik 3**).

Flavonoidni glikozidi, među kojima su i rutin i apigetrin, su bili efikasniji u odnosu na ostale grupe jedinjenja. Sposobnost flavonoida da spreče nastanak i smanje nivo već formiranih RKV je odavno poznata, a smatra se i faktorom koji je bitno uticao na sposobnost biljaka da nasele kopno. Prisustvo OH grupe na 3-poziciji flavonoidnog skeleta glavna je strukturna karakteristika koja omogućava antioksidantnu aktivnost (Pollastri i Tattini, 2011).

U sprečavanju nagomilavanja RKV u vanćelijskom prostoru najbolju aktivnost je pokazao apigetrin. U nešto manjoj meri i kvercitrin > luteolin = izokvercitrin = astragalin > viteksin > apigenin > kvercetin > MK56 > MK94 (**Grafik 3**) su doveli do smanjenja nivoa RKV van ćelija.



Grafik 3. Procenat inhibicije nagomilavanja RCV u ćelijama *C. albicans* i u vanćelijskom prostoru nakon tretmana jedinjenjima u minimalnim inhibitornim koncentracijama. Rezultati su predstavljeni kao prosečna vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

Aktivnost apigetrina, kvercitrina i luteolina konstantno je izražena, kako na smanjenje nivoa RCV u ćelijama, tako i u vanćelijskom prostoru. Rutin i kamfor, jedinjenja koja su u visokom procentu smanjila nivo RCV u ćelijama *C. albicans*, nisu delovala na smanjenje istih u vanćelijskom prostoru. Eukaliptol, MK55, MK129 kao i ketokonazol i amfotericin B nisu imali efekta na nivo RCV u vanćelijskom prostoru kada su primenjeni u minimalnim inhibitornim koncentracijama.

Ni za jedno od ispitivanih jedinjenja ne postoje podaci drugih autora o uticaju na nivo RCV u ćelijama *C. albicans* i njihovom vanćelijskom prostoru. Postoje jedino podaci o sposobnosti nekih od jedinjenja da na različite načine dovedu do smanjenja drugih osobina patogenosti *C. albicans*. Tretman apigeninom vodi redukciji nekih od faktora virulencije *C. albicans*, poput vanćelijske sekrecije enzima, sekretovanih aspartil proteaza (SAP), koji olakšavaju adherenciju gljive za tkiva domaćina (Yordanov i sar., 2008). U eseju sa RCV apigenin je u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ doveo do gotovo dvostrukog smanjenja nivoa RCV u fungalnim ćelijama, dok je u prethodnom

istraživanju (Yordanov i sar., 2008) nešto veća koncentracija apigenina (175 µg/mL) dovela do inhibicije 80% SAP.

Kvercetin je efikasan u suzbijanju hemolitičke aktivnosti *C. albicans* kao i aktivnosti različitih enzima (fosfolipaze, proteinaze, esteraze) uključenih u patogenezu i oštećenje tkiva domaćina (Singh i sar., 2015). Koncentracija od 200 µg/mL blokira sve navedene faktore virulencije, dok je u ovoj doktorskoj disertaciji koncentracija kvercetina od 75 µg/mL vodila redukciji nivoa RKV u fungalnim ćelijama za samo 5%, a u vanćelijskom prostoru za 20%. Moguće je da je za efikasniju redukciju faktora virulencije neophodna veća koncentracija kvercetina, ili da je njegov mehanizam antivirulentnog delovanja prvenstveno smanjenje aktivnosti enzima uključenih u virulenciju, a ne smanjenje nivoa RKV. Za ostala testirana jedinjenja ne postoje dostupni literaturni podaci o sposobnosti da dovedu do smanjenje virulentnih faktora *C. albicans*.

4.6. Uticaj antifungalnog tretmana na nivo ekspresije gena koji kodiraju proteine efluksnih pumpi *Candida albicans*

Pri dužem tretmanu antifungalnim agensima može doći do adaptacije *C. albicans* na nove uslove. Povećanje nivoa ekspresije gena koji kodiraju efluks pumpe gljiva omogućava umanjeње količine leka koji je u ćeliji i preživljavanje antifungalnog tretmana. Smanjenjem ekspresije ciljnih gena mogao bi se postići zadovoljavajuć antifungalni efekat primenom manje koncentracije aktivnih agenasa.

4.6.1. Uticaj jedinjenja na nivo ekspresije *MDR1*

Ispitan je uticaj svih jedinjenja na ekspresiju *MDR1*, gena koji kodira proteine efluks pumpe i uzrokuje rezistenciju. Nijedno od testiranih jedinjenja osim benomila, pozitivne kontrole, nije dovelo do povećanja ekspresije *MDR1*. S obzirom da je kontrolni, netretirani, uzorak, pokazivao nizak nivo ekspresije *MDR1*, efekat jedinjenja na smanjenje iste nije mogao biti zabeležen. Svakako, činjenica da nijedno od jedinjenja ne dovodi do povećanja ekspresije *MDR1* je poželjna osobina prilikom izbora novih antifungalnih agenasa. Za sada postoje jedino podaci o aktivnosti nekih lekova poput

antibiotika rifampicina na povećanje ekspresije *MDR1* (Vogel i sar., 2008), pa su potrebna dalja istraživanja njihovog uticaja na eventualno povećanje virulencije *C. albicans* i na opasnost primene lekova ovakvog efekta kod ljudi koji pored bakterijske imaju i fungalnu infekciju.

4.6.2. Uticaj jedinjenja na nivo ekspresije *CDR1*

Tretman flavonoidima doveo je do većeg ili manjeg smanjenja nivoa ekspresije *CDR1* (**Grafik 4**). Najintenzivnije smanjenje nivoa ekspresije zabeleženo je nakon tretmana astragalinom, a potom i apigeninom i apigetrinom. Ova tri flavonoida smanjila su ekspresiju *CDR1* za više od 50%, ukazujući na veliki potencijal u sprečavanju razvoja rezistencije na antifungalni tretman. Vitexin, luteolin, kvercetin, kvercitrin, izokvercitrin i rutin nisu značajnije smanjivali nivo ekspresije *CDR1*.

Astragalin je ispoljio najintenzivniji uticaj na smanjenje ekspresije *CDR1* od svih ispitanih jedinjenja (**Grafik 4**). Za astragalin je ranija *in silico* predikcija (Ammar, 2017) pokazala da ima potencijal da inhibira P-glikoprotein. Ovaj protein je prisutan kod ljudi, gljiva i bakterija, funkcionalno i strukturno je srodan fungalnim Cdr efluks pumpama i uključen u efluks različitih jedinjenja, uključujući i lekove (Kofla i sar., 2011). Za jedinjenja strukture slične astragalinu, kempferol-3-O- β -d-(6"-E-p-kumaroil) glukopiranozid i kempferol 3-O- α -L-(2,4-bis-E-p-kumaroil) ramnozid, pokazano je da mogu delovati kao inhibitori NorA efluks pumpe *Staphylococcus aureus* (Falcão-Silva i sar., 2009; Holler i sar., 2012). Koncentracija glukozida kempferola koja je ispitivana u ovoj doktorskoj disertaciji bila je 75 μ g/mL, dok kempferol inhibira bakterijske efluks pumpe sa IC_{50} od 19 μ g/mL (Brown i sar., 2015). Studija Shao i sar., (2016) utvrdila je da kempferol smanjuje ekspresiju *CDR1*, *CDR2* i *MDR1* kada je primenjen u koncentraciji od 128 μ g/mL. S obzirom na aktivnost koju su pokazali u dosadašnjim istraživanjima nastavak ispitivanja kempferola, kao i njegovih različitih glukozida bi mogao omogućiti pronalazak efikasnih inhibitora efluks pumpi patogenih mikroorganizama.

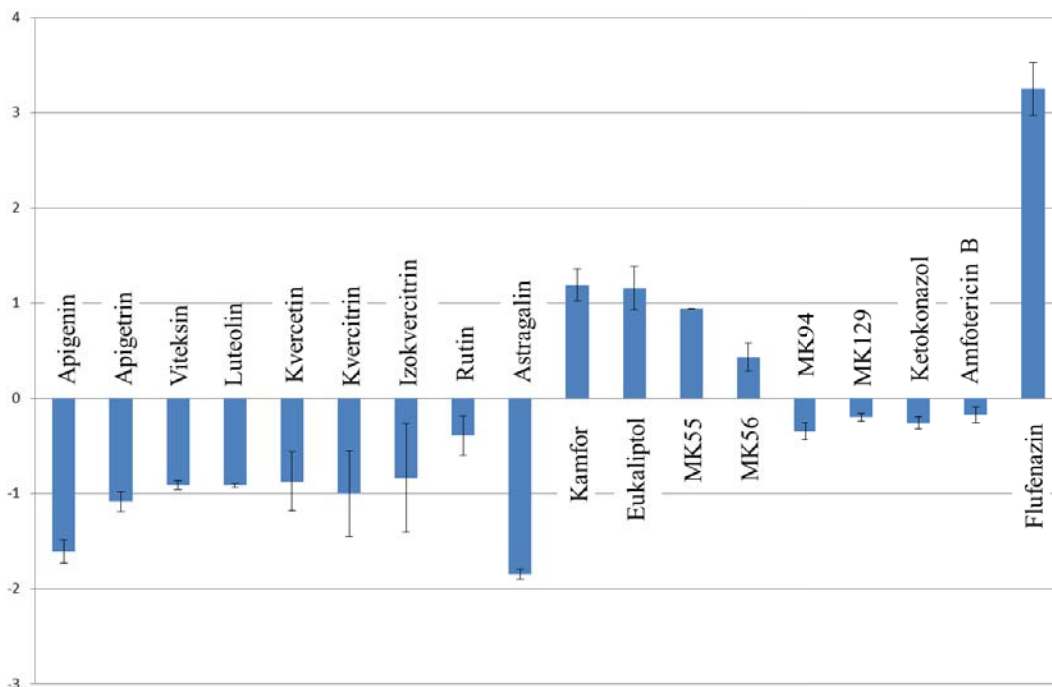
Tretman **apigeninom** u koncentraciji od 100 μ g/mL vodi smanjenju nivoa *CDR1* u ćelijama *C. albicans* 475/15 (**Grafik 4**). Apigenin je i ranije bio ispitivan kao inhibitor različitih efluks pumpi. Kada je primenjen u 80 μ M koncentraciji (21 μ g/mL) apigenin

u ćelijama raka dojke smanjuje ekspresiju P-glikoproteina (Seo i sar., 2017). Apigenin redukuje i aktivnost bakterijskih efluks pumpi; koncentracija od 38 $\mu\text{g/mL}$ inhibira 50% pumpi (IC_{50}) (Brown i sar., 2015), što je niže od koncentracije koja inhibira fungalne efluks pumpe. Pored mogućnosti da su efluks pumpe bakterija osetljivije na tretman apigeninom od fungalnih, postoji i mogućnost da je osetljivost slična – koncentracija od 100 $\mu\text{g/mL}$ je MIK apigenina i kao takva jedina koncentracija testirana u ovoj disertaciji pa postoji mogućnost da bi i niža koncentracija ostvarila inhibitorni efekat. Takođe, postoji značajna razlika u metodologiji ove dve studije jer je za razliku od posmatranja uticaja apigenina na gensku ekspresiju studija Brown i sar., (2015) posmatrala direktan uticaj na aktivnost već formiranih efluks pumpi. Nasuprot rezultatima prethodnih istraživanja studija Ren i sar., (2018) zaključila je da apigenin povećava ekspresiju gena koji kodiraju efluks pumpe ćelija miša i vode povećanom izbacivanju holesterola iz ćelije, što sugeriše postojanje širokog dijapazona reakcija različitih sistema na tretman istim jedinjenjem.

Rutin nije pokazao značajniji efekat na smanjenje ekspresije *CDRI* u fungalnim ćelijama (**Grafik 4**). Studija Iriti i sar., (2017) utvrdila je da rutin inhibira efluks pumpe u ćelijama raka dojke. Pored proteina P-gp rutin je inhibirao i BCRP (protein rezistencije raka dojke, **Breast Cancer Resistance Protein**) koji spada u grupu humanih ABC transportera. Testirana koncentracija (20 μM i 50 μM , odnosno 12 $\mu\text{g/mL}$ i 30 $\mu\text{g/mL}$, Iriti i sar., 2017) bila je slična onoj ispitanoj u ovoj doktorskoj disertaciji (37,5 $\mu\text{g/mL}$), pa se može pretpostaviti da su fungalne efluks pumpe rezistentnije na tretman rutinom od humanih. Pored različite osetljivosti pumpi različitog porekla, postoji i mogućnost da rutin deluje direktno na inhibiciju aktivnosti efluks pumpi (Iriti i sar., 2017), a da pritom ne remeti ekspresiju ciljnih gena (**Grafik 4**).

Luteolin i **kvercetin** inhibiraju efluks pumpe *Staphylococcus aureus* sa IC_{50} od 75 $\mu\text{g/mL}$ (Brown i sar., 2015), dok je koncentracija koja je bila neaktivna prema fungalnim efluks pumpama u ovom eseju bila 37,5 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 75 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracija kvercetina koja je bila testirana od strane Brown i sar., (2015) i ovoj doktorskoj disertaciji je identična, dok je u studiji Brown i sar., 2015 koncentracija luteolina bila čak i viša. Razlog neaktivnosti ova dva flavonoida može se naći u mogućnosti da su fungalne efluks pumpe otpornije na različite tretmane u poređenju sa bakterijskim. Takođe, još jedan razlog neslaganja može se naći u različitoj metodologiji

na osnovu koje se može pretpostaviti da ova dva flavonoida (Brown i sar., 2015), isto kao i već pomenuti rutin i apigenin (Iriti i sar., 2017), prevashodno deluju kao direktni inhibitori aktivnosti pumpi, a u manjoj meri utiču na početne korake u njihovoj sintezi.



Grafik 4. Promene u nivou ekspresije *CDRI* nakon tretmana minimalnom inhibitornom koncentracijom jedinjenja (log2 promene u odnosu na kontrolu čija promena je 0). Flufenazin je korišćen kao pozitivna kontrola.

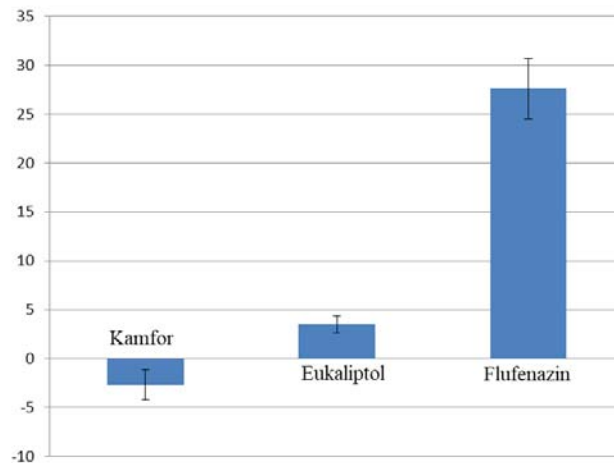
Tretman **terpenima**, kamforom i eukaliptolom, doveo je do povećanja nivoa ekspresije *CDRI* (**Grafik 4**). Eukaliptol inhibira efluks pumpe *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* (Saviuc i sar., 2016), što ostavlja mogućnost da je stimulacija ekspresije gena koji kodiraju za efluks pumpe nakon tretmana eukaliptolom karakteristična samo za fungalne ćelije. Podaci o uticaju kamfora na efluks pumpe *C. albicans*, kao i drugih gljiva ili bakterija, ne postoje u trenutno dostupnoj literaturi. Uzevši u obzir da povećanje nivoa efluks pumpi nije poželjna osobina agenasa koji bi se koristili u terapijske svrhe, ove osobine kamfora i eukaliptola treba detaljnije ispitati kako bi se eventualno ograničila njihova upotreba. Činjenica da su ova dva terpena čest sastojak različitih farmaceutskih preparata predstavlja razlog više da se preispita njihova eventualno nepovoljna aktivnost po zdravlje ljudi.

Jedinjenja sintetskog porekla su imala raznolik efekat na ekspresiju *CDR1*, ali je nijedno nije značajnije remetilo. Flufenazin, pozitivna kontrola, doveo je do značajnog povećanja ekspresije *CDR1*, više od 3 puta u odnosu na netretiran uzorak.

4.6.3. Uticaj odabranih jedinjenja na nivo ekspresije *CDR2*

Jedinjenja koja su dovela do povećanja ekspresije *CDR1* (kamfor, eukaliptol i pozitivna kontrola, flufenazin) testirana su kako bi se video njihov uticaj na ekspresiju *CDR2*. Efekat kamfora i eukaliptola na ekspresiju *CDR2* je bio različit (**Grafik 5**). Tretman **kamforom** doveo je do smanjenja ekspresije *CDR2*, dok je tretman **eukaliptolom** povećao istu. Razlike u efektu na *CDR2* nakon sličnog efekta na *CDR1* ukazuju na činjenicu da ova dva jedinjenja najverovatnije deluju na različite regulatore ekspresije navedenih gena. Aktivator transkripcije *TAC1* je uključen u regulaciju ekspresije i *CDR1* i *CDR2*, jer oba gena u svojim promotorima sadrže DRE regulatorni element za koji se Tac1 vezuje (Coste i sar., 2004). Moguće je da eukaliptol ispoljava svoju aktivnost upravo regulacijom *TAC1*, s obzirom da dovodi do povećanja ekspresije i *CDR1* i *CDR2*. U regulaciju ekspresije *CDR1* uključen je i transkripcioni faktor CaNdt80p za koji nije zabeleženo da istovremeno utiče i na *CDR2* (Wang i sar., 2006), te je možda on posrednik u ostvarivanju povećane ekspresije jedino *CDR1* nakon tretmana kamforom.

Uzevši u obzir uticaj eukaliptola na povećanje ekspresije i *CDR1* i *CDR2* treba biti oprezan prilikom upotrebe ovog jedinjenja u bilo koje svrhe, a naročito u kombinaciji sa antifungalnim lekovima koji su substrat za efluks pumpe jer može smanjiti njihov efekat.



Grafik 5. Promene u nivou ekspresije *CDR2* nakon tretmana minimalnom inhibitory koncentracijom odabranih jedinjenja (log2 promene u odnosu na kontrolu čija promena je 0). Flufenazin je korišćen kao pozitivna kontrola. Eksperiment je rađen u tehničkom triplikatu a predstavljeni rezultati su prosečne vrednosti dva biološka ponavljanja \pm standardna devijacija.

4.7. Uticaj jedinjenja na ekspresiju gena *ERG11* i na aktivnost proteina Erg11 (CYP51)

Protein CYP51 (Erg11) je glavno mesto delovanja azolnih lekova, kodiran je genom *ERG11*, čija povećana ekspresija vodi rezistenciji na antifungalni tretman. Nijedno od jedinjenja odabranih za ispitivanje u ovoj doktorskoj disertaciji nije ranije ispitano kao inhibitor aktivnosti enzima CYP51 ili ekspresije gena koji ga kodira.

4.7.1. Nivo ekspresije *ERG11* nakon tretmana jedinjenjima

Najintenzivnije smanjenje nivoa ekspresije *ERG11* zabeleženo je nakon tretmana jedinjenjem **MK55** (Grafik 6). Za razliku od MK55, tretman sa **MK94** doveo je do povećanja ekspresije navedenog gena, sugerišući da bi primena MK94 sa lekovima iz azolne grupe dovela do rezistencije *C. albicans* na antifungalni tretman.

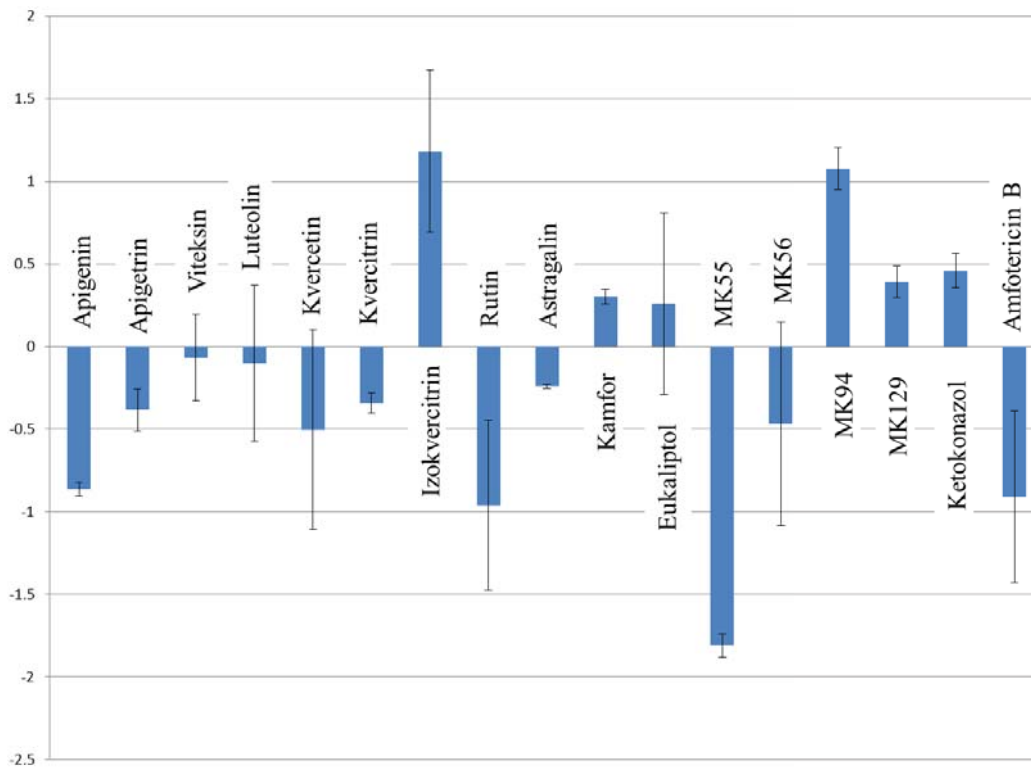
Tretman **amfotericinom B** (0,63 $\mu\text{g/mL}$) vodio je smanjenju ekspresije *ERG11*. Ovaj lek pored toga što deluje direktno, vezujući se za ergosterol u ćelijskoj membrani, može

i umanjiti količinu ergosterola prisutnog u ćeliji smanjenjem nivoa ekspresije gena koji kodira za protein uključen u biosintezu ovog lipida. Ranija studije Liu i sar., (2005) takođe je pokazala da tretman amfotericinom B (0,029 µg/mL) vodi smanjenju ekspresije *ERG11*. Manja koncentracija od 0,63 µg/mL nije bila testirana u ovoj doktorskoj disertaciji ali uzevši u obzir prethodna istraživanja (Liu i sar., 2005) postoji šansa da bi i ona dovela do smanjenja ekspresije *ERG11*.

Tretman **ketokonazolom** nije doveo do značajnije promene u ekspresiji *ERG11*. Moguće je da je potrebno ćelije *C. albicans* izlagati aktivnom agensu u trajanju dužem od 30 min, koliko je bilo u ovom eseju, kako bi se gljiva adaptirala na lek i počela povećano da eksprimira ovaj gen.

Od jedinjenja prirodnog porekla značajnije povećanje ekspresije *ERG11* primećeno je nakon tretmana **izokvercitrinom**, dok je tretman **apigeninom** i **rutinom** vodio nešto blažem smanjenju ekspresije ciljnog gena (**Grafik 6**). Apigenin i rutin imaju potencijala da pomognu u suzbijanju infekcija izazvanih *C. albicans* koja je usled povećane ekspresije *ERG11* rezistentna na lekove iz azolne grupe. Dodatnu pažnju treba obratiti na uticaj izokvercitrina i njegov potencijal da dovede do neosetljivosti na antifungalni tretman, jer povećanjem ekspresije gena *ERG11* ovaj flavonoid dovodi i do povećanja količine CYP51 u ćelijama *C. albicans*.

Ostala jedinjenja prirodnog porekla ispitivana u ovoj studiji (apigetrin, viteksin, luteolin, kvercetin, kvercitrin, astragalin, kamfor i eukaliptol) nisu značajnije remetila nivo *ERG11*.



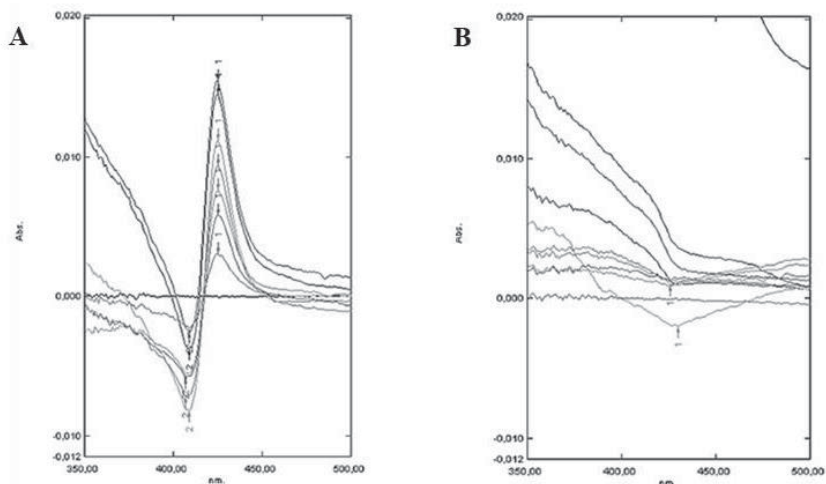
Grafik 6. Promene u nivou ekspresije *ERG11* nakon tretmana minimalnom inhibitornom koncentracijom odabranih jedinjenja (log2 promene u odnosu na kontrolu čija promena je 0). Eksperiment je rađen u tehničkom triplikatu a predstavljani rezultati su prosečne vrednosti dva biološka ponavljanja \pm standardna devijacija.

4.7.2. Sposobnost jedinjenja da inhibiraju Erg11 (CYP51)

Protein CYP51 ciljno je mesto inhibitornog delovanja azolnih lekova. Sva jedinjenja korišćena u ovoj doktorskoj disertaciji su ispitana u cilju pronalaska novog inhibitora ovog ciljnog proteina. S obzirom da protein CYP51 postoji i kod ljudi, neophodno je pronaći jedinjenja koja bi se selektivno vezivala samo za onaj fungalnog porekla čime bi se smanjila eventualna neželjena dejstva kao posledica neselektivnog vezivanja.

Od jedinjenja testiranih u ovoj disertaciji jedino je MK55 imao potencijala da se veže za CYP51 i to vezivanje je bilo selektivno, odnosno MK55 se vezivao za protein fungalnog porekla dok prema humanom nije pokazivao nikakav afinitet (**Slika 35**). Vezivanje tipično za inhibitore CYP51 karakteriše absorpcioni maksimum na oko 436 nm a

minimum na 416 nm (**Slika 35A**). Pri titriranju proteina humanog porekla nije došlo do ovakvih apsorpcionih promena, što je znak da do vezivanja nije došlo (**Slika 35B**).



Slika 35. Absorpcioni spektar (350-500 nm) zabeležen nakon titriranja enzima fungalnog (**A**) i humanog (**B**) porekla rastućim koncentracijama MK55.

MK55 se vezao za ciljani protein manjim afinitetom (K_D 4,19 μM) nego komercijalni azolni lekovi ($K_D < 0,05 \mu\text{M}$) (**Tabela 8**).

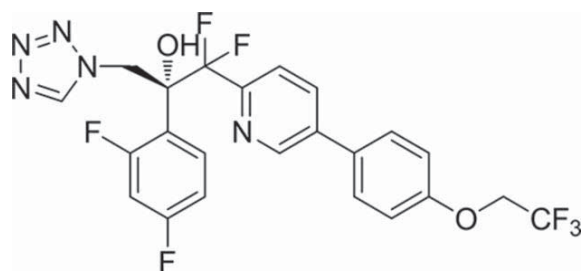
Tabela 8. Konstante disocijacije (K_D) jedinjenja pri vezivanju za protein CYP51 poreklom iz *C. albicans* (CaCYP51) i protein CYP51 humanog porekla (hCYP51). Rezultati su predstavljeni kao prosečna vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija. (–) nema vezivanja.

Jedinjenje	K_D CaCYP51	K_D hCYP51
MK55	$4,19 \pm 0,485 \mu\text{M}$	–
Ketokonazol	$< 0,05 \mu\text{M}$	$< 0,05 \mu\text{M}$
Flukonazol	$< 0,05 \mu\text{M}$	$< 0,05 \mu\text{M}$

Ipak, ovo jedinjenje ima veliki potencijal za dalja istraživanja i potencijalnu primenu u farmaceutskoj industriji jer se za razliku od flukonazola i ketokonazola selektivno

vezuje za ciljni protein te time postoje velike šanse da bi imao manje neželjenih efekata na njih.

Kliničko ispitivanje jedinjenja VT-1161 ((R)-2-(2,4-difluorofenil)-1,1-difluoro-3-(1H-tetrazol-1-il)-1-(5-(4-(2,2,2-trifluoroetoksi)fenil)piridin-2-il)propan-2-ol) (Slika 36), potencijalnog inhibitora CYP51 sprovedeno je od strane Warrilow i sar., (2014). Ovo jedinjenje je pokazalo $K_D \leq 39$ nM prema proteinu fungalnog porekla, a $K_D > 86$ μ M prema proteinu CYP51 humanog porekla. VT-1161 ima oko 100 puta veći afinitet prema vezivanju za fungalni protein u poređenju sa MK55, a vrednost MIK 0,002 μ g/mL je znatno niža u poređenju sa minimalnim inhibitornim koncentracijama MK55 (56 μ g/mL). Neophodan je dalji rad na razvoju novih struktura zasnovanih na MK55 kako bi se ovom jedinjenju povećao afinitet za CYP51 kao i sposobnost da inhibira rast ćelija *C. albicans*, a sve to da bi nakon eventualnih kliničkih istraživanja postao konkurentan antifungalnim agensima koji se trenutno razvijaju. Jedinjenje VT-1161 je pokazalo afinitet i prema CYP51 poreklom iz *Trichophyton rubrum* (K_D 242 nM) (Warrilow i sar., 2017) ostavljajući mogućnost da se ispita i aktivnost MK55 prema CYP51 poreklom iz *T. rubrum*, jer postoji šansa da bi pokazao veći afinitet ka njemu nego prema enzimu poreklom iz *C. albicans*.



Slika 36. Struktura jedinjenja VT-1161 (Garvey i sar., 2015).

Azoli su grupa jedinjenja sa petocikličnim prstenom koji sadrži atom azota i makar još jedan atom koji nije ugljenik (recimo još molekula azota, kao u slučaju tetrazola, VT-1161). Jedinjenje MK55 ne spada u grupu azola, jer ima petočlani ciklus sa jednim atomom azota i četiri atoma ugljenika. Dosadašnja istraživanja su uglavnom ispitivala samo azole kao potencijalne inhibitore CYP51 pa u budućnosti pažnja može biti posvećena i drugim jedinjenjima, strukture slične MK55, jer za neka od njih postoji mogućnost da se vezuju sa većim afinitetom ili većom selektivnošću za fungalni

protein. Inhibitori CYP51 koji po strukturi nisu azoli su ispitivani od strane Doyle i sar., (2010) i pokazalo sa da imaju visok potencijal za inhibiciju CYP51 enzima poreklom iz protozoe *Trypanosoma cruzi* i time služe kao potencijalna terpija za Šagasovu bolest (američka tripanozomijaza). Inhibicija enzima CYP51 poreklom iz protozoe je još jedna potencijalna primena za koju bi MK55 mogao biti ispitan.

4.8. *In silico* predviđanje načina vezivanja MK55 za fungalni protein CYP51

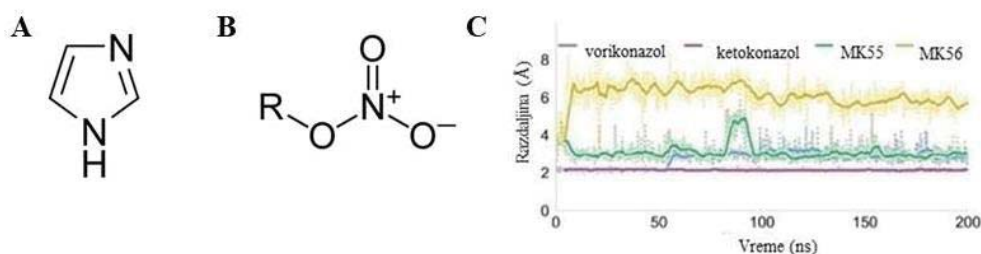
Strukturni model *C. albicans* CYP51 pripremljen je na osnovu kristalne strukture CYP51 *S. cerevisiae* kako bi se izvele simulacije dokinga i odredili afiniteti vezivanja. Cilj kompjuterskog predviđanja je detaljnije objašnjenje prethodno dobijenih eksperimentalnih podataka, odnosno sposobnosti MK55 da se veže za fungalni CYP51 *in vitro*.

Vezivanje MK55 za CYP51 ispitano je kompjuterskom simulacijom, metodama molekularnog dokinga i molekularne dinamike. Radi poređenja, u studije je uključen i MK56, jedinjenje koje ima zajedničke strukturne elemente kao MK55, ali nema afinitet prema CYP51. MK55 i MK56 spadaju u nitratne estre, a razlikuju se u heterocikličnom prstenu koji je kod MK55 indolne strukture (formula C₈H₇N) a kod MK56 hinolonske (formula C₉H₇N) (Slika 27).

Komercijalni antifungalni lekovi, vorikonazol i ketokonazol, poznati inhibitori CYP51, korišćeni su kao pozitivne kontrole za *in silico* testiranja. Vorikonazol je imao doking poziciju koja je identična prethodno utvrđenoj kristalnoj strukturi kompleksa CYP51 i vorikonazola (PDB: 5HS1, 4ZE0, 4UYM). Takođe, najverovatnija pozicija vezivanja ketokonazola predviđena doking simulacijom je bila u skladu sa prethodno objavljenim kristalnim strukturama ketokonazola vezanog za CYP51 protein (PDB: 3LD6, 2JJP), što je potvrdilo ispravnost homologog modela CYP51 korišćenog u ovoj doktorskoj disertaciji.

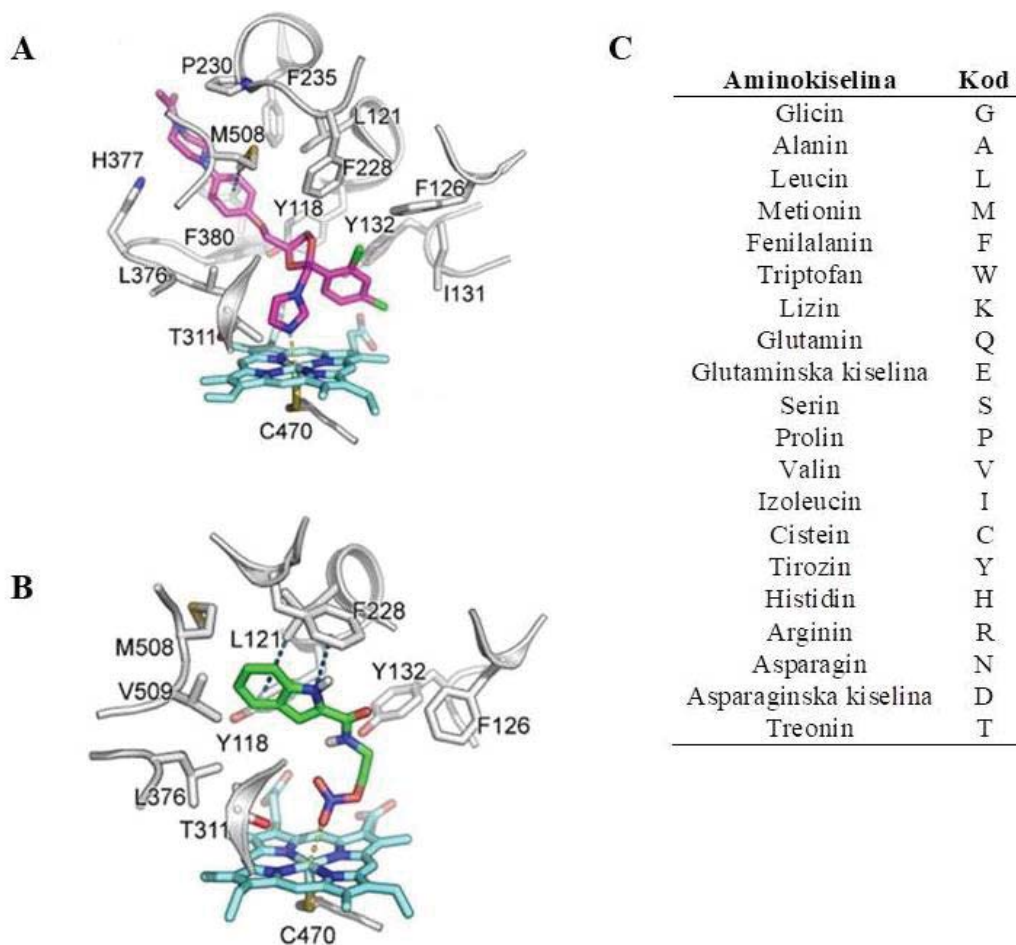
Vorikonazol, ketokonazol, MK55 i MK56 u kompleksu sa CYP51 podvrgnuti su slobodnim (engl. unconstrained) simulacijama molekularne dinamike tokom 200 ns, a u cilju određivanja načina vezivanja i stabilnosti kompleksa ligand-protein. Za tri liganda, vorikonazol, ketokonazol i MK55, spajanje sa ciljnim proteinom bilo je stabilno kroz celokupan tok simulacije molekularne dinamike i ukazivalo na konstantnu topologiju

kompleksa ligand-protein kroz vreme. Razdaljina između atoma azota imidazolnog prstena (ketokonazol i vorikonazol) odnosno atoma kiseonika nitro grupe (MK55 i MK56) od atoma gvožđa (deo CYP51) je nadgledana kako bi se procenila doslednost interakcije potencijalnih inhibitora sa atomom gvožđa (**Slika 37**). Azot imidazolne grupe ketokonazola konstantno je interagovao sa gvožđem hem grupe na razdaljini od oko 2 Å (10^{-10} m), dok azot imidazolne grupe vorikonazola održava konstantnu razdaljinu od 3 Å. U slučaju MK55 interakcija nitro grupe je bila stabilna gotovo svo vreme simulacije i to sa razdaljinom od 2-3 Å od atoma gvožđa, što se ne može reći za MK56 čija nitro grupa ne interaguje sa gvožđem ni nakon 200 ns simulacije.



Slika 37. A- imidazolni prsten, B- nitratna grupa, C- razdaljina zabeležena tokom simulacije molekularne dinamike između azota imidazolnog prstena (vorikonazola i ketokonazola) odnosno atoma kiseonika nitro grupe (MK55 i MK56) i gvožđa hem grupe.

Ketokonazol ima veći afinitet vezivanja za CYP51 nego MK55 ($K_D < 0,05 \mu\text{M}$ odnosno $K_D 4,19 \mu\text{M}$). Simulacije dokinga i molekularne dinamike pokazale su stabilnu topologiju i za MK55, koji formira nekoliko hidrofobnih interakcija sa citohromom. Imidazolna grupa ketokonazola specifično interaguje sa L376, dihlorfenilna grupa interaguje sa I131, F126 i Y132; diksolanski prsten interaguje sa Y118 i F228, fenil grupa interaguje sa F235, F380 i M508 dok piperazin grupa interaguje sa Y64, H377 i F380 hidrofobnim lancima (**Slika 38A**).



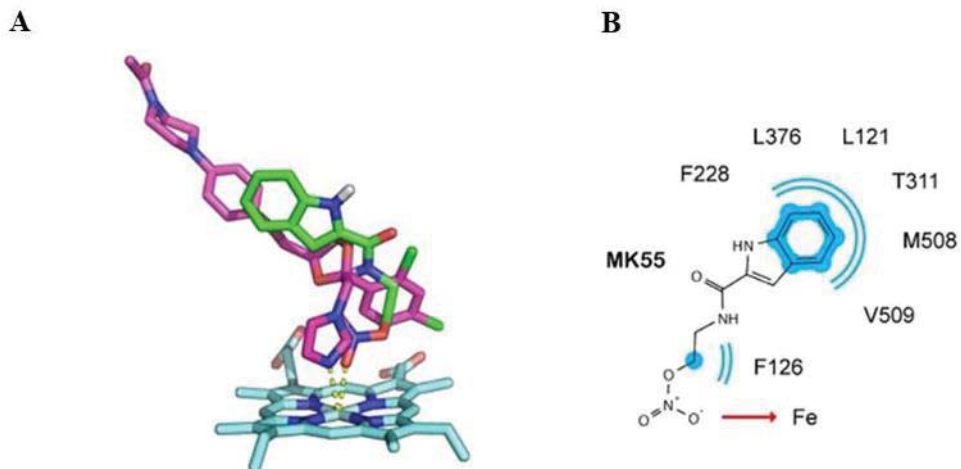
Slika 38. A- način vezivanja ketokonazola (pink) za CaCYP51 (siva), B- način vezivanja MK55 (zelena) za CaCYP51 (siva). Elektrostatske interakcije su prikazane žutom bojom, a hidrofobne plavom, C- jednoslovne oznake aminokiselina.

MK55 stabilno interaguje sa gvožđem hem grupe i formira nekoliko interakcija, naročito sa F126, Y118, M508 i V509 (**Slika 38B**). U grupe MK55 koje doprinose stabilnosti vezivanja za CaCYP51 spada i indolni prsten, čija interakcija je stabilizovana vezama sa aromatičnim bočnim lancima F228 i alifatičnim lancem L121.

Kada se MK55 i ketokonazol postave jedno uz drugo (**Slika 39A**) primećuje se da imaju sličnu topologiju u okviru interagujućeg mesta i hem kofaktora proteina CYP51. Komplet interakcija koje uzrokuju ovakvu poziciju MK55 sa CYP51 aktivnim mestom je prikazan farmakoforama na **Slici 39B**. Farmakofore su abstraktan pojam koji obuhvata osobine jednog molekula neophodne za njegovu interakciju sa nekim

biološkim makromolekulom. U slučaju MK55 fenilni prsten indolne grupe interaguje sa L376, L121, T311, M508 i V509 i najverovatnije ima najznačajniju ulogu u vezivanju za ciljni protein.

Ovo su prva ispitivanja nitratnog estra MK55 sa ciljem utvrđivanja načina vezivanja za protein CYP51.

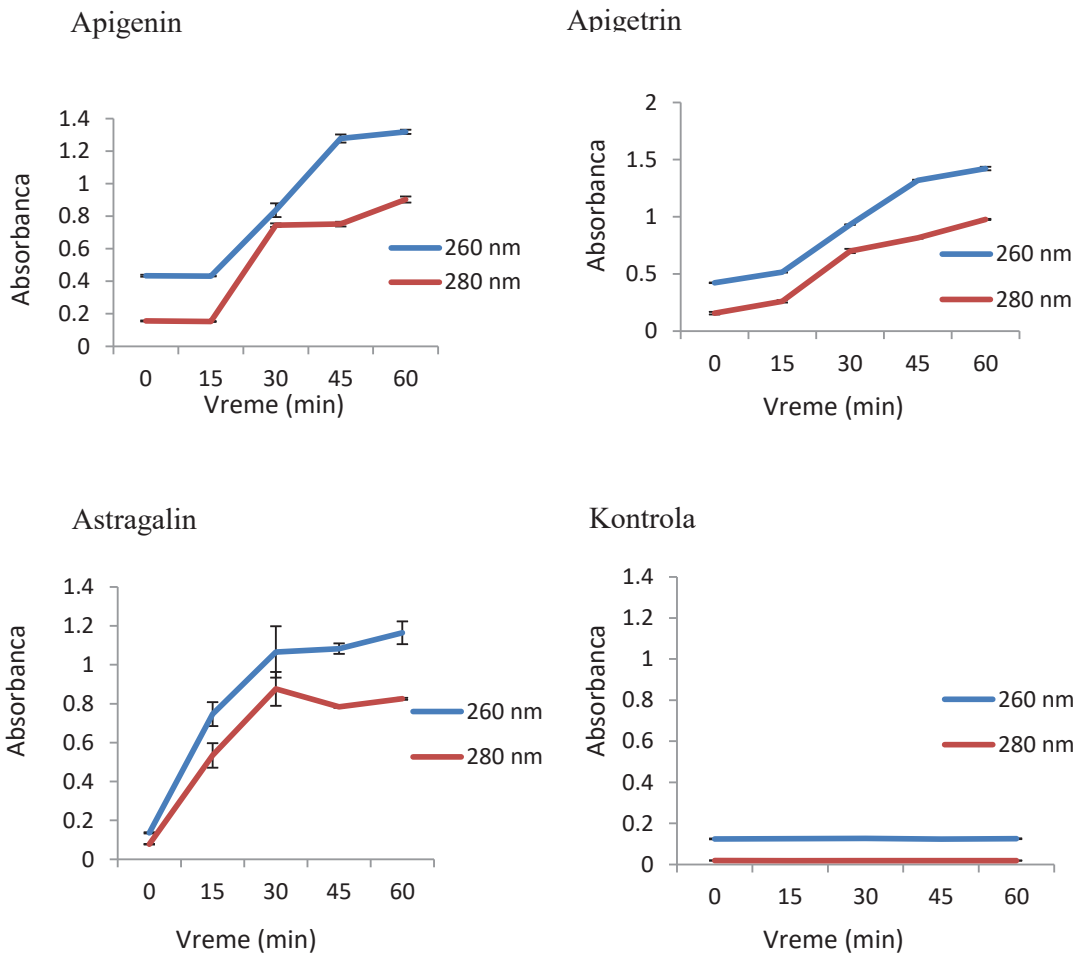


Slika 39. **A-** ketokonazol (pink) i MK55 (zelen) i njihov moguć način interakcije sa hem kofaktorom, **B-** farmakofore MK55 i njihove moguće proksimalne interagujuće aminokiseline u dvodimenzionalnom prikazu. Hidrofobne interakcije su obeležene plavom bojom, a elektrostatske žutom.

4.9. **Narušavanje integriteta ćelijske membrane *Candida albicans* kao potencijalni mehanizam delovanja**

Jedinjenja prirodnog porekla koja su pokazala najbolji efekat u prethodnim testovima (antimikrobna aktivnost i smanjenje virulencije *C. albicans*) odabrana su kako bi se detaljnije utvrdio njihov mehanizam delovanja. Apigenin, apigetrin i astragalin su odabrani kako bi se ispitalo njihov uticaj na integritet ćelijske membrane tokom vremenskog interval od 0 do 60 minuta (**Grafik 7**). Sva tri flavonoida dovela su do vremenski zavisnog narušavanja integriteta ćelijske membrane. Intenzitet absorbance sadržaja koji je izašao iz ćelije tokom antifungalnog tretmana naglo raste nakon 30

minuta, te se ovo vreme može smatrati minimumom vremena koje je potrebno da sva tri ispitivana jedinjenja ostvare svoj efekat. Nakon 30 minuta najintenzivnija absorbanca, te shodno tome najveći stepen destrukcije ćelijske membrane, je zabeležena nakon tretmana astragalinom. Kod uzorka tretiranog apigetrinom promena je bila najintenzivnija posle 45 min. Studija Lee i sar., (2018a) takođe je pokazala da apigenin remeti integritet ćelijske membrane *C. albicans* i procenila da tretman apigeninom vodi oštećenjima prečinka oko 2,3 nm. Za apigetrin i astragalin trenutno ne postoje dostupne dodatne studije koje bi utvrdile detalje o načinu na koji ova jedinjenja dovode do destrukcije ćelijske membrane. *In silico* predikcija Ammar, (2017) je tvrdila da astragalin može imati funkciju agonista membrane, što je u suprotnosti sa nalazima ove doktorske disertacije. Radi utvrđivanja tačne funkcije bilo kog jedinjenja *in silico* studije neophodna je potvrda *in vitro* ispitivanjima.



Grafik 7. Narušavanje integriteta membrane tokom delovanja $1\frac{1}{2}$ MIK apigenina, apigentrina i astragalina (0-60 min) detektovano merenjem absorbance sadržaja koji je izašao iz ćelije (nukleinske kiseline i proteini). Kontrola je uzorak *C. albicans* koji nije tretiran nijednim agensom. Rezultati predstavljaju prosečnu vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

4.10. Citotoksičnost odabranih jedinjenja

Kako bi novi antifungalni agensi stekli primenu u farmaciji, pored toga što moraju efikasno suzbijati gljivične infekcije, neophodno je i da su što manje štetni po zdravlje ljudi. Citotoksičnost jedinjenja koja su pokazala najveći potencijal u prethodnim

esejima (nisku MIK odnosno visoku sposobnost sprečavanja formiranja biofilma i/ili prelaska iz kvasolike u hifalnu fazu rasta) je određena na ćelijskim linijama jetre.

Jedinjenja sintetskog porekla, MK55 i MK94, nisu citotoksična prema primarnim ćelijskim linijama jetre ($GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 9**), što ukazuje na njihov potencijal za dalji razvoj i potencijalnu primenu kao antifungalnih agenasa u lečenju ljudi. Citotoksičnost ove grupe jedinjenja nije bila prethodno ispitivana.

Apigenin nije ispoljio citotoksičnost prema ćelijskim linijama jetre (**Tabela 9**). Prethodne studije su pokazale da apigenin ima citotoksičan efekat na ćelije raka, dok na zdrave humane ćelije nema nikakav ili ima minimalni citotoksični efekat (Yan i sar., 2017). Međutim, ispitivanja na drugim ćelijskim linijama pokazala su da je apigenin ispoljavao citotoksičan efekat prema ćelijskim linijama TIG-1 (humani fibroblast) i HUVE (ćelije humane umbilikalne vene) sa LC_{50} (50% letalne koncentracije) od $110 \mu\text{M}$ ($29,7 \mu\text{g/mL}$). Ova koncentracija apigenina niža je od njegove minimalne inhibitorne utvrđene u ovoj doktorskoj disertaciji ($100 \mu\text{g/mL}$), pa treba obratiti povećanu pažnju na potencijalnu citotoksičnost koju bi apigenin mogao ispoljiti prema različitim ćelijskim linijama.

Za glikozid apigenina, **apigetrin**, pokazano je da u koncentraciji od $90 \mu\text{g/mL}$ ispoljava citotoksičan efekat na ćelije jetre (**Tabela 9**). Ranijim ispitivanjima je utvrđeno da apigetrin ($100 \mu\text{M}$, odnosno $43 \mu\text{g/mL}$) nema citotoksičan efekat na ćelije preadipocita miša (Hadrich i Sayadi, 2018). Koncentracije apigetrina niže od $90 \mu\text{g/mL}$ mogu se smatrati bezbednim za ćelije preadipocita i ćelije jetre, a uzevši u obzir da koncentracija apigetrina koja ispoljavala minimalni inhibitorni efekat na ćelije *C. albicans* iznosi $50 \mu\text{g/mL}$, može se smatrati bezbednom za upotrebu.

Luteolin nije ispoljio citotoksičan efekat na ćelije jetre (**Tabela 9**), ali je zato u koncentraciji od $107 \mu\text{M}$ ($30,6 \mu\text{g/mL}$) odnosno $57 \mu\text{M}$ ($16,3 \mu\text{g/mL}$) dovodio do toksičnog efekta kod 50% ćelija fibroblasta odnosno humane umbilikalne vene (Matsuo i sar., 2005). Luteolin ($20 \mu\text{M}$ tj. $5,7 \mu\text{g/mL}$) je bezbedan i po humane mononuklearne ćelije krvi (Horinaka i sar., 2005), ali je koncentracija testirana u ovoj studiji znatno niža od MIK luteolina ($37,5 \mu\text{g/mL}$), te je neophodno ispitati ga u višim koncentracijama kako bi se sa sigurnošću mogao utvrditi njegov efekat na različite ćelijske linije.

Kvercetin nije ispoljio citotoksičan efekat na ćelijsku liniju jetre (**Tabela 9**). U ispitivanjima Matsuo i sar., (2005) pokazano je da ima izraženiji citotoksični efekat na ćelijsku liniju humane umbilikvalne vene (HUVE, $LC_{50}=18,4 \mu\text{g/mL}$) nego na ćelijsku liniju fibroblasta (TIG-1, $LC_{50}=91,6 \mu\text{g/mL}$).

Kvercetin je još 1996 godine podvrgnut kliničkoj studiji kako bi se ispitao njegov potencijal da bude primenjen kao inhibitor tirozin kinaza i time ima ulogu u lečenju malignih obolenja (Ferry i sar., 1996). Preporučena je doza od 1400 mg/m^2 kao koncentracija kvercetina koja se može primeniti kao pojedinačna doza tokom kratkog vremenskog perioda i koja bi bila ispitana u drugoj fazi kliničkih istraživanja. Do druge faze kliničkih ispitivanja kvercetina za sada nije došlo. Klinička studija drugih autora (Askari i sar., 2013) je pokazala da kvercetin kao dodatak ishrani u kombinaciji sa vitaminom C može značajno smanjiti oksidativni stres i inflamatorne biomarkere.

Citotoksičnost **kvercitrina** do sada nije ispitivana od strane drugih autora, a u ovoj studiji je pokazao GI_{50} od $73 \mu\text{g/mL}$ što je znatno više od vrednosti njegove minimalne inhibitorne koncentracije ($37,5 \mu\text{g/mL}$) te bi se na osnovu toga mogao smatrati bezbednim za humanu upotrebu.

Izokvercitrin nije ispoljio toksičan efekat prema ćelijama jetre ni u najvišoj testiranoj koncentraciji od $400 \mu\text{g/mL}$ (**Tabela 9**). Izokvercitrin nema toksičan efekat po netumorske ćelije debelog creva u najvišoj testiranoj koncentraciji $150 \mu\text{M}$ odnosno $69,6 \mu\text{g/mL}$ (Amado i sar., 2014). Za izokvercitrin postoje podaci da deluje hemolitički, odnosno da njegova primena može dovesti do citotoksičnih efekata po eritocite čoveka i to u većoj meri nego što to može primena kempferola i kvercetina (Velloso i sar., 2011), te se uprkos negativnim rezultatima citotoksičnih ispitivanja prema različitim ćelijskim linijama njegov uticaj na humane ćelije treba još ispitati.

Rutin nije ispoljio citotoksičan efekat na primarne ćelije jetre (**Tabela 9**) što je potvrđeno i u ispitivanju Matsuo i sar., (2005) na humanim fibroblastima i ćelijama humane umbilikvalne vene, te se donekle može smatrati bezbednim za ljudsku upotrebu. Međutim, za potencijalnu primenu u lečenju ljudi neophodne su *in vivo* studije i klinička ispitivanja. Do sada je rutin bio ispitan u kliničkim studijama kao potencijalni antioksidant (Boyle i sar., 2000) i pokazalo se da nakon tretmana rutinom ne dolazi do značajnijeg poremećaja krvne slike ili normalne funkcije jetre, ali ne dolazi ni do poželjnog antioksidantnog efekta.

Kamfor ne remeti proliferaciju ćelija jetre svinje kada je primenjen u koncentracijama nižim od 400 µg/mL (**Tabela 9**). U studiji Nikolic i sar., (2015) ispoljio je IC₅₀=11 mM (1674 µg/mL) prema ćelijskoj liniji fibroblasta MRC-5. Koncentracije kamfora koje su ispitane u ovim studijama su znatno više od njegove minimalne inhibitorne (125 µg/mL), te se na osnovu dostupnih *in vitro* podataka ona može smatrati bezbednom za upotrebu.

Eukaliptol je ispoljio citotoksičan efekat prema ćelijama jetre sa GI₅₀ od 56 µg/mL, dok je studija Nikolic i sar., (2015) utvrdila IC₅₀ od 11 mM (1697 µg/mL). Eukaliptol, 0,025%, je pokazao značajnu toksičnost prema makrofazima (Zaccaro Scelza i sar., 2006). Uzevši u obzir potencijalnu citotoksičnost eukaliptola prema zdravim ćelijskim linijama kao i prethodno pomenut efekat na efluks pumpe gljive, treba dodatno obratiti pažnju na potencijalna neželjena dejstva koja se mogu javiti kao posledica primene ovog terpena.

Tabela 9. Odabrana jedinjenja i njihove GI₅₀ vrednosti (koncentracija jedinjenja koja dovodi do 50% redukcije rasta ćelija jetre PLP2). Rezultati su izraženi u µg/mL i predstavljaju prosečnu vrednost tri ponavljanja.

Jedinjenje	GI₅₀	Jedinjenje	GI₅₀
MK55	>400	Kvercitrin	73±3
MK94	>400	Izokvercitrin	>400
Apigenin	>400	Rutin	>400
Apigetrin	90±1	Kamfor	>400
Luteolin	>400	Eukaliptol	56±4
Kvercetin	>400	Elipticin	3.22

5. Opšta diskusija

Pojavljivanje novih antifungalnih lekova na tržištu praćeno je višedecenijskim pauzama čime se daje vremena mikroorganizmima da steknu otpornost na iste. Istraživanje i razvoj bilo kog novog leka je težak zadatak, a u slučaju antifungalnih je dodatno otežan time što su i fungalne i humane ćelije eukariotske i time međusobno sličnije. Napredak savremene medicine omogućio je pacijentima sve veću stopu preživljavanja komplikovanih operacija. Usled tretmana tokom operacija, primene različitih lekova i pomoćnih instrumenata dolazi do trajnog slabljenja imuniteta, što ih čini podložnijim fungalnim infekcijama. Procena je i da će se broj osoba starijih od 65 godina do 2060 udvostručiti i da će oni činiti 24% populacije (<https://www.prb.org/aging-unitedstates-fact-sheet/>). Kod ove grupe ljudi zabeleženi su učestaliji slučajevi infekcija *C. albicans*, a češći su i fatalni ishodi kao posledica infekcija, pa će suzbijanje ove gljive u budućnosti verovatno predstavljati još veći problem nego što je danas (Marcos-Zambrano i sar., 2014). Stoga, postoji rastuća potreba da se ubrza razvoj novih antifungalnih strategija kojima bi se sprečila infekcija patogenim mikroorganizmima.

Dosadašnje antifungalne terapije bile su primarno fokusirane na fungicidno ili fungistatsko delovanje u cilju eliminacije patogena. Jedinjenja odabrana za ispitivanje u ovoj doktorskoj disertaciji nisu u tom aspektu konkurentna komercijalnim antifungalnim lekovima, s obzirom da su ispoljila vrednosti MIK i MFK koje su i oko 100 puta veće u odnosu na lekove ketokonazol i amfotericin B. Strukture jedinjenja koja su pokazala najbolju aktivnost (MK56, MK94, luteolin, kvercitrin, izokvercitrin, rutin) mogu se iskoristiti kao osnova za sintezu hemijski sličnih jedinjenja koje bi možda bila efikasnija. Tako je u studiji Kartsev i sar., (2018) na osnovu strukture usnične kiseline, sekundarnog metabolita lišajeva, sintetisano nekoliko derivata koji su imali znatno izraženiji antibakterijski i antifungalni potencijal. Prisustvo *C. albicans* je povezivano i sa drugim bolestima poput Parkinsonove i Alchajmerove, te se odabrana jedinjenja mogu ispitati kao potencijalna pomoć pri ovim komplikovanim stanjima (Epp i Mravec, 2006; Stojkovic i sar., 2018).

Pored dosadašnjih antifungalnih strategija sve se više pažnje poklanja i suzbijanju virulencije *C. albicans*. Kao glavne prednosti ovakvog tretmana ističu se: povećanje broja potencijalnih mesta delovanja čime se povećava i broj mogućih inhibitora;

očuvanje mikrobioma domaćina pošto *C. albicans* nastavlja kolonizaciju mukoze kao komensal; smanjuje se selektivni pritisak koji bi vodio nastanku antimikrobne rezistencije. Ova strategija se još uvek ispituje i po njoj se odabrana jedinjenja mogu koristiti samostalno, u kombinaciji sa konvencionalnim antibioticima, ili kao profilaksa (Pierce i Lopez-Ribot, 2013). Jedan od najproučavanijih faktora virulencije *C. albicans* je njena sposobnost da formira biofilm, a uzevši u obzir njegovu otpornost na antifungalni tretman prevencija formiranja se vidi kao najbolja opcija (Nobile i Johnson, 2015). Od ispitanih jedinjenja, apigetrin, izokvercitrin, apigenin, kvercetin, astragalin, eukaliptol, kamfor, MK56, MK55, ali i ketokonazol mogli su redukovati formiranje biofilma za više od 50% kada su primenjeni u ½ MIK. Ova osobina je od velikog značaja za razvoj potencijalne antivirulentne terapije. Iako su različita jedinjenja do sada ispitana kao inhibitori ove osobine (Liu i sar., 2017; Lee i sar., 2018b), sve se uglavnom završavalo na *in vitro* ispitivanjima. Odabrana jedinjenja treba ispitati i *in vivo* kako bi se potvrdio njihov antibiofilm potencijal i eventualno radilo na njihovom daljem unapređenju. Pored eliminacije biofilma ciljno mesto antifungalne terapije može biti i sprečavanje morfološkog prelaska *C. albicans* u hifalnu formu rasta. U ove svrhe se najčešće koriste “mali” molekuli čija je aktivnost za sada uglavnom ispitana samo *in vitro* (Pierce i Lopez-Ribot, 2013). Apigetrin se izdvojio kao najefikasniji inhibitor formiranja hifa u svim sprovedenim esejima, ukazujući na visok potencijal ovog jedinjenja da bude razvijeno u novi antifungalni terapeutik prirodnog porekla. U većini eseja koji su se ticali sprečavanja virulencije *C. albicans* mogla se primetiti nešto bolja aktivnost flavonoida, a naročito flavonoidnih glikozida, te se i flavonoidni glikozidi koji nisu bili obuhvaćeni ovom disertacijom u budućnosti mogu ispitati.

Pored redukcije faktora virulencije različitim agensima kao novog pristupa antifungalnom tretmanu, postoje i različiti načini za povećanje efikasnosti trenutno dostupne terapije. Gljive poseduju efluks pumpe kojima neke od antifungalnih lekova izbacuju iz ćelije i time im onemogućavaju inhibitorno delovanje. Kombinatorna terapija koji bi obuhvatala inhibitore efluks pumpi zajedno sa komercijalnim antifungalnim lekovima omogućila bi postizanje optimalnog antimikrobnog efekta primenom nižih koncentracija aktivnih agenasa (Holmes i sar., 2016). Tretman apigeninom, apigetrinom i astragalinom smanjuje nivo ekspresije *CDRI*, gena koji kodira za efluks pumpe. Ova tri flavonoida mogu značajno doprineti razvoju novih

pristupa antifungalnoj terapiji, pre čega su neophodna detaljnija *in vivo* ispitivanja kao i eventualne kliničke studije.

Terpeni, kamfor i eukaliptol, dovode do povećanja ekspresije *CDR1*. Tretman eukaliptolom povećava i ekspresiju *CDR2*. Ranije je pokazano (Kofla i sar., 2011) da doksorubicin, lek koji se koristi u terapiji raka, dovodi do porasta ekspresije *CDR1* i *CDR2*. Preporučena je povećana opreznost pri tretmanu fungalnih infekcija zajedno sa hemoterapijom u koju je uključen doksorubicin. Na osnovu rezultata ove studije preporučuje se i povećana opreznost pri korišćenju preparata koji sadrže kamfor ili eukaliptol zajedno sa antifungalnim lekovima, a detaljnije studije su neophodne kako bi se definitivno potvrdio ovaj efekat.

Kako bi se bilo koje jedinjenje koristilo u medicinske svrhe neophodno je poznavati način na koji ostvaruje svoj blagotvorni efekat. Za većinu jedinjenja, čak i onih sa odličnom antimikrobnom aktivnošću, ovi podaci ne postoje (Smiljkovic i sar., 2018). Od jedinjenja testiranih u ovoj doktorskoj disertaciji mehanizam delovanja je potvrđen za MK55. Ovo jedinjenje deluje slično komercijalnim azolnim lekovima, putem inhibicije CYP51, enzima uključenog u biosintezu ergosterola. Pored toga, ono dovodi i do smanjenja nivoa ekspresije gena koji kodira za CYP51, čime dodatno utiče na poremećaj u balansu ergosterola u ćeliji. U odnosu na druga jedinjenja sličnog mehanizma delovanja MK55 ima više minimalne inhibitorne koncentracije i slabiji afinitet vezivanja (**Odeljak 4.7.**). Međutim, visoka selektivnost ovog jedinjenja je značajna prednost pa ono može predstavljati skelet na osnovu kog se mogu razviti efikasniji agensi. Uticaj MK55, kao i rutina, na smanjenje ekspresije *ERG11* može se iskoristi i u prethodno pomenutoj kombinatornoj terapiji. Smanjenjem količine targeta azolnih lekova ova dva jedinjenja mogu povećati efikasnost terapije. Za razliku od njih, izokvercitrin i MK94 doveli su do povećanja ekspresije *ERG11* te se na osnovu toga ne mogu preporučiti kao dodatak terapiji azolnim lekovima.

Mehanizam delovanja je donekle potvrđen i za neke od flavonoida (apigenin, apigetrin i astragalin) i obuhvata narušavanje integriteta ćelijske membrane *C. albicans*. Ovaj efekat flavonoida se uklapa u dosadašnju sliku o njima, gde se kao ciljno mesto njihovog delovanja ćelijska membrana često pominje (Kumar i Pandey, 2013; Tarahovsky i sar., 2014).

Pored visoke efikasnosti potencijalnih terapeutika, za primenu u lečenju ljudi neophodno je i da odabrana jedinjenja nisu toksična. Većina jedinjenja odabranih na osnovu odlične aktivnosti u suzbijanju rasta ili virulencije *C. albicans* nisu pokazala citotoksičnost ili su bila citotoksična u koncentracijama koje su znatno veće od njihovih minimalnih inhibitornih. Za MK55, MK94, apigenin, rutin, kvercetin, izokvercitrin, luteolin i kamfor je utvrđeno da nisu citotoksični prema ćelijskim linijama jetre. Koncentracije apigetrina i kvercitrina koje izazivaju citotoksičan efekat su znatno više od onih koje dovode do antifungalnog efekta pa se i oni mogu smatrati odličnim kandidatima za dalja istraživanja. Jedino je eukaliptol pokazao citotoksičnu aktivnost u koncentraciji koja je manja od antifungalne, te se kao takav ne bi mogao preporučiti za dalja istraživanja i potencijalnu farmaceutsku primenu.

Jedinjenja MK55 i apigetrin su se izdvojila kako na osnovu dobre aktivnosti u suzbijanju rasta *C. albicans* tako i na osnovu sposobnosti da utiču na smanjenje njene virulencije i potencijalnu mogućnost efikasnog kombinovanja sa trenutno dostupnom antifungalnom terapijom. Ova jedinjenja imaju visok potencijal da budu razvijena kao bezbedan dodatak antifungalnoj terapiji ili zaštita od fungalne infekcije. Neophodna su dodatna klinička ispitivanja i *in vivo* studije kako bi se tvrdnje dobijene tokom izrade ove doktorske disertacije potvrdile. Ispitivanjem odabranih jedinjenja stekao se uvid u njihov potencijal za primenu u novim vidovima antifungalne terapije, kako terapije koja bi smanjila virulentnost *C. albicans* tako i potencijalne kombinatorne terapije sa antifungalnim lekovima. Ovom studijom su donekle rasvetljena do sada poprilično ograničena saznanja o mehanizmu delovanja odabranih jedinjenja, a neohodni su i dalji eksperimenti kako bi se stekao detaljniji uvid u potencijal flavonoida, terpena i heterocikličnih estara nitratnih jedinjenja da budu iskorišćeni u terapijske svrhe.

6. Zaključci

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je antifungalna aktivnost 9 flavonoida, 2 terpena i 4 nitratna estra heterocikličnih jedinjenja, sa ciljem pronalaska što efikasnijih terapeutika za lečenje infekcija izazvanih *C. albicans*. Pored uvida u potencijal odabranih jedinjenja da spreče rast *C. albicans* dobijeni su i podaci o njihovoj sposobnosti da utiču na neke od faktora virulencije. Ispitani su mogući mehanizmi kojima odabrana jedinjenja ostvaruju svoj inhibitorni efekat, ali i njihova citotoksičnost kao jedan od neophodnih preduslova za potencijalnu primenu u lečenju ljudi.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- 12 sojeva *C. albicans* izolovanih uz usne duplje pacijenata tokom izrade ove doktorske disertacije osetljivo je na tretman komercijalnim antifungalnim lekovima, ketokonazolom i amfotericinom B;
- Među različitim grupama jedinjenja odabranih za testiranje u ovoj doktorskoj disertaciji najbolja antimikrobna aktivnost zabeležena je za nitratne estre heterocikličnih jedinjenja, potom za flavonoide, dok su terpeni imali nešto slabiji antimikrobni potencijal. Testirana jedinjenja imala su slabiji antifungalni potencijal od ispitanih komercijalnih antifungalnih lekova;
- Od pojedinačnih jedinjenja najizraženija antifungalna aktivnost, pored amfotericina B i ketokonazola, zabeležena je za MK56 = MK94 > luteolin = kvercitrin = izokvercitrin = rutin > apigetrin > MK55 = MK129 > viteksin = kvercetin = astragalin > kamfor > eukaliptol;
- Naj snažnija antibiofilm aktivnost pri koncentraciji od ½ MIK zabeležena je za MK56 > eukaliptol > ketokonazol > apigetrin > izokvercitrin > MK55 > kamfor > apigenin > kvercetin = astragalin > MK129 > viteksin > rutin > luteolin > kvercitrin > MK94 > amfotericin B;
- Najmanje ćelija koje su rasle u hifalnoj formi zabeleženo je nakon tretmana apigetrinom > apigeninom = izokvercitrinom > kamforom > eukaliptolom > MK55 > MK94 = astragalinom > MK56 = kvercetinom > luteolinom > rutinom = MK129 > viteksinom = ketokonazolom > kvercitrinom > amfotericinom B. Među različitim

grupama jedinjenja, flavonoidi su pokazali najbolju aktivnost, dok su jedinjenja sintetskog porekla, a naročito komercijalni antifungalni lekovi, imali znatno slabiji potencijal;

- Najizraženiju aktivnost u smanjenju nivoa RKV u ćelijama *C. albicans* pokazao je rutin > apigetrin = kamfor > apigenin > MK56 > MK94 > MK55 > kvercitrin > luteolin = astragalin > viteksin = kvercetin > MK129 > izokvercitrin. Eukaliptol, ketokonazol i amfotericin B nisu doveli do smanjenja nivoa RKV u ćelijama *C. albicans*;

Najbolji efekat na redukciju RKV u vanćelijskom prostoru zabeležen je nakon tretmana apigetrinom > kvercitrinom > luteolinom = izokvercitrinom = astragalinom > viteksinom > apigeninom > kvercetinom > MK56 > MK94. U ovom eseju jedino su flavonoidi pokazali dobru aktivnost, efekat jedinjenja sintetskog porekla i terpena bio je zanemarljiv;

-Nijedno od testiranih jedinjenja nakon 30 min tretmana nije izazivalo povećanje ekspresije *MDR1*, gena koji je odgovoran za rezistenciju *C. albicans* na lekove;

-Ekspresija *CDR1*, gena koji kodira protein efluks pumpe i povezan je sa rezistencijom na antifungalne lekove, smanjena je nakon tretmana apigeninom, apigetrinom i astragalinom. Ostali flavonoidi doveli su do nešto blažeg smanjenja ekspresije *CDR1*;

- Tretman kamforom i eukaliptolom doveo je do povećanja ekspresije *CDR1*, osobina koja nije poželjna pri odabiru potencijalnih antifungalnih agenasa, te treba obratiti povećanu opreznost pri primeni ovih jedinjenja u različitim farmaceutskim proizvodima;

- Nitratni estri heterocikličnih jedinjenja, kao i komercijalni antifungalni lekovi, ne remete ekspresiju *CDR1*;

- Kamfor i eukaliptol, terpeni koji dovode do povećanja ekspresije *CDR1*, imaju oprečne efekte na ekspresiju *CDR2*, gena koji kodira proteine iste grupe efluksnih pumpi što ukazuje da ova dva terpena deluju na različite nivoe regulacije genske ekspresije;

- Od svih jedinjenja testiranih u ovoj doktorskoj disertaciji jedino je za MK55 utvrđen mehanizam antifungalnog efekta koji podrazumeva inhibiciju CYP51 enzima gljive;

- *In silico* predviđanjima potvrđena je stabilnost i način ostvarivanja interakcija u kompleksu MK55-CYP51;

- Većina jedinjenja nije imala značajniji efekat na ekspresiju *ERG11*. Izokvercitrin i MK94 doveli su do povećanja njegove ekspresije, sugerišući da treba obratiti pojačanu pažnju pri potencijalnoj primeni ovih jedinjenja zajedno sa lekovima iz azolne grupe. Rutin i MK55 doveli su do značajnijeg smanjenja nivoa ekspresije *ERG11*, ukazujući na to da bi potencijalna kombinacija ovih jedinjenja sa antifungalnim lekovima omogućila suzbijanje rasta *C. albicans* koje su rezistentne na azolne lekove;
- Narušavanje integriteta ćelijske membrane *C. albicans* kao jedan od mehanizama delovanja potvrđeno je za apigenin, apigetrin, astragalin;
- MK55, MK94, apigenin, rutin, kvercetin, izokvercitrin, luteolin i kamfor nisu citotoksični prema ćelijskim linijama jetre. Apigetrin i kvercitrin jesu citotoksični u nekoj meri, ali koncentracije koje izazivaju citotoksičan efekat znatno su više od onih koje dovode do antifungalnog. Eukaliptol je jedini od ispitanih jedinjenja citotoksičan u koncentraciji koja je niža od antifungalne, te se njegova primena u lečenju fungalnih infekcija ne preporučuje.

7. Literatura

- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Pa', Il S., Smith, J.C., Hess, B., Lindahl, E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2, 19-25.
- Ahmed, H., Moawad, A., Owis, A., AbouZid, S., Ahmed, O. (2016) Flavonoids of *Calligonum polygonoides* and their cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2119-2126.
- Akins, R.A. (2015) An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 43(4), 285-318.
- Alves, C.T., Ferreira, I.C., Barros, L., Silva, S., Azeredo, J., Henriques, M. (2014) Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future Microbiology*, 9(2), 139-146.
- Amado, N.G., Predes, D., Fonseca, B.F., Cerqueira, D.M., Reis, A.H., Dudenhoefter, A.C., Borges, H.L., Mendes, F.A., Abreu, J.G. (2014) Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth in vitro by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 19; 289(51), 35456-35467.
- Ambrose, A., Robbins, D., Deeds, F. (1952) Comparative Toxicities of Quercetin and Quercitrin. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*. 41(3), 119-122.
- Ammar, O. (2017) *In silico* pharmacodynamics, toxicity profile and biological activities of the Saharan medicinal plant *Limoniastrum feei*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(3), 1-10.
- Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-Ernst, K.I., Lampen, A. (2018) Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(1), 1700447C.
- Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., Corbellino, M. (2016) Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine*, 34, 21-28.
- Araruna, M.K., Brito, S.A., Morais-Braga, M.F., Santos, K.K., Souza, T.M., Leite, T.R., Costa, J.G., Coutinho, H.D. (2012) Evaluation of antibiotic & antibiotic

- modifying activity of pilocarpine & rutin. *Indian Journal of Medical Research*, 135, 252-254.
- Arsenijević VA., Denning DW. (2018) Estimated burden of serious fungal diseases in Serbia. *J Fungi (Basel)*. 25;4(3). pii: E76.
- Arsić Arsenijević V., Otašević S., Janić D., Minić P., Matijašević J., Medić D., Savić I., Delić S., Nestorović Laban S., Vasiljević Z., Hadnadjev M. (2018) *Candida* bloodstream infections in Serbia: First multicentre report of a national prospective observational survey in intensive care units. *Mycoses*, 61(2), 70-78.
- Askari, G., Hajishafiee, M., Ghiasvand, R., Hariri, M., Darvishi, L., Ghassemi, S., Iraj, B., Hovsepian, V. (2013) Quercetin and vitamin C supplementation: effects on lipid profile and muscle damage in male athletes. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(Suppl 1), S58-62.
- Attia, M., Radwan, A.A., Zakaria, A.S., Almutairi, M.S., Ghoneim, S.W. (2013) 1-Aryl-3-(1H-imidazol-1-yl) propan-1-ol esters: synthesis, anti-*Candida* potential and molecular modeling studies. *Chemistry Central Journal*, 25, 7(1), 168.
- Badiee, P., Alborzi, A. (2011) Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A fiveyear study. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(4), 183-188.
- Balan, P.B., Gogineni, S., Kumari, N.S., Shetty, V., Lakshman Rangare, A.L., Castelino, R., Areekat, K.F. (2015) *Candida* carriage rate and growth characteristics of saliva in diabetes mellitus patients: a case-control study. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 9(4), 274-279.
- Barnett J. (2004) A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*, 21, 1141–1193.
- Bar-Yosef, H., Vivanco Gonzalez, N., Ben-Aroya, S., Kron, S. J., and Kornitzer, D. (2017) Chemical inhibitors of *Candida albicans* hyphal morphogenesis target endocytosis. *Scientific Reports*, 7, 5692.
- Bayly C.I., Cieplak P., Cornell W.D., Kollman P.A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges. *The Journal of Chemical Physics*, 97, 10269-10280.
- Becher, R., Wirsal, S.G. (2012) Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 825-840.

- Besbes Hlila, M., Mosbah, H., Majouli, K., Ben Nejma, A., Ben Jannet, H., Mastouri, M., Aouni, M., Selmi, B. (2016) Antimicrobial activity of *Scabiosa arenaria* Forssk. extracts and pure compounds using bioguided fractionation. *Chemistry & Biodiversity*, 13(10), 1262-1272.
- Bondaryk, M., Kurzątkowski, W., Staniszewska, M. (2013) Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy*, 30(5), 293-301.
- Bondonno, N.P., Bondonno, C.P., Blekkenhorst, L.C., Considine, M.J., Maghzal, G., Stocker, R., Woodman, R.J., Ward, N.C., Hodgson, J.M., Croft, K.D. (2018) Flavonoid-rich apple improves endothelial function in individuals at risk for cardiovascular disease: a randomized controlled clinical trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(3), 1700674.
- Bonhomme, J., d'Enfert, C. (2013) *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Current Opinion in Microbiology*, 16(4), 398-403.
- Borhani, D.W., Shaw, D.E. (2012) The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(1), 15-26.
- Boyle, S.P., Dobson, V.L., Duthie, S.J., Hinselwood, D.C., Kyle, J.A., Collins, A.R. (2000) Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(10), 774-782.
- Brito, G.N., Inocêncio, A.C., Querido, S.M., Jorge, A.O., Koga-Ito, C.Y. (2011) *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individuals. *Brazilian Oral Research*, 25(1), 28-33.
- Brown, A.R., Ettefagh, K.A., Todd, D., Cole, P.S., Egan, J.M., Foil, D.H., Graf T.N., Schindler B.D., Kaatz G.W., Cech N.B. (2015) A mass spectrometry-based assay for improved quantitative measurements of efflux pump inhibition. *Plos One*, 11;10(5), e0124814.
- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., Gil, C. (2009) Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics*, 9(20), 4770-4786.
- Calderone, R.A., Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(7), 327-335.

- Campoy, S., Adrio, J. (2017) Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, 133, 86-96.
- Čanković, M., Bokor-Bratić, M. (2010) *Candida albicans* infection in patients with oral squamous cell carcinoma. *Vojnosanitetski Pregled*, 67(9), 766-770.
- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M., Monk, B.C. (2007) *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology*, 153(Pt 10), 3211-3217.
- Chaffin, W.L., López-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martínez, J.P. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 130-180.
- Cheah, H.L., Lim, V., Sandai, D. (2014) Inhibitors of the glyoxylate cycle enzyme ICL1 in *Candida albicans* for potential use as antifungal agents. *PLoS One*, 29;9(4), e95951.
- Chen, W., Vermaak, I., Viljoen, A. (2013) Camphor--a fumigant during the Black Death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon--a review. *Molecules*, 10, 18(5), 5434-5454.
- Chevalier, M., Medioni, E., Prêcheur, I. (2012) Inhibition of *Candida albicans* yeast-hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 7), 1016-1022.
- Chowdhary A, Sharma C, Meis J.F. (2017) *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathogens*, 18; 13(5):e1006290.
- Cincin, Z.B., Unlu, M., Kiran, B., Bireller, E.S., Baran, Y., Cakmakoglu, B. (2014) Molecular mechanisms of quercitrin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer. *Archives of Medical Research*, 45(6), 445-454.
- Cleveland A.A., Farley M.M., Harrison L.H., Stein B., Hollick R., Lockhart S.R., Magill S.S., Derado G., Park B.J., Chiller T.M. (2012) Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clinical Infectious Diseases*, 15;55(10), 1352-1361.
- Coste, A.T., Crittin, J., Bauser, C., Rohde, B., Sanglard, D. (2009) Functional analysis of cis- and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryotic Cell*, 8(8), 1250-1267.

- Coste, A.T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J., Sanglard, D. (2004) TAC1, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryotic Cell*, 3(6), 1639-1652.
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., Dhama, K. (2018) *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128-138.
- Dalleau, S., Cateau, E., Bergès, T., Berjeaud, J.M., Imbert, C. (2008) *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(6), 572-576.
- Daouk, K.D., Dagher, M.S., Sattout, J.E. 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58, 1147–1149.
- Das, M.C., Sandhu, P., Gupta, P., Rudrapaul, P., De, U.C., Tribedi, P., Akhter, Y., Bhattacharjee, S. (2016) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin. *Scientific Reports*, 22(6), 23347.
- Devkate, A.N., Zore, G.B., Karuppayil, S.M. (2005) Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 867-873.
- Dewick P. (2002) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Drugo izdanje, John Wiley Ltd., Engleska.
- Doyle, P.S., Chen, C.K., Johnston, J.B., Hopkins, S.D., Leung, S.S., Jacobson, M.P., Engel, J.C., McKerrow, J.H., Podust, L.M. (2010) A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2480-2488.
- Durrant, J.D., McCammon J.A. (2011) Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, 9(1), 71.
- Eckert, S.E., Mühlischlegel, F.A. (2009) Promoter regulation in *Candida albicans* and related species. *FEMS Yeast Research*, 9(1), 2-15.
- Eicher, T, Hauptmann, S. (2006) *The chemistry of heterocycles: structure, reactions, synthesis, and applications*. 2 ed. Richard AH, Pamela C, Eds. Lippincott Williams and Wilkins, New York.

- Ekins, S., Mestres, J., Testa, B. (2007) *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 9-20.
- Epp, L.M., Mravec, B. (2006) Chronic polysystemic candidiasis as a possible contributor to onset of idiopathic Parkinson's disease. *Bratislavske lekarske listy*, 107(6-7), 227-230.
- Erlund, I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-874.
- EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility). 2002. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis. 7.1. Taufkirchen: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
- Falagas, M.E., Roussos, N., Vardakas, K.Z. (2010) Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e954-966.
- Falcão-Silva, V.S., Silva, D.A., Souza Mde, F., Siqueira-Junior, J.P. (2009) Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). *Phytotherapy Research*, 23(10), 1367-1370.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C.I., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P. (2007) Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 963-969.
- Feinstein, W.P., Brylinski, M. (2015) Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets. *Journal of Cheminformatics*, 15(7), 18.
- Feldman, M., Al-Quntar, A., Polacheck, I., Friedman, M., Steinberg, D. (2014) Therapeutic potential of thiazolidinedione-8 as an antibiofilm agent against *Candida albicans*. *PLoS One*. 5; 9(5), e93225.
- Ferreira, L.G., Dos Santos, R.N., Oliva, G., Andricopulo, A.D. (2015) Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 22; 20 (7), 13384-13421.

- Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., deTakats, P.G., Anderson, D., Baker, J., Kerr, D.J. (1996) Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clinical Cancer Research*, 2(4), 659-668.
- Finkel, J.S., Mitchell, A.P. (2011) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 109-118.
- Fiser, A., Šali, A. (2003) Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods in Enzymology*, 374, 461-491.
- Flowers, S.A., Colón, B., Whaley, S.G., Schuler, M.A., Rogers, P.D. (2015) Contribution of clinically derived mutations in *ERG11* to azole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 450-460.
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A.D., Berman, J., Bennett, R.J. (2008). The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLOS Biology*, 6;6(5), e110.
- Fotopoulou, T., Iliodromitis, E.K., Koufaki, M., Tsoinias, A., Zoga, A., Gizas, V., Pyriochou, A., Papapetropoulos, A., Andreadou, I., Kremastinos, D.Th. (2008) Design and synthesis of nitrate esters of aromatic heterocyclic compounds as pharmacological preconditioning agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 4523-4531.
- Fox, E.P., Nobile, C.J. (2012) A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. *Transcription*, 3(6), 315-322.
- Ganguly, S., Mitchell, A.P. (2011) Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 14(4), 380-385.
- Gao, M., Wang, H., Zhu, L. (2016) Quercetin assists fluconazole to inhibit biofilm formations of fluconazole-resistant *Candida albicans* in *in vitro* and *in vivo* antifungal managements of vulvovaginal candidiasis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(3-4), 727-742.
- García Rodríguez, L.A., Duque, A., Castellsague, J., Pérez-Gutthann, S., Stricker, B.H. (1999) A cohort study on the risk of acute liver injury among users of ketoconazole and other antifungal drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48(6), 847-852.

- Garvey, E.P., Hoekstra, W.J., Moore, W.R., Schotzinger, R.J., Long, L., Ghannoum, M.A. (2015) VT-1161 dosed once daily or once weekly exhibits potent efficacy in treatment of dermatophytosis in a guinea pig model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 1992-1997.
- Gehrke, I.T., Neto, A.T., Pedroso, M., Mostardeiro, C.P., Da Cruz, I.B., Silva, U.F., Ilha, V., Dalcol, I.I., Morel, A.F. (2013) Antimicrobial activity of *Schinus molle* (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 486-491.
- Gonzales, M.A. (2011) Force fields and molecular dynamics simulations. *Collection SFN 12*, 169-200.
- Goto, T., Takahashi, N., Hirai, S., Kawada, T. (2010) Various terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism. *PPAR research*, 483958.
- Gray, K.C., Palacios, D.S., Dailey, I., Endo, M.M., Uno, B.E., Wilcock, B.C., Burke, M.D. (2012) Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2234-2239.
- Grover N.D. (2010) Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. *Indian Journal of Pharmacology*, 42(1), 9-11.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calheta, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M.J., Ferreira, I.C. (2013) Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: a comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry*, 151(2), 718-725.
- Gullon, B., Lu-Chau, T., Moreira, M.T., Lema, J., Eibes, G. (2017) Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 220-235.
- Ha, K.C., White, T.C. (1999) Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 763-768.
- Hadrich, F., Sayadi, S. (2018) Apigenin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells by downregulating PPAR γ and CEBP- α . *Lipids in Health and Diseases*, 17(1), 95.

- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R. (2002) Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, 1, 47(4), 409-443.
- Han S., Hanh Nguyen, T.T., Hur, J., Kim, N.M., Kim, S.B., Hwang, K.H., Moon, Y.H., Kang, C., Chung, B., Kim, Y.M., Kim, T.S., Park, J.S., Kim, D. (2017) Synthesis and characterization of novel astragalin galactosides using β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 103: 59-67.
- Han, Y. (2009) Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, 9(2), 207-211.
- Hargrove, T.Y., Wawrzak, Z., Liu, J., Waterman, M.R., Nes, W.D., Lepesheva, G.I. (2012) Structural complex of sterol 14 α -demethylase (CYP51) with 14 α -methylenecyclopropyl-Delta7-24, 25-dihydrolanosterol. *The Journal of Lipid Research*, 53(2), 311-320.
- Harry, J., Song, J., Lyons, C., White, T. (2002) Transcription initiation of genes associated with azole resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 40, 73-81.
- He, M., Min, J.W., Kong, W.L., He, X.H., Li, J.X., Peng, B.W. (2016) A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 115, 74-85.
- Heilmann, C.J., Sorgo, A.G., Siliakus, A.R., Dekker, H.L., Brul, S., de Koster, C.G., de Koning, L.J., Klis, F.M. (2011) Hyphal induction in the human fungal pathogen *Candida albicans* reveals a characteristic wall protein profile. *Microbiology*, 157(Pt 8), 2297-2307.
- Hendry, E.R., Worthington, T., Conway, B.R., Lambert, P.A. (2009) Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), 1219-1225.
- Hiller, D., Sanglard, D., Morschhäuser, J. (2006) Overexpression of the *MDR1* gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1365-1371.
- Hirota, K., Yumoto, H., Sapaar, B., Matsuo, T., Ichikawa, T., Miyake, Y. (2017) Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), 321-330.

- Hofs, S., Mogavero, S., Hube, B. (2016) Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54(3), 149-169.
- Holler, J.G., Christensen, S.B., Slotved, H.C., Rasmussen, H.B., Gúzman, A., Olsen, C.E., Petersen, B., Mølgaard, P. (2012) Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(5), 1138-1144.
- Holmes A.R., Cardno T.S., Strouse J.J., Ivnitski-Steele I., Keniya M.V., Lackovic K., Monk B.C., Sklar L.A., Cannon R.D. (2016) Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. *Future Medicinal Chemistry*, 8(12), 1485-1501.
- Horinaka, M., Yoshida, T., Shiraishi, T., Nakata, S., Wakada, M., Nakanishi, R., Nishino, H., Matsui, H., Sakai, T. (2005) Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells. *Oncogene*, 3;24(48), 7180-7189.
- Hosseinzadeh, H., Nassiri-Asl, M. (2014) Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of Endocrinological Investigation*, 37(9), 783-788.
- Hostetler, G.L., Ralston, R.A., Schwartz, S.J. (2017) Flavones: food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Advances in Nutrition*, 15;8(3), 423-435.
- Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E.M., Kabała-Dzik, A., Azzimonti, B., Dziedzic, A., Rimondini, L., Wojtyczka, R.D. (2017) Rutin, a quercetin glycoside, restores chemosensitivity in human breast cancer cells. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1529-1538.
- Jacob, R.B., Andersen, T., McDougal, O.M. (2012) Accessible high-throughput virtual screening molecular docking software for students and educators. *PLOS Computational Biology*, 8(5), e1002499.
- Jacobsen, I.D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J.R., Hube, B. (2012) *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(1), 85-93.

- Jain, N., Hasan, F., Fries, B. (2008) Phenotypic switching in fungi. *Current Fungal Infection Reports*, 1, 2(3), 180–188.
- Jeon, J.H., Lee, B.C., Kim, D., Cho, D., Kim, T.S. (2018) Hydrophilic astragalín galactoside induces T helper type 1-mediated immune responses via dendritic cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 11;19(10). pii: E3120.
- Jiang, N., Doseff, A.I., Grotewold, E. (2016) Flavones: From Biosynthesis to Health Benefits. *Plants*, 5(2), 27.
- Johann, S., Mendes, B.G., Missau, F.C., de Resende, M.A., Pizzolatti, M.G. (2011) Antifungal activity of five species of Polygala. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1065-1075.
- Jun, J.E., Lee, H., Ko, H.J., Woo, E.R., Lee, D.G. (2015) Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *BBA-Biomembranes*, 1848(2), 695-701.
- Jun, J.E., Woo, E.R., Lee, D.G. (2016) Isoquercitrin, isolated from *Aster yomena* triggers ROS-mediated apoptosis in *Candida albicans*. *Journal of Functional Foods*, 22, 347-357.
- Kagan, S., Jabbour, A., Sionov, E., Alquntar, A.A., Steinberg, D., Srebnik, M., Nir-Paz, R., Weiss, A., Polacheck, I. (2014) Anti-*Candida albicans* biofilm effect of novel heterocyclic compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), 416-427.
- Kanafani, Z., Perfect, J. (2008) Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), 120-128.
- Kartsev, V., Lichitsky, B., Geronikaki, A., Petrou, A., Smiljkovic, M., Kostic, M., Radanovic, O., Soković M. (2018). Design, synthesis and antimicrobial activity of usnic acid derivatives. *MedChemComm.*, 9, 870-882.
- Kathiravan, M.K., Salake, A.B., Chothe, A.S., Dudhe, P.B., Watode, R.P., Mukta, M.S., Gadhwe, S. (2012) The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(19), 5678-5698.
- Khot, P.D., Suci, P.A., Miller, R.L., Nelson, R.D., Tyler, B.J. (2006) A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and beta-1,6-glucan pathway genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3708-3716.

- Kofla, G., Turner, V., Schulz, B., Storch, U., Froelich, D., Rognon, B., Coste, A.T., Sanglard, D., Ruhnke, M. (2011) Doxorubicin induces drug efflux pumps in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 49(2), 132-142.
- Koufaki, M., Fotopoulou, T., Iliodromitis, E.K., Bibli, S.I., Zoga, A., Kremastinos, D.Th., Andeadou, I. (2012) Discovery of 6-[4-(6-nitroxyhexanoyl)piperazin-1-yl]-9H-purine, as pharmacological post-conditioning agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 5948-5956.
- Kuhn, D.M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, PK., Ghannoum, MA. (2003) Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 506-508.
- Kumar, S., Narasimhan, B. (2018) Therapeutic potential of heterocyclic pyrimidine scaffolds. *Chemistry Central Journal*, 4, 12(1), 38.
- Kumar, S., Pandey, A. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 162750, 1-16.
- Kumar, V., Kaur, K., Gupta, G.K., Sharma, A.K. (2013) Pyrazole containing natural products: synthetic preview and biological significance. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 735-753.
- Kutty S.K., Barraud N., Pham A., Iskander G., Rice S.A., Black D.S., Kumar N. (2013) Design, synthesis, and evaluation of fimbrolide-nitric oxide donor hybrids as antimicrobial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 12;56(23), 9517-9529.
- Lagree, K., Desai, J., Finkel, J., Lanni, F. (2018) Microscopy of fungal biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 100-107.
- Lai, Y.N., Li, Y., Fu, L.C., Zhao, F., Liu, N., Zhang, F.X., Xu, P.P. (2017) Combinations of 1,8-cineol and oseltamivir for the treatment of influenza virus A (H3N2) infection in mice. *Journal of Medical Virology*, 89(7), 1158-1167.
- Lamberti, V., Fosdick, L., Jessup, E. (2002) A hands-on introduction to molecular dynamics. *Journal of Chemical Education*, 79, 5, 601.
- Laprade, D.J., Brown, M.S., McCarthy, M.L., Ritch, J.J., Austriaco, N. (2016) Filamentation protects *Candida albicans* from amphotericin B-induced programmed cell death via a mechanism involving the yeast metacaspase, MCA1. *Microbial Cell*, 3(7), 285-292.

- Lee, H., Woo, E.R., Lee, D.G. (2018a) Apigenin induces cell shrinkage in *Candida albicans* by membrane perturbation. *FEMS Yeast Research*, 18(1), foy003.
- Lee, J., Mitchell, A.E. (2012) Pharmacokinetics of quercetin absorption from apples and onions in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(15), 3874-3881.
- Lee, J.H., Kim, Y.G., Choi, P., Ham, J., Park, J.G., Lee, J. (2018b) Antibiofilm and antivirulence activities of 6-Gingerol and 6-Shogaol against *Candida albicans* due to hyphal inhibition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 28;8:299.
- Lewis, K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007.
- Lexa, K.W., Carlson, H.A. (2012) Protein flexibility in docking and surface mapping. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 45(3), 301-343.
- Li, M., Shi, A., Pang, H., Xue, W., Li, Y., Cao, G., Yan, B., Dong, F., Li, K., Xiao, W., He, G., Du, G., Hu, X. (2014) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of a single ascending dose of baicalein chewable tablets in healthy subjects. *Journal of Ethnopharmacology*, 156, 210-215.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., Shaw, D.E. (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*, 78(8), 1950-1958.
- Liu, R.H., Shang, Z.C., Li, T.X., Yang, M.H., Kong, L.Y. (2017) *In vitro* antibiofilm activity of eucarobustol E against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25, 61(8). pii: e02707-16.
- Liu, T.T., Lee, R.E., Barker, K.S., Lee, R.E., Wei, L., Homayouni, R., Rogers, P.D. (2005) Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2226-2236.
- Lohberger, A., Coste, A.T., Sanglard, D. (2014) Distinct roles of *Candida albicans* drug resistance transcription factors TAC1, MRR1, and UPC2 in virulence. *Eukaryotic Cell*, 13(1), 127-142.
- Love, J.N., Sammon, M., Smereck, J. (2004) Are one or two dangerous? Camphor exposure in toddlers. *Journal of Emergency Medicine*, 27(1), 49-54.

- Lu, Y., Su, C., Liu, H. (2014) *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends in Microbiology*, 22(12), 707-714.
- Lu, Y., Su, C., Wang, A., Liu, H. (2011) Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *PLoS Biology*, 9(7), e1001105.
- Luo, Y., Shang, P., Li, D. (2017) Luteolin: a flavonoid that has multiple cardio-protective effects and its molecular mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 692.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M., Kelly, S. (2002) Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine*, 8(2), 76-81.
- LV, Q.Z., Yan, L., Jiang, Y.Y. (2016) The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. *Virulence*, 17, 7(6), 649-659.
- Ma, J.Q., Luo, R.Z., Jiang, H.X., Liu, C.M. (2016) Quercitrin offers protection against brain injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Food and Function*, 7(1), 549-556.
- Mail, M.H., Himratul-Aznita, W.H., Musa, M.Y. (2017) Anti-hyphal properties of potential bioactive compounds for oral rinse in suppression of *Candida* growth. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31, 989.
- Mamadalieva, N.Z., Herrmann, F., El-Readi, M.Z., Tahrani, A., Hamoud, R., Egamberdieva, D.R., Azimova, S.S., Wink, M. (2011) Flavonoids in *Scutellaria immaculata* and *S. ramosissima* (Lamiaceae) and their biological activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(10), 1346-1357.
- Manoharan, R.K., Lee, J.H., Lee, J. (2017) Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 3, 8, 1476.
- Marcos-Zambrano, L.J., Escribano, P., Sánchez, C., Muñoz, P., Bouza, E., Guinea, J. (2014) Antifungal resistance to fluconazole and echinocandins is not emerging in yeast isolates causing fungemia in a Spanish tertiary care center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), 4565-4572.
- Mark, P., Nilsson, L. (2001) Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. *Journal of Physical Chemistry A*, 105(43), 9954-9960.

- Martins, N., Ferreira, I.C., Barros, L., Silva, S., Henriques, M. (2014) Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia*, 177(5-6), 223-240.
- Martins, N., Ferreira, I.C.F.R., Henriques, M., Silva, S. (2016) *In vitro* anti-Candida activity of *Glycyrrhiza glabra* L. *Industrial Crops and Products*, 83, 81-85.
- Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., Kaneko, T. (2005) Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(2), 253-259.
- Mayer, F., Wilson, D., Hube, B. (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
- McCarthy, M.W., Kontoyiannis, D.P., Cornely, O.A., Perfect, J.R., Walsh, T.J. (2017) Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. *Journal of Infectious Diseases*, 15;216(suppl_3), S474-S483.
- Meller, J. (2001) Molecular Dynamics. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, 1-8.
- Meng, X.Y., Zhang, H.X., Mezei, M., Cui, M. (2011) Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146-157.
- Morici, P., Fais, R., Rizzato, C., Tavanti, A., Lupetti, A. (2016) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by the synthetic lactoferricin derived peptide hLF1-11. *PLoS One*. 30, 11(11), e0167470.
- Morris, G.M., Lim-Wilby, M. (2008) Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*, 443, 365-382.
- Mukhopadhyay, K., Prasad, T., Saini, P., Pucadyil, T.J., Chattopadhyay, A., Prasad, R. (2004) Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), 1778-1787.
- Müller, F.M., Weig, M., Peter, J., Walsh, T.J. (2000) Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(2), 338-340.
- Munz, M., Biggin, P. (2012) JGromacs: a java package for analyzing protein simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(1), 255-259.

- Nabavi, S.F., Braidy, N., Gortzi, O., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Skalicka-Woźniak, K., Nabavi, S.M. (2015) Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Research Bulletin*, 119(Pt A), 1-11.
- Nabavi, S.F., Khan, H., D'onofrio, G., Šamec, D., Shirooie, S., Dehpour, A.R., Argüelles, S., Habtemariam, S., Sobarzo-Sanchez, E. (2018) Apigenin as neuroprotective agent: Of mice and men. *Pharmacological Research*, 128, 359-365.
- Neves, N.A., Carvalho, L.P., De Oliveira, M.A.M., Giraldo, P.C., Bacellar, O., Cruz, Á.A., Carvalho, E.M. (2005) Association between atopy and recurrent vaginal candidiasis. *Clinical & Experimental Immunology*, 142(1), 167–171.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nikolić, B., Vasilijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J. (2015) Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. *Chemico-Biological Interactions*, 5, 242, 263-271.
- Nobile, C.J., Johnson, A.D. (2015) *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual Review of Microbiology*, 69, 71-92.
- Odds, F.C., Bernaerts, R. (1994) CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1923-1929.
- Özçelik, B., Balaban, N., Aksaray, S., Cesur, S., Kaynak, F., Çayirli A. (2006). *In vitro* susceptibility of *Candida* Spp. isolated from clinical specimens against some antifungal agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 1-6
- Ozçelik, B., Kartal, M., Orhan, I. (2011) Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49(4), 396-402.
- Páez, P.L., Becerra, M.C., Albesa, I. (2010) Effect of the association of reduced glutathione and ciprofloxacin on the antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 303, 101-105.

- Pannanusorn, S., Fernandez, V., Römling, U. (2013) Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*, 56(3), 264-272.
- Papada, E., Gioxari, A., Briuedes, V., Amerikanou, C., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., Smyrnioudis, I., Kaliora, A.C. (2018) Bioavailability of terpenes and postprandial effect on human antioxidant potential. An open-label study in healthy subjects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(3). doi: 10.1002/mnfr.201700751.
- Pappas, P.G., Kauffman, C.A., Andes, D.R., Clancy, C.J., Marr, K.A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A.C., Schuster, M.G., Vazquez, J.A., Walsh, T.J., Zaoutis, T.E., Sobel, J.D. (2016) Clinical practice guideline for the management of Candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), 1-50.
- Park, E.J., Kim, Y.M., Kim, H.J., Chang, K.C. (2018) Luteolin activates ERK1/2- and Ca²⁺-dependent HO-1 induction that reduces LPS-induced HMGB1, iNOS/NO, and COX-2 expression in RAW264.7 cells and mitigates acute lung injury of endotoxin mice. *Inflammation Research*, 67(5), 445-453.
- Parker, J.E., Warrilow, A.G., Price, C.L., Mullins, J.G., Kelly, D.E., Kelly, S.L. (2014) Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of Chemical Biology*, 27, 7(4), 143-161.
- Patil, S., Rao, R.S., Majumdar, B., Anil, S. (2015) Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*, 17;6, 1391.
- Pei, J., Dong, P., Wu, T., Zhao, L., Fang, X., Cao, F., Tang, F., Yue, Y. (2016) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for astragalin biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (42), 7966–7972.
- Perez-Vizcaino, F., Fraga, C.G. (2018) Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 15, 646, 107-112.
- Perlroth, J., Choi, B., Spellberg, B. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, 45(4), 321-346.
- Pierce, C.G., Lopez-Ribot, J.L. (2013) Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(9), 1117-1126.

- Podust, L.M., von Kries, J.P., Eddine, A.N., Kim, Y., Yermalitskaya, L.V., Kuehne, R., Ouellet, H., Warriar, T., Alteköster, M., Lee, J.S., Rademann, J., Oschkinat, H., Kaufmann, S.H., Waterman, M.R. (2007) Small-molecule scaffolds for CYP51 inhibitors identified by high-throughput screening and defined by X-ray crystallography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 3915-3923.
- Pollastri, S., Tattini, M. (2011) Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany*, 108(7), 1225-1233.
- Rai Rima, S., Singha, R., Brahma, P., Sanyal, K. (2018) Epigenetic determinants of phenotypic plasticity in *Candida albicans*. *Fungal Biology Reviews*, 32, 10-19.
- Ramachandran, S., Kota, P., Ding, F., Dokholyan, N.V. (2011) Automated minimization of steric clashes in protein structures. *Proteins*, 79(1), 261-270.
- Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., López-Ribot, J.L. (2002) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5459-5463.
- Raut, J.S., Shinde, R.B., Chauhan, N.M., Karuppayil, S.M. (2013) Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 29(1), 87-96.
- Ren, K., Jiang, T., Zhou, H.F., Liang, Y., Zhao, G.J. (2018) Apigenin retards atherogenesis by promoting ABCA1-mediated cholesterol efflux and suppressing inflammation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(5), 2170-2184.
- Riaz, A., Rasul, A., Hussain, G., Zahoor, M.K., Jabeen, F., Subhani, Z., Younis, T., Ali, M., Sarfraz, I., Selamoglu, Z. (2018) Astragalin: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2, 9794625.
- Rodriguez-Garcia, A., Hosseini S., Martinez-Chapa S., Cordell G. (2017) Multi-target activities of selected alkaloids and terpenoids. *Mini-Review in Organic Chemistry*, 14(4), 272-279.
- Roemer, T., Krysan, D.J. (2014) Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1;4(5), pii: a019703.
- Rozman, D., Stromstedt, M., Tsui, L.C., Scherer, S., Waterman, M. (1996) Structure and mapping of the human lanosterol 14 α -demethylase gene (CYP51) encoding

- the cytochrome P450 involved in cholesterol biosynthesis; comparison of exon/intron organization with other mammalian and fungal CYP genes. *GENOMICS*, 38, 371-381.
- Saini M., Kumar A., Dwivedi J., Singh R. (2013) A review: biological significances of heterocyclic compounds. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 4(3), 66-77.
- Salazar-Aranda, R., Granados-Guzmán, G., Pérez-Meseguer, J., González, G.M., de Torres, N.W. (2015) Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*. *Molecules*, 20(10), 17903-17912.
- Salmaso, V., Moro, S. (2018) Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: an overview. *Frontiers in Pharmacology*, 22(9), 923.
- Sanglard, D., Coste, A., Ferrari, S. (2009) Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Research*, 9(7), 1029-1050.
- Sato, T., Kishi, M., Suda, M., Sakata, K., Shimoda, H., Miura, H., Ogawa, A., Kobayashi, S. (2017) Prevalence of *Candida albicans* and non-albicans on the tongue dorsa of elderly people living in a post-disaster area: a cross-sectional survey. *BMC Oral Health*, 17(1), 51.
- Saviuc, C., Gheorghe, I., Coban, S., Drumea, V., Chifiriuc, M.C., Otilia Banu, O., Bezirtzoglou, E., Lazăr, V. (2016) *Rosmarinus officinalis* essential oil and eucalyptol act as efflux pumps inhibitors and increase ciprofloxacin efficiency against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* MDR strains. *Romanian Biotechnological Letters*, 21, 11782–11790.
- Sawant, B., Khan, T. (2017) Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96, 1478-1490.
- Schneider, S., Morschhäuser, J. (2015) Induction of *Candida albicans* drug resistance genes by hybrid zinc cluster transcription factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 558-569.

- Schröter, C., Hipler, U.C., Wilmer, A., Künkel, W., Wollina, U. (2000) Generation of reactive oxygen species by *Candida albicans* in relation to morphogenesis. *Archives of Dermatological Research*, 292, 260–264.
- Scognamiglio, M., Buommino, E., Coretti, L., Graziani, V., Russo, R., Caputo, P., Donnarumma, G., Abrosca, B., Fiorentino A. (2016) Phytochemical investigation and antimicrobial assessment of *Bellis sylvestris* leaves. *Phytochemistry Letters*, 17, 6-13.
- Scorzoni, L., de Paula, E., Silva, A.C., Marcos, C.M., Assato, P.A., de Melo, W.C., de Oliveira, H.C., Costa-Orlandi, C.B., Mendes-Giannini, M.J., Fusco-Almeida, A.M. (2017) Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Frontiers in Microbiology*, 23;8, 36
- Scorzoni, L., Sangalli-Leite, F., de Lacorte Singulani, J., de Paula, E., Silva A. C., Costa-Orlandi CB, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. (2016) Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *Journal of Microbiological Methods*, 123, 68-78.
- Sekita, Y., Murakami, K., Yumoto, H., Hirao, K., Amoh, T., Fujiwara, N., Hirota, K., Fujii, H., Matsuo, T., Miyake, Y. (2017) Antibiofilm and anti-inflammatory activities of *houltuynia cordata* decoction for oral care. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017, 2850947.
- Seo, H.S., Ku, J.M., Choi, H.S., Woo, J.K., Lee, B.H., Kim, D.S., Song, H.J., Jang, B.H., Shin, Y.C., Ko, S.G. (2017) Apigenin overcomes drug resistance by blocking the signal transducer and activator of transcription 3 signaling in breast cancer cells. *Oncology Reports*, 38(2), 715-724.
- Seydi, E., Salimi, A., Rasekh, H.R., Mohsenifar, Z., Pourahmad, J. (2018) Selective cytotoxicity of luteolin and kaempferol on cancerous hepatocytes obtained from rat model of hepatocellular carcinoma: involvement of ROS-mediated mitochondrial targeting. *Nutrition and Cancer*, 70(4), 594-604.
- Shahrokh, K., Orendt, A., Yost, G.S., Cheatham, T.E. 3rd. (2012) Quantum mechanically derived AMBER-compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle. *Journal of Computational Chemistry*, 15;33(2), 119-133.

- Shahzad, M., Sherry, L., Rajendran, R., Edwards, C.A., Combet, E., Ramage, G. (2014) Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(3), 269-273.
- Shankar, E., Goel, A., Gupta, K., Gupta, S. (2017) Plant flavone apigenin: An emerging anticancer agent. *Current Pharmacology Reports*, 3(6), 423-446.
- Shao, J., Zhang, M., Wang, T., Li, Y., Wang, C. (2016) The roles of CDR1, CDR2, and MDR1 in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 984-992.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Sibley, C.M. (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 40-79.
- Shen, M.Y., Sali, A. (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, 15(11), 2507-2524.
- Shukla, S., Gupta, S. (2010) Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical Research*, 27(6), 962-978.
- Šiler, B., Živković, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Nestorović Živković, J., Ćirić, A., Soković, M., Mišić, D. (2014) Centauries as underestimated food additives: antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chemistry*, 147, 367-376.
- Simitsopoulou, M., Chatzimoschou, A., Roilides, E. (2016) Biofilms and Antifungal Susceptibility Testing. *Methods in Molecular Biology*, 1356, 183-197.
- Singh, B.N., Upreti, D.K., Singh, B.R., Pandey, G., Verma, S., Roy, S., Naqvi, A.H., Rawat, A.K. (2015) Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *Candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2153-2168.
- Śledź, P., Cafilisch, A. (2018) Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 48, 93-102.
- Smiljković, M., Kostić, M., Stojković, D., Glamočlija, J., Soković, M. (2018) Could flavonoids compete with synthetic azoles in diminishing *Candida albicans* infections? A comparative review based on in vitro studies. *Current Medicinal Chemistry*, doi: 10.2174/0929867325666180629133218.
- Smiljkovic, M., Matsoukas, M.T., Kritsi, E., Zelenko, U., Golic Grdodolnik, S., Calhelha, R., Ferreira, I., Sankovic-Babic, S., Glamoclija, J., Fotopoulou, T., Koufaki, M., Zoumpoulakis, P., Sokovic, M. (2017b) Nitrate esters of

- heteroaromatic compounds as novel *Candida albicans* CYP51 enzyme inhibitors. *ChemMedChem*, 6, 13(3), 251-258.
- Smiljković, M., Stanisavljević, D., Stojković, D., Petrović, I., Marjanović Vićentić, J., Popović, J., Golič Grdadolnik, S., Marković, D., Sanković-Babić, S., Glamočlija, J., Stevanović, M., Soković, M. (2017a) Apigenin-7-O-glucoside versus apigenin: insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions, *EXCLI journal*, 16, 795-807.
- Spampinato, C., Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Research International*, 2013, 204237.
- Staib, P., Morschhäuser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* - an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50(1), 1-12.
- Stojković D., Kostić M., Smiljković M., Aleksić M., Vasiljević P., Nikolić M., Soković M. (2018) Linking antimicrobial potential of natural products derived from aquatic organisms and microbes involved in Alzheimer's disease - a review. *Current Medicinal Chemistry*, DOI: 10.2174/0929867325666180309103645.
- Stone, N.R., Bicanic, T., Salim, R., Hope, W. (2016) Liposomal Amphotericin B (AmBisome (®)): A review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. *Drugs*, 76(4), 485-500.
- Sulsen, V., Lizzaraga, E., Mamadalieva, N., Lago, J.H. (2017) Potential of terpenoids and flavonoids from Asteraceae as anti-inflammatory, antitumor, and antiparasitic agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 6196198.
- Sun, D., Hurdle, J.G., Lee, R., Lee, R., Cushman, M., Pezzuto, J.M. (2012) Evaluation of flavonoid and resveratrol chemical libraries reveals abyssinone II as a promising antibacterial lead. *ChemMedChem*, 7(9), 1541-1545.
- Sun, L., Liao, K., Wang, D. (2015) Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PLoS One*, 24, 10(2), e0117695.

- Sun, Q., Lu, N.N., Feng, L. (2018) Apigenin inhibits gastric cancer progression through inducing apoptosis and regulating ROS-modulated STAT3/JAK2 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 25, 498(1), 164-170.
- Survay, N.S., Upadhyaya, C.P., Kumar, B., Young, K.E., Yoon D.Y., Park S.W. (2011) New genera of flavonols and flavonol derivatives as therapeutic molecules. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54, 1-18.
- Süzgeç-Selçuk, S., Birteksöz, A.S. (2011) Flavonoids of *Helichrysum chasmolycicum* and its antioxidant and antimicrobial activities. *South African Journal of Botany*, 77(1), 170-174.
- Tang, D., Chen, K., Huang, L., Li, J. (2017) Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(3), 323-330.
- Tang, Y.L., Shi, Y.H., Zhao, W., Hao, G., Le, G.W. (2008) Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1187-1194.
- Tarahovsky, Y.S., Kim, YA., Yagolnik EA., Muzafarov EN3. (2014) Flavonoid-membrane interactions: involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1838(5), 1235-1246.
- Teodoro, G.R., Brighenti, F.L., Delbem, A.C., Delbem, Á.C., Khouri, S., Gontijo, A.V., Pascoal, A.C., Salvador, M.J., Koga-Ito, C.Y. (2015) Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-albicans. *Future Microbiology*, 10(6), 917-927.
- Thatcher GR., Nicolescu AC., Bennett BM., Toader V. (2004) Nitrates and NO release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, 15;37(8), 1122-1143.
- Thoppil, R.J., Bishayee, A. (2011) Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology*, 27, 3(9), 228-249.
- Tortorano, A.M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Grillot, R. 2006. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(5), 359-366.

- Tripoli, E., Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479.
- Trott, O., Olson, A.J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 30;31(2), 455-461.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
- Tsui, C., Kong, E.F., Jabra-Rizk, M.A. (2016) Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018.
- Valentova, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J., Křen, V. (2014) Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267-282.
- van der Kamp, M.W., Shaw, K.E., Woods, C.J., Mulholland, A.J. (2008) Biomolecular simulation and modelling: status, progress and prospects. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(5), Suppl 3, S173-190.
- Vashisth, P., Nikhil, K., Pemmaraju, S., Pruthi, P., Mallick, V., Singh, H. (2013) Antibiofilm activity of quercetin-encapsulated cytocompatible nanofibers against *Candida albicans*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 28(6), 652-665.
- Velloso, J.C.R., Regasini, L.O., Khalil, N.M., da Silva, B.V., Khalil, O.A.K., Manente, F.A., Netto, H.P., de Faria Oliveira, O.M.M. (2011) Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. *Eclética Química*, 36(2), 7-20.
- Verma, A.K., Pratap, R. (2010) The biological potential of flavones. *Natural Product Reports*, 27(11), 1571-1593.
- Vogel, M., Hartmann, T., Köberle, M., Treiber, M., Autenrieth, I.B., Schumacher, U.K. (2008) Rifampicin induces *MDR1* expression in *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), 541-547.
- Wagner, C., Fachinetto, R., Dalla Corte, C.L., Brito, V.B., Severo, D., de Oliveira Costa Dias, G., Morel, A.F., Nogueira, C.W., Rocha, J.B. (2006) Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. *Brain Research*, 1107(1), 192-198.

- Wang X.J., Sui X., Yan L., Wang Y., Cao Y.B., Jiang Y.Y. (2015) Vaccines in the treatment of invasive candidiasis. *Virulence*, 6(4), 309-315.
- Wang, J.S., Yang, Y.L., Wu, C.J., Ouyang, K.J., Tseng, K.Y., Chen, C.G., Wang, H., Lo, H.J. (2006) The DNA-binding domain of CaNdt80p is required to activate CDR1 involved in drug resistance in *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 10), 1403-1411.
- Warrilow, A.G., Hull, C.M., Parker, J.E., Garvey, E.P., Hoekstra, W.J., Moore, W.R., Schotzinger, R.J., Kelly, D.E., Kelly, S.L. (2014) The clinical candidate VT-1161 is a highly potent inhibitor of *Candida albicans* CYP51 but fails to bind the human enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7121-7127.
- Warrilow, A.G., Melo, N., Martel, C.M., Parker, J.E., Nes, W.D., Kelly, S.L., Kelly, D.E. (2010) Expression, purification, and characterization of *Aspergillus fumigatus* sterol 14-alpha demethylase (CYP51) isoenzymes A and B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4225-4234.
- Warrilow, A.G.S., Parker, J.E., Price, C.L., Garvey, E.P., Hoekstra, W.J., Schotzinger, R.J., Wiederhold, N.P., Nes, W.D., Kelly, D.E., Kelly, S.L. (2017) The tetrazole VT-1161 is a potent inhibitor of *Trichophyton rubrum* through its inhibition of *T. rubrum* CYP51. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 61(7), pii: e00333-17.
- Webb, B., Sali, A. (2014) Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current protocols in bioinformatics*. 47(1), 5.6.1-5.6.32.
- Welch, K., Cai, Y., Strømme, M. (2012) A method for quantitative determination of biofilm viability. *Journal of Functional Biomaterials*, 1;3(2), 418-431.
- Whaley, S.G., Berkow, E.L., Rybak, J.M., Nishimoto, A.T., Barker, K.S., Rogers, P.D. (2017) Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*, 12(7), 2173.
- White, T.C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L.F., Stevens, D.A. (2002) Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1704-1713.
- Whiteway, M., Bachewich, C. (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, 61, 529-553.

- Wiederhold, N.P. (2017) Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and Drug Resistance*, 10, 249-259.
- Wilson, D., Naglik, J.R., Hube, B. (2016) The missing link between *Candida albicans* hyphal morphogenesis and host cell damage. *PLoS Pathogens*, 20;12(10): e1005867.
- Xu, J., Hu, Z.Q., Wang, C., Yin, Z.Q., Wei, Q., Zhou, L.J., Li, L., Du, Y.H., Jia, R.Y., Li, M., Fan, Q.J., Liang, X.X., He, C.L., Yin, L.Z. (2014) Acute and subacute toxicity study of 1,8-cineole in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 15, 7(4), 1495-1501.
- Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., Shao, H. (2017) Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell & Bioscience*, 5, 7(50), 1-16.
- Yang, J.T., Wang, J., Zhou, X.R., Xiao, C., Lou, Y.Y., Tang, L.H., Zhang, F.J., Qian, L.B. (2018) Luteolin alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury in the hypercholesterolemic rat via activating Akt/Nrf2 signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1-10.
- Yordanov, M., Dimitrova, P., Patkar, S., Saso, L., Ivanovska, N. (2008) Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in Candida infection. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 435–440.
- Zaccaro Scelza, M.F., Lima Oliveira, L.R., Carvalho, F.B., Côrte-Real Faria, S. (2006) *In vitro* evaluation of macrophage viability after incubation in orange oil, eucalyptol, and chloroform. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 102(3), e24-27.
- Zajdel, S.M., Graikou, K., Głowniak, K., Chinou, I. (2012) Chemical analysis of *Penstemon campanulatus* (Cav.) Willd. antimicrobial activities. *Fitoterapia*, 83(2), 373-376.
- Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A., Zandi, K. (2017) Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of Virology*, 162(9), 2539-2551.
- Zelenko, U., Hodošček, M., Rozman, D., Golič Grdadolnik, S.J. (2014) Structural insight into the unique binding properties of pyridylethanol(phenylethyl)amine inhibitor in human CYP51. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54, 3384-3395.

- Zhao, J. (2015) Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in Plant Sciences*, 20(9), 576-585.
- Zida, A., Bamba, S., Yacouba, A., Ouedraogo-Traore, R., Guiguemdé, R.T. (2017) Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal of Medical Mycology*, 27(1), 1-19.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vale-Silva, L., Silva, M.J., Pinto, E., Salgueiro, L. (2011) Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Her. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 5), 612-618.

Prilog 1. Odluka etičkog odbora

»Zvezdara« - University Medical Center
Office for Human Research Protections I
Zvezdara University Medical Center IRB 1 - Medical, No IRB00009457, IORG0007877
Approved by Federalwide Assurance - FWA00006109

Etički odbor je konstituisan i funkcioniše u skladu sa načelima ICH-GCP i lokalnom zakonskom regulativom.
Dimitrija Tucovića 161, 11000 Belgrade, Serbia
Tel: +381 11 30 88 672, fax: +381 11 30 88 673, e-mail: etikain@mts.rs

Members of the Ethics Board:
Doc. dr Marijana Nedeljković Protić, Gastroenterologist, Chairman LEC
Prof. dr Milica Dekleva, Cardiologist, member
Prof. dr Teodora Beljić-Živković, Endocrinologist, member
Doc. dr Bojan Kovacevic, Surgery, member
Ass. dr Zvezdan Stefanovic, Surgery, member
Zorica Vukičević, Lawyer, external member
Marija Ivanovic, Lawyer, external member
Suzana Nedelkov, Bachelor economist, Secretary LEC

ODLUKA ETIČKOG ODBORA
Izrada doktorske disertacije Marije Smiljković

U **sredu, 26. oktobra 2016.g** održana je sednica Etičkog odbora kojoj su prisustvovali: Doc. dr Marijana Nedeljković Protić, predsednik Etičkog odbora; Prof. dr Teodora Beljić-Živković, član; Prof. Dr Milica Dekleva, član; Doc. Dr Bojan Kovačević, član; Doc. dr Zvezdan Stefanović, član; Zorica Vukičević, dipl prav, član.

Sednici iz opravdanih razloga nije prisustvovala Marija Ivanović, dipl.prav, član.

Zapisničar: dipl.ecc, Suzana Nedelkov, Sekretar Etičkog odbora.

Marija Smiljković, student doktorskih studija Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dostavila je Molbu za odobrenje ispitivanja u cilju izrade doktorske disertacije na temu: „Ispitivanja molekularnih mehanizama delovanja odabranih azola i flavonoidnih i terpenskih jedinjenja na izolate *Candida albicans* iz usne duplje čoveka“.


Uzorci će se uzimati prelaženjem sterilnim brisom preko sluzokože usne duplje pacijenata na Klinici za otorinolaringologiju KBC „Zvezdara“ i biće determinisani prenošenjem na selektivnu podlogu za gajenje u Mikološkoj laboratoriji Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.

Na uvid i razmatranje dostavljena je Saglasnost Načelnika Klinike za ORL, Prof. Dr Radeta Kosanovića, da se navedeno istraživanje može sprovoditi na Klinici za ORL, kao i Informacija za pacijente učesnike i saglasnost pacijenata učesnika ispitivanja.

Lokalni Etički odbor koji je konstituisan i radi po načelima i principima ICH-GCP, predmetno kliničko istraživanje ocenio je etički podobnim i odobrio sprovođenje istog.

Predsednik Etičkog odbora
Doc. dr Marijana Nedeljković Protić

Datum: 26.10.2016.god



BIOGRAFIJA

Marija S. Ivanov (devojačko Smiljković) je rođena 19.08.1989. u Kruševcu. Osnovnu školu završila je u Donjem Ribniku, a Medicinsku školu, smer Farmaceutski tehničar u Kruševcu. Biološki fakultet, smer Molekularna biologija upisala je 2008 godine. Diplomirala je 2012 sa prosečnom ocenom 8,80, a master studije završila je 2013 godine sa prosečnom ocenom 10,00. Doktorske studije upisala je 2013. godine na smeru Molekulrana biologija eukariota na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Od oktobra 2013. je angažovana na projektu „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida“ (ON 173032), kao istraživač pripravnik, a od 29.11.2016 je nastavila angažovanje kao istraživač saradnik u Mikološkoj laboratoriji, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.

Dosadašnji naučno istraživački rad Marije S. Ivanov je iz oblasti mikologije, botanike, mikrobiologije i molekularne biologije. Kao prvi autor/koautor je objavila 17 radova iz kategorije M20 i to: M21 (10), M22 (5), M24 (2) kao i poglavlje kategorije M12/14.

Član je Srpskog društva za molekularnu biologiju, Biohemijskog društva Srbije i Udruženja mikrobiologa Srbije.