

# Antifungalni i antigenotoksični učinci oleuropeina

---

Zorić, Nataša

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:098754>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Nataša Zorić

# **ANTIFUNGALNI I ANTIGENOTOKSIČNI UČINCI OLEUROPEINA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Nataša Zorić

**ANTIFUNGAL AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS  
OF OLEUROPEIN**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Nataša Zorić

# **ANTIFUNGALNI I ANTIGENOTOKSIČNI UČINCI OLEUROPEINA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Ivan Kosalec, izv. prof.

Dr. sc. Siniša Tomić, izv. prof.

Zagreb, 2017



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Nataša Zorić

# **ANTIFUNGAL AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF OLEUROPEIN**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Ivan Kosalec, PhD

Siniša Tomić, PhD

Zagreb, 2017

Rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u suradnim ustanovama: Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković i na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Kosalca i izv. prof. dr. sc. Siniše Tomića.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja znanstvenog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva.

## ZAHVALE

Osobito se zahvaljujem mentorima pod čijim je vodstvom napravljen ovaj rad, izv. prof. dr. sc. Ivanu Kosalcu i izv. prof. dr. sc. Siniši Tomiću, na pomoći u izboru teme doktorskog rada i svim savjetima tijekom provedbe istraživanja i pisanja rada.

Veliko hvala dr. sc. Nevenki Kopjar s Instituta za medicinska istraživanja na susretljivosti i pomoći oko određivanja antigenotoksičnog učinka i apoptoze/nekroze stanica pod utjecajem ispitivanih tvari.

Zahvaljujem se dr. sc. Josipi Vlanić s Instituta Ruđer Bošković na trudu i izdvojenom vremenu prilikom provedbe ispitivanja mehanizama fungicidnog djelovanja oleuropeina i hidrositiosola te izv. prof. dr. sc. Jadranki Vuković Rodriguez sa Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na suradnji i savjetima tijekom testova određivanja antioksidativne aktivnosti.

Djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta hvala na iskazanoj susretljivosti. Također hvala laboratorijskoj tehničarki Štefici Babić na pomoći oko pripreme hranjivih podloga i uzgoja gljivičnih vrsta.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Tomislavu Mašek sa Zavoda za prehranu i dijetetiku životinja Veterinarskog fakulteta na suradnji pri provedbi GC-MS analize modulacije ergosterola i doc. dr. sc. Klari Kraljić sa Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na pomoći oko HPLC analize ekstrakta maslinova lista.

Također zahvaljujem studentima koji su sudjelovanjem u ispitivanjima inhibicije virulentnih čimbenika dali doprinos nastanku ovog rada, Franji Banoviću s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te Ivanu Bobnjariću i Igoru Horvatu s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Hvala i mojoj obitelji koja mi je uvijek pružala veliku podršku.

## **POPIS KRATICA**

ABC transporteri – ATP-vezujući transporteri (engl. ATP Binding Cassette)

ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)diamonijeva sol

ATCC – američka zbirka mikrobnih kultura (engl. American Type Culture Collection)

ATP – adenzin trifosfat

ALT – alanin transaminaza

AST – aspartat transaminaza

BDNF – neurotrofni moždani faktor (engl. Brain-Derived Neurotrophic Factor)

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

CUPRAC – test ispitivanja djelovanja antioksidansa na redukciju Cu(II)-neokuproin kompleksa (engl. Cupric ion-Reducing Antioxidant Capacity)

DAD – detektor s nizom dioda (engl. Diode-Array Detection)

3,4-DHPEA-EDA – dialdehidni oblik 3,4-dihidroksifeniletanol-elenolne kiseline

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DPPH radikal – (1,1-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal

EORTC – Europska organizacija za istraživanje i liječenje raka (engl. European Organisation for Research and Treatment of Cancer)

EUCAST – Europsko povjerenstvo za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

FBS – fetalni goveđi serum (engl. Fetal Bovine Serum)

FIK indeks – indeks frakcijske inhibitorne koncentracije

FRAP – test ispitivanja djelovanja antioksidansa na redukciju Fe(III)-tripiridiltriazin kompleksa (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power)

GC/MS – plinska kromatografija sa spektrometrom masa (engl. Gas Chromatography/Mass Spectrometry)

GlkNAc – N-acetil-D-glukozamin

GPI proteinska sidra – (glikozilfosfatidil-inozitol) proteinska sidra (engl. Glycosylphosphatidylinositol)

HDL – lipoproteini velike gustoće (eng. High-Density Lipoprotein)

HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. Human Immunodeficiency Virus)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography)

HSV – *Herpes simplex* virus



IL – interleukin

LDL – lipoproteini male gustoće (engl. Low-Density Lipoprotein)

LMP – niska točka tališta (engl. Low Melting Point)

LN-18 stanice – stanice glioblastoma (engl. Lymph Node)

LP-LUV – dipalmitoilfosfatidilkolin/linolenska kiselina-unilameralne vezikule (engl. dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid unilamellar vesicles)

MAPK – protein-kinaza aktivirana mitogenom (engl. Mitogen-Activated Protein Kinase)

MCF-7 stanice – stanice adenokarcinoma mliječnih žlijezda (engl. Macrophage Chemotactic Factor)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MPO – mijeloperoksidaza

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

NADPH – nikotinamid-adenindinukleotid-fosfat

NET – neutrofilne izvanstanične „zamke“ (engl. Neutrophil Extracellular Traps)

NFG – živčani faktor rasta (engl. Nerve Growth Factor)

NMP – normalna točka tališta (engl. Normal Melting Point)

PBS – fosfatni pufer (engl. Phosphate Buffered Saline)

PKA – protein kinaza A

ROI – reaktivni međuspojevi kisika (engl. Reactive Oxygen Intermediates)

ROS – reaktivni spojevi kisika (engl. Reactive Oxygen Species)

RNA – ribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomalna RNA

Sap – aspartil-proteaze (engl. Secreted Aspartyl Protease)

TGF – transformacijski faktor rasta (engl. Transforming Growth Factor)

TNF – faktor tumorske nekroze (engl. Tumor Necrosis Factor)

Trolox (analog vitamina E) – 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina

VERO stanice – epitelne stanice bubrega afričkog zelenog majmuna

XTT – 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolij-5-karboksanilid

YNB – kvaščeva bazična podloga s dušikom (engl. Yeast Nitrogen Base)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	9
1.1. OLEUROPEIN	10
1.1.1. Osnovna obilježja masline	10
1.1.2. Sastav <i>Olea europaea</i> i biosinteza sekoiridoida	11
1.1.2.1. Biosinteza i razgradnja oleuropeina	14
1.1.3. Biološki učinci <i>Olea europaea</i>	18
1.1.3.1. Ekstrakt maslinova lista ( <i>O. europaea</i> L., folium)	18
1.1.3.1.1. Antioksidativni i hipolipemički učinci	19
1.1.3.1.2. Antibakterijski i antiviralni učinci	20
1.1.3.1.3. Ostali biološki učinci	21
1.1.3.2. Fenolni spojevi masline - oleuropein i hidroksitirozol	22
1.1.3.2.1. Antioksidativni učinci	22
1.1.3.2.2. Antimikrobni učinci	22
1.1.3.2.3. Ostali biološki učinci	23
1.2. KVASCI	26
1.2.1. Klasifikacija gljiva (Fungi, Mycota) unutar domene Eucarya	26
1.2.2. Osnovna obilježja kvasaca iz koljena askomiceti (Ascomycota)	28
1.2.3. Medicinski značajne gljivice roda <i>Candida</i>	29
1.2.3.1. Epidemiologija	29
1.2.3.2. Vrste kandidoza	31
1.2.3.3. Uzgojne karakteristike vrste <i>C. albicans</i>	32
1.2.4. Oportunistički patogen <i>C. albicans</i>	33
1.2.4.1. Virulentni čimbenici	33
1.2.4.1.1. Polimorfizam	35
1.2.4.1.2. Modulacija morfogeneze	38
1.2.4.1.3. Biofilm – tvorba i mehanizmi rezistencije	40
1.2.4.2. Kalcineurin	45
1.2.4.3. Stvaranje izvanstaničnih hidrolitičkih enzima	46
1.2.4.3.1. Aspartil-proteaze	46
1.2.4.3.2. Fosfolipaze i lipaze	47
1.2.5. Mehanizmi imunološkog odgovora na kandidoze	48
1.2.6. Antimikotici i mehanizam njihovog djelovanja	52

<b>2.</b>	<b>OBRAZLOŽENJE TEME</b>	57
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE</b>	60
3.1.	ANALIZA POLIFENOLA U EKSTRAKTU MASLINOVA LISTA HPLC METODOM	62
3.2.	ISPITIVANJE ANTIFUNGALNOG UČINKA NA VRSTI <i>C. ALBICANS</i>	63
3.2.1.	TESTOVI ISPITIVANJA DJELOVANJA NA GLJIVIČNU VIJABILNOST	63
3.2.1.1.	Određivanje antimikrobnog učinka metodom mikrodilucije	63
3.2.1.2.	Određivanje antimikrobnog učinka metodom bojanja s tripan plavom	64
3.2.1.3.	Određivanje kinetike stanične smrti vrste <i>C. albicans</i> („time-kill“ metoda)	65
3.2.1.4.	Određivanje apoptoze/nekroze uslijed gubitka membranskog integriteta stanica vrste <i>C. albicans</i>	65
3.2.1.5.	Ispitivanje antimikrobnog djelovanja u kombinaciji s antimikotikom	66
3.2.2.	TESTOVI ISPITIVANJA DJELOVANJA NA VIRULENTNE ČIMBENIKE VRSTE <i>C. ALBICANS</i> u uvjetima <i>in vitro</i>	67
3.2.2.1.	Ispitivanje inhibicije germinacije	67
3.2.2.2.	Modulacija površinske stanične hidrofobnosti (CSH)	68
3.2.2.3.	Ispitivanje učinka na stvaranje biofilma vrste <i>C. albicans</i>	69
3.2.2.4.	Inhibicija aktivnosti gljivičnih hidrolitičkih enzima	69
3.2.2.4.1.	Inhibicija aktivnosti aspartil-proteaza (Sap)	69
3.2.2.4.2.	Inhibicija aktivnosti $\alpha$ -glukozidaza	71
3.2.3.	ISPITIVANJE MEHANIZAMA FUNGICIDNOG DJELOVANJA OLEUROPEINA I HIDROKSITIROSOVA	72
3.2.3.1.	Modulacija sadržaja membranskog ergosterola	72
3.2.3.1.1.	Određivanje ergosterola spektrofotometrijskom metodom	72
3.2.3.1.2.	Određivanje ergosterola GC/MS metodom	73
3.2.3.2.	Modulacija permeabilnosti stanične membrane	73
3.2.3.3.	Modulacija sadržaja 1,3- $\beta$ -D-glukana u staničnoj stijenci	74
3.2.3.4.	Modulacija hitina u staničnoj stijenci	75
3.2.3.5.	Depolarizacija mitohondrijskog membranskog potencijala	76
3.3.	ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA NA VRSTE RODA <i>LACTOBACILLUS</i> u uvjetima <i>in vitro</i>	77
3.4.	ISPITIVANJE ANTIGENOTOKSIČNOG UČINKA KOMETNIM TESTOM	78

3.5.	ISPITIVANJE HEMOLITIČKIH UČINAKA	81
3.6.	ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	82
3.6.1.	Određivanje antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom	82
3.6.2.	Redukcija metalnih iona FRAP metodom	82
3.6.3.	Redukcija metalnih iona CUPRAC metodom	83
3.7.	STATISTIČKA OBRADA	84
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>85</b>
4.1.	ANALIZA POLIFENOLA U EKSTRAKTU MASLINOVA LISTA HPLC METODOM	86
4.2.	ISPITIVANJE ANTIFUNGALNOG UČINKA NA VRSTI <i>C. ALBICANS</i>	87
4.2.1.	TESTOVI ISPITIVANJA DJELOVANJA NA GLJIVIČNU VIJABILNOST	87
4.2.1.1.	Određivanje antimikrobnog učinka metodom mikrodilucije	87
4.2.1.2.	Određivanje antimikrobnog učinka metodom bojanja s tripan plavom	88
4.2.1.3.	Određivanje kinetike stanične smrti vrste <i>C. albicans</i> („time-kill“ metoda)	89
4.2.1.4.	Određivanje apoptoze/nekroze uslijed gubitka membranskog integriteta stanica vrste <i>C. albicans</i>	90
4.2.1.5.	Ispitivanje antimikrobnog djelovanja u kombinaciji s antimikotikom	93
4.2.2.	TESTOVI ISPITIVANJA DJELOVANJA NA VIRULENTNE ČIMBENIKE VRSTE <i>C. ALBICANS</i> u uvjetima <i>in vitro</i>	93
4.2.2.1.	Ispitivanje inhibicije germinacije	93
4.2.2.2.	Modulacija površinske stanične hidrofobnosti	97
4.2.2.3.	Ispitivanje učinka na stvaranje biofilma vrste <i>C. albicans</i>	98
4.2.2.4.	Inhibicija aktivnosti gljivičnih hidrolitičkih enzima	99
4.2.2.4.1.	Inhibicija aktivnosti aspartil-proteaza (Sap)	99
4.2.2.4.2.	Inhibicija aktivnosti $\alpha$ -glukozidaza	101
4.2.3.	ISPITIVANJE MEHANIZAMA FUNGICIDNOG DJELOVANJA OLEUROPEINA I HIDROKSITIROSOVA	102
4.2.3.1.	Modulacija sadržaja membranskog ergosterola	102
4.2.3.1.1.	Određivanje ergosterola spektrofotometrijskom metodom	102
4.2.3.1.2.	Određivanje ergosterola GC/MS metodom	106
4.2.3.2.	Modulacija permeabilnosti stanične membrane	109
4.2.3.3.	Modulacija sadržaja 1,3- $\beta$ -D-glukana u staničnoj stijenci	111
4.2.3.4.	Modulacija hitina u staničnoj stijenci	112

4.2.3.5.	Depolarizacija mitohondrijskog membranskog potencijala	113
4.3.	ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA NA VRSTE RODA <i>LACTOBACILLUS</i> u uvjetima <i>in vitro</i>	114
4.4.	ISPITIVANJE ANTIGENOTOKSIČNOG UČINKA KOMETNIM TESTOM	116
4.5.	ISPITIVANJE HEMOLITIČKIH UČINAKA	132
4.6.	ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	133
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b>	135
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	151
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b>	155
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK</b>	186
<b>9.</b>	<b>SUMMARY</b>	188
<b>10.</b>	<b>PRILOZI</b>	191
<b>11.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	234
<b>12.</b>	<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTARY CARD</b>	237

## **1. UVOD**

## 1.1. Oleuropein

### 1.1.1. Osnovna obilježja masline

Maslina (*Olea europaea* L.) je vrsta iz porodice Oleaceae. U ovu porodicu ubraja se 25 rodova i 600 vrsta raširenih diljem svijeta. Rodu *Olea* pripada 30 vrsta uključujući *O. europaea* koja sadrži 6 podvrsta. Među navedene podvrste ubraja se i mediteranska podvrsta *O. europaea* ssp. *europaea* koja uključuje divlju maslinu (odlika *sylvestris*) i kultivirani oblik (odlika *europaea*). Prema morfološkim obilježjima imenovano je oko 2600 kultivara/subkultivara koji se razlikuju veličinom i oblikom ploda, sadržajem ulja i prilagodljivošću na različite uvjete rasta (Kailis, 2017).

Divlja maslina raste kao grm, rjeđe kao stablo i raširena je po cijelom Sredozemlju. Kultivirana maslina ima karakteristično nepravilno, razgranato stablo, visine do 10 m. Listovi masline su kožasti, ovalni, s donje strane srebrnasti (Slika 1). Bijeli cvjetovi skupljeni su u metlicama i cvatu u razdoblju od svibnja do polovice lipnja, a plod dozrijeva od listopada do veljače, ovisno o odlici i klimatskim prilikama. Zreli plod je tamnoplava do crna koštunica bogata uljem (15 do 30 %) (Hrvatska enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, 2017).

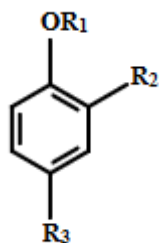


**Slika 1.** Maslina *Olea europaea* ssp. *europaea* (Anonimno, 2017).

### 1.1.2. Sastav vrste *O. europaea* i biosinteza sekoiridoida

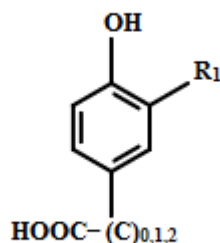
Fitokemijskom analizom vrste *O. europaea* utvrđena je prisutnost flavonoida, flavonskih glikozida, flavanona, iridoida, iridanskih glikozida, sekoiridoida, sekoiridoidnih glikozida, triterpena, bifenola, derivata benzoatne kiseline, ksilitola, sterola, izokromana, ugljikohidrata i manji udio drugih sekundarnih metabolita. Fenolni spojevi, flavonoidi, sekoiridoidi i sekoiridoidni glikozidi prisutni su u gotovo svim dijelovima vrste *O. europaea* (Hashmi i sur., 2015) (Slika 2).

Čimbenici poput varijeteta, zrelosti ploda, agronomskih uvjeta i tehnološkog postupka u proizvodnji maslinovog ulja mogu imati utjecaj na sastav pojedinih spojeva (Fernández-Mar i sur., 2012).



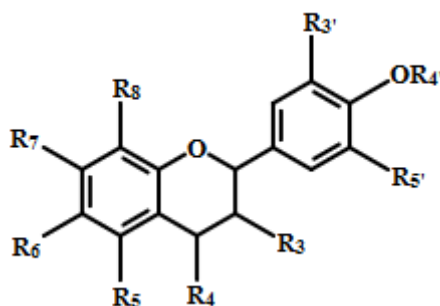
#### Jednostavni fenoli

$R_1 = \text{H, CH}_3, \text{glukoza}$   
 $R_2 = \text{H, OH, CH}_3, \text{OCH}_3$   
 $R_3 = \text{CHO, (CH}_2)_n\text{Z}$   
 $n = 0-2$

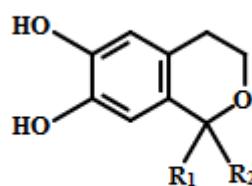


#### Fenolne kiseline

$C_0 = \text{benzoatna kiselina}$   
 $\text{CH}_2 = \text{feniloctena kiselina}$   
 $\text{CHCH}_2 = \text{cinamična kiselina}$

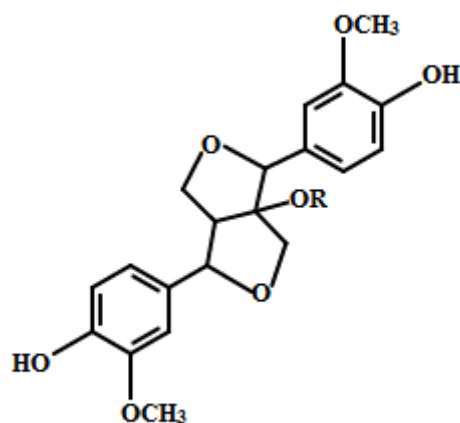


#### Flavonoidi

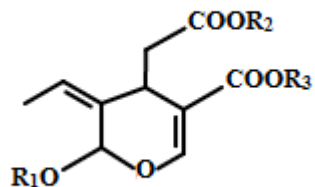


#### Izokromani





**Lignani**

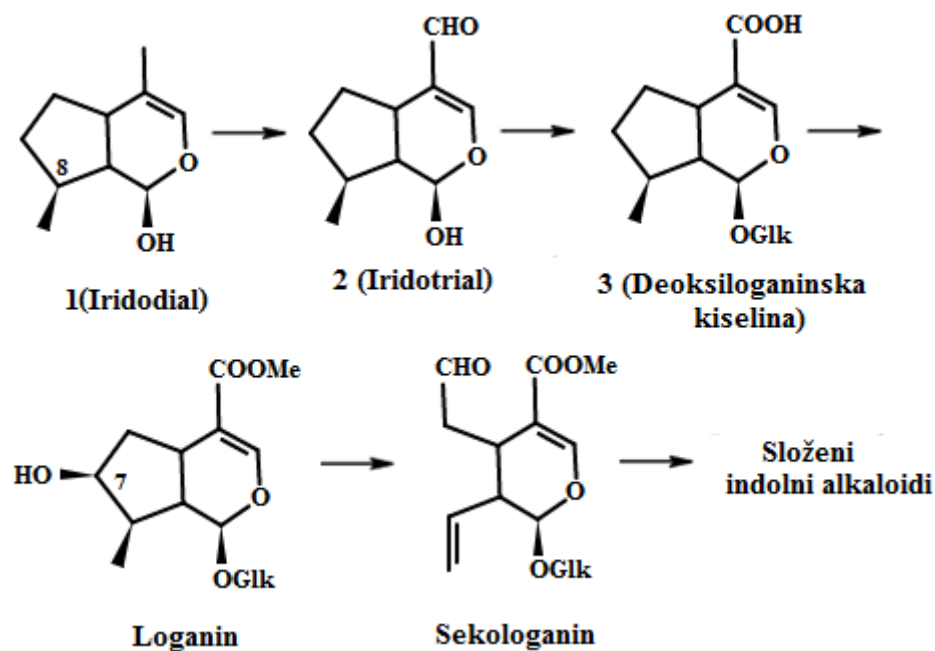


**Sekoiridoidi**

**Slika 2.** Različite vrste fenolnih spojeva u maslinovom ulju (Obied i sur., 2012).

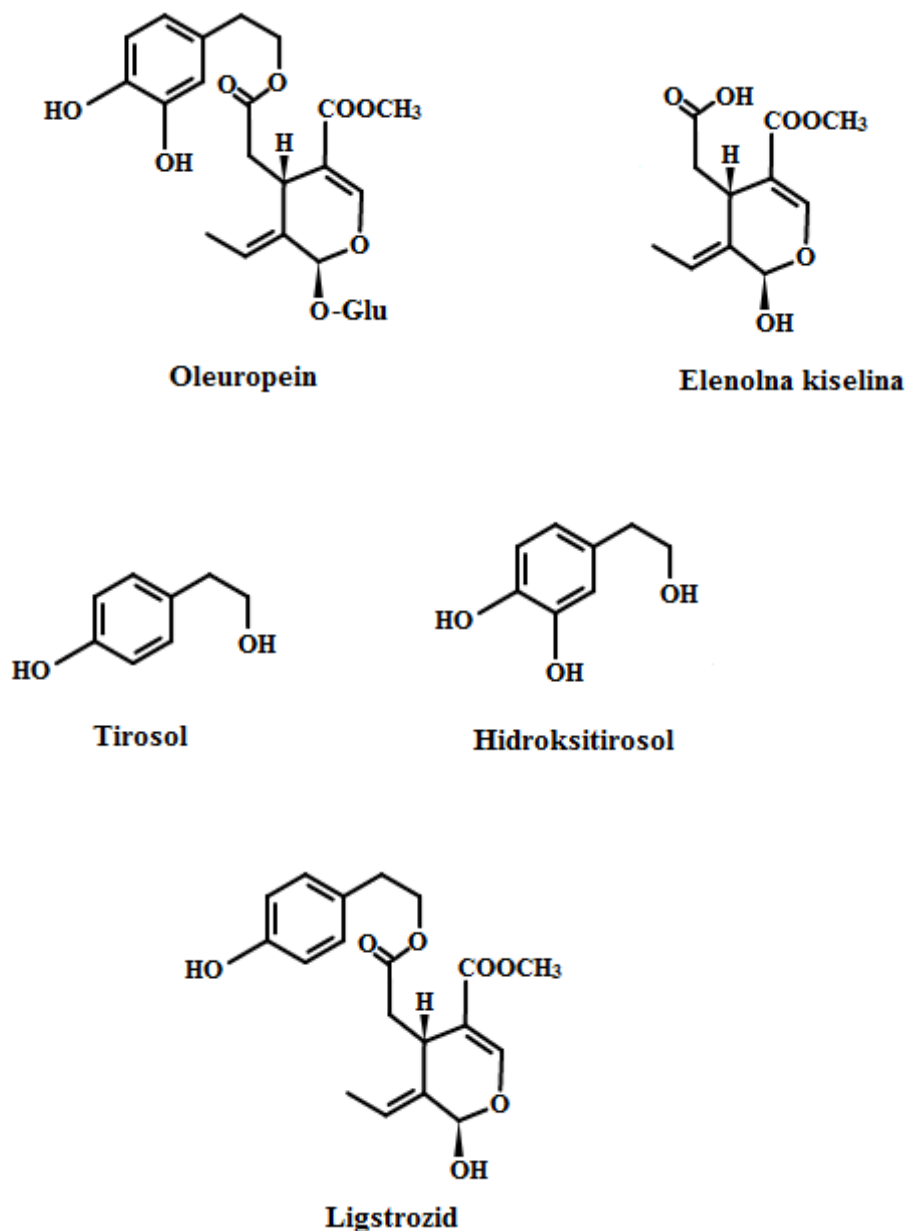
U porodici hrvatskih Oleaceae i kod mnogih drugih biljaka zastupljeni su u velikom udjelu iridoidi. Oleaceae vrste sadrže iridoide koji nastaju biosintezom deksiloganinske kiseline iz iridodiala preko iridotriala. Većina iridoida u porodici Oleaceae su sekoiridoidi potekli od deksiloganinske kiseline kao međuprodukta, s mnogim sekoiridoidima nastalim tzv. rutom 1 (Jensen i sur., 2002) preko loganina i sekologanina (Slika 3).

Postoji najmanje pet različitih podrta unutar ove porodice s grananjima od deksiloganinske kiseline. Različiti putevi biosinteze se vežu za različite rodove ali je put sinteze deksiloganinske kiseline zajedničko obilježje za vrste porodice Oleaceae (Damtoft i sur., 1995). Sekoiridoidi s egzocikličkom 8,9-olefinskom funkcionalnošću se nazivaju oleozidnim sekoiridoidima ili oleozidima.



**Slika 3.** Biosintetski put tzv. ruta 1 (Jensen i sur., 2002) do zajedničkog prekursora deoksiloganinske kiseline.

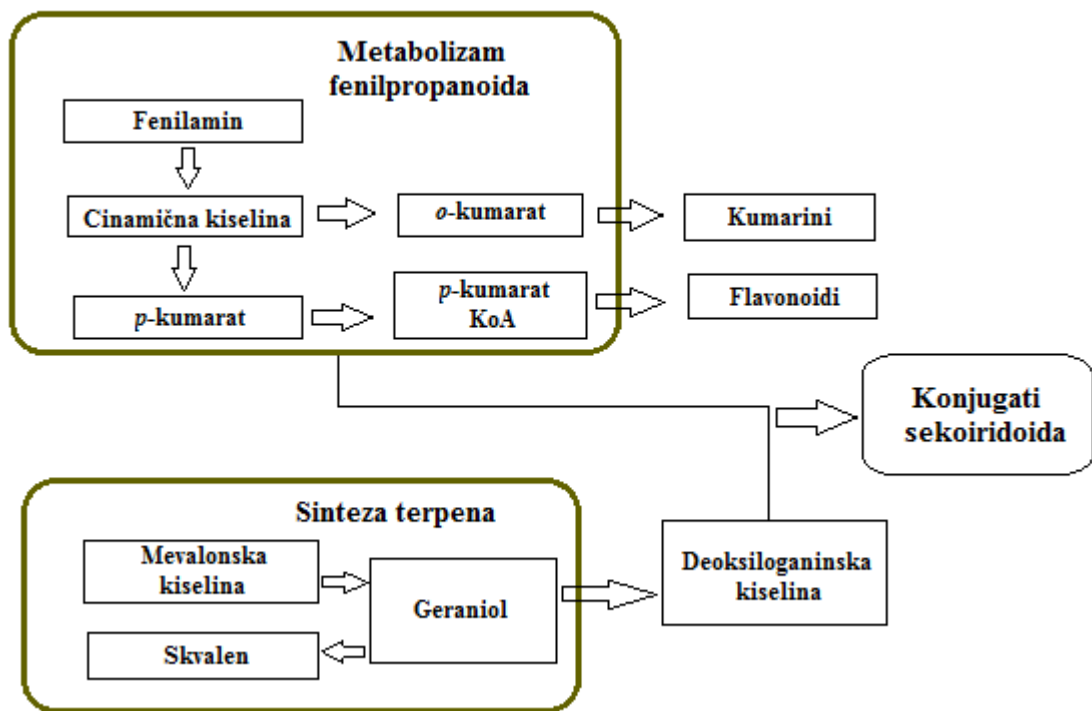
Oleozidi imaju nekoliko fenolnih konjugata jedinstvenih za Oleaceae biljke. Ključni međuprodukt u biosintezi većine oleozida je 7-epi-loganin/7-epiloganinska kiselina (Jensen i sur., 2002; Franzyk i sur., 2002). Najznačajniji oleozidi u vrsti *Olea europaea* su oleuropein i ligstrozid. Oleuropein je ester elenolne kiseline i 2-(3,4-dihidroksifenil)etanola (hidroksitirosola), a ligstrozid je ester elenolne kiseline i 2-(4-hidroksifenil)etanola (tirozol). Oleuropein je, osim kod roda *Olea* prisutan i u mnogim drugim rodovima iz porodice Oleaceae, uključujući vrste *Fraxinus excelsior* (Damtoft i sur., 1993), *F. chinensis* (Kuwajima i sur., 1992), *Syringa josikaea*, *S. vulgaris* (Damtoft i sur., 1993), *S. dilatata* (Oh i sur., 2003), *Ligustrum ovalifolium* (Damtoft i sur., 1993), *Jasminum polyanthum* (Tanahashi i sur., 1996) i *Osmanthus asiaticus* (Sugiyama i sur., 1993).



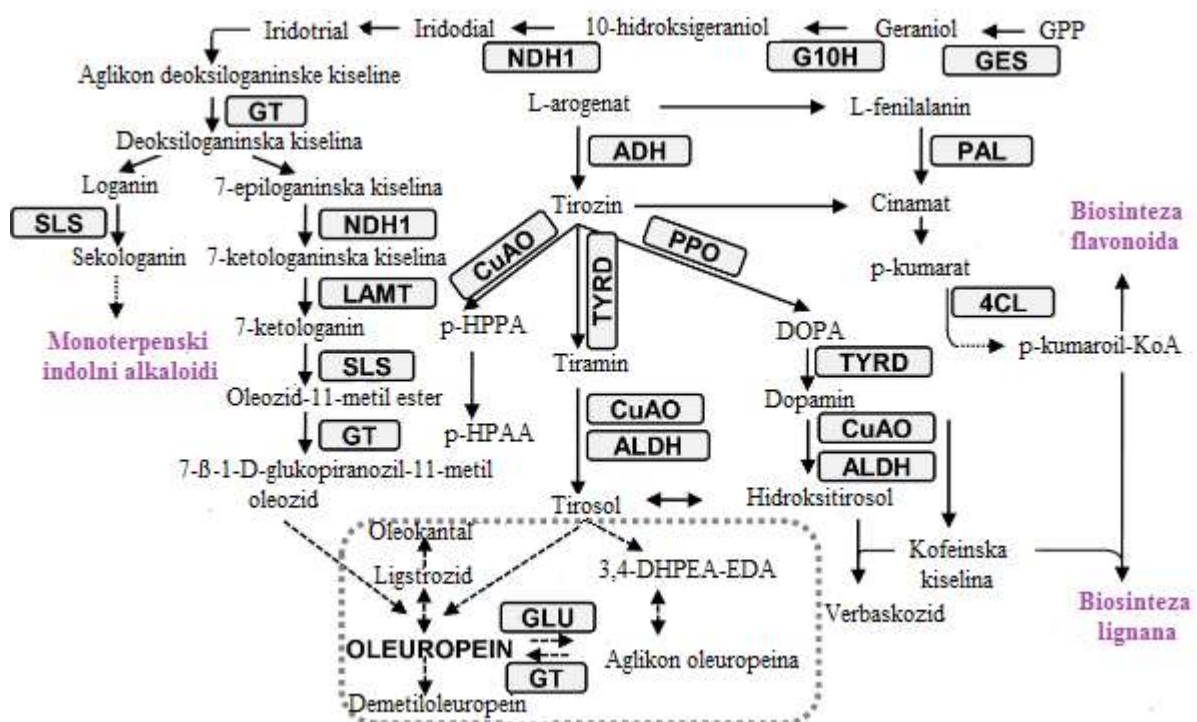
**Slika 4.** Strukture fenola prisutnih u maslinama i maslinovom ulju.

#### 1.1.2.1. Biosinteza i razgradnja oleuropeina

Sekoiridoidi nastaju sekundarnim metabolizmom terpena kao prekursora različitih indolnih alkaloida i potječu iz acetatnog/mevalonatnog biosintetskog puta (Gariboldi i sur., 1986). Sekoiridoidni konjugati poput oleuropeina sadrže esterificirani fenolni dio molekule koji nastaje kao rezultat grananja u putu mevalonske kiseline spajanjem sinteze terpena (oleozidni dio molekule) i fenilpropanoidnog metabolizma (fenolni dio molekule) (Slike 5 i 6).



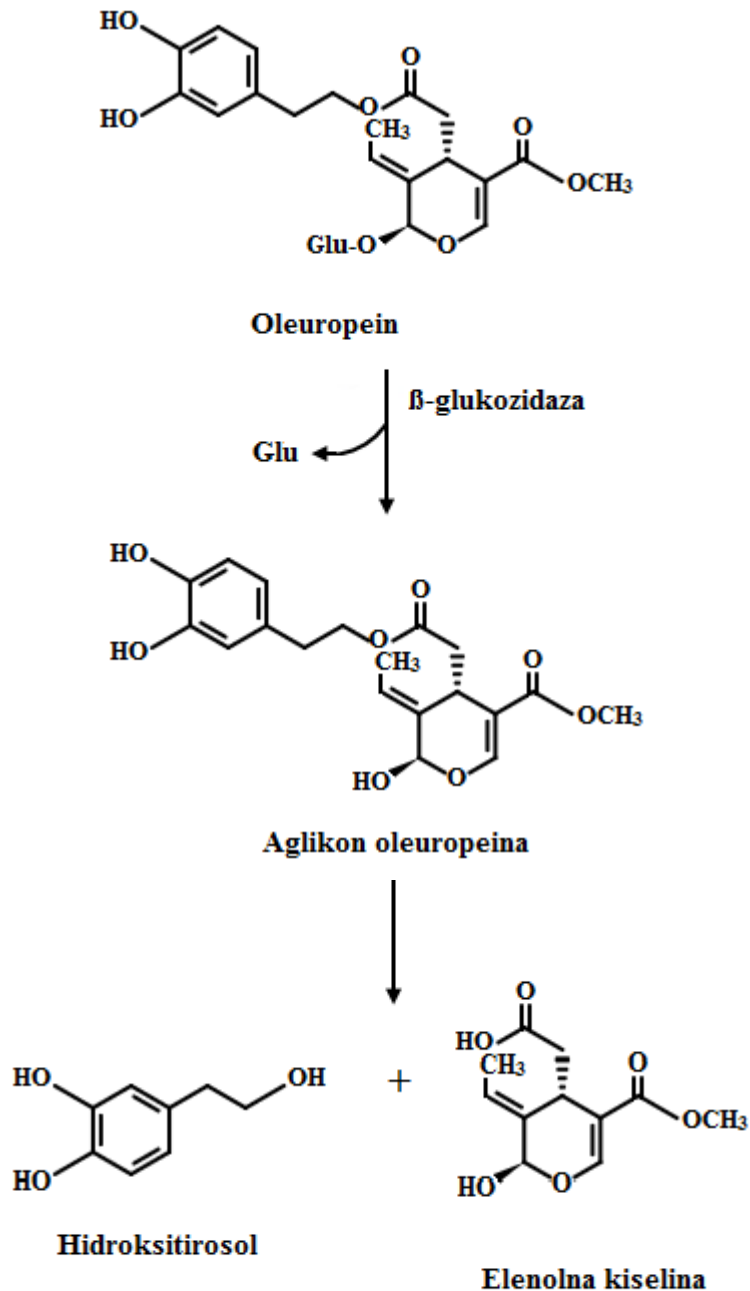
Slika 5. Shematski prikaz nastanka sekoiridoidnog konjugata (Goulas i sur., 2012).



Slika 6. Predloženi biosintetski put nastanka oleuropeina kod Oleaceae (Alagna i sur., 2012).

Koncentracija oleuropeina je relativno visoka u nezrelim plodovima nekih kultivara vrste *Olea europaea* tijekom faze rasta, a smanjuje se zrenjem ploda (Limirol i sur., 1995; Bianco i sur., 2003; Amiot i sur., 1989; Amiot i sur., 1986.). Smanjenje koncentracije može biti povezano s promjenom fenolnih dijelova molekule i prelaskom u nove konjugate, ali se smatra da se ipak događa značajnija razgradnja molekule budući da je utvrđeno nakupljanje demetiloleuropeina i glukozida elenolne kiseline (Amiot i sur., 1989). Ryan i sur. (2003) su utvrdili da je u sezoni visokog prinosa plodova masline, koncentracija oleuropeina i verbaskozida bila u porastu sa sazrijevanjem plodova. Navedeni porast je bio obrnuto proporcionalan s koncentracijom 3,4-DHPEA-EDA u pulpi ploda i u listu masline. U sezoni niskog prinosa, koncentracija oba spoja u pulpi ploda je opadala sa sazrijevanjem plodova što je bilo u skladu s drugim literaturnim podacima. Autori su zaključili da dva izomera nisu u ravnoteži te da se ne odvija konverzija oleuropeina koji je ujedno uvijek u višoj koncentraciji u usporedbi s oleurozidom. U maslinovu listu ustanovljen je porast koncentracije oleuropeina i oleurozida u sezoni visokog prinosa maslina u usporedbi s niskim koncentracijama navedenih spojeva utvrđenih u sezoni niskog prinosa maslina (Ryan i sur., 2003).

Razgradnju oleuropeina i srodnih spojeva do glukozida elenolne kiseline ili demetiloleuropeina, koja su oba utvrđena u zrelim maslinama, kataliziraju specifične endogene esteraze (Capozzi i sur., 2000). Alternativno, aktivacijom endogenih  $\beta$ -glukozidaza tijekom drobljenja i malaksacije može nastati aglikon iz glikozida (Servili i sur., 2004) (Slika 7).



**Slika 7.** Razgradnja oleuropeina posredstvom enzima  $\beta$ -glukozidaze (Servili i sur., 2004).

3,4-DHPEA-EDA je jedan od najzastupljenijih oleozida u djevičanskom maslinovom ulju i nus produktima masline. Iako je poznato da 3,4-DHPEA-EDA nastaje iz demetiloleuropeina posredstvom enzima, mehanizam stvaranja navedenog spoja još nije razjašnjen (Loscalzo i Scarpati, 1993). Hidrolizom oleuropein glikozida posredstvom enzima  $\beta$ -glukozidaza nastaje dialdehidni oblik oleuropein aglikona (Bianco i sur., 1999). Prema Rovellini i Cortesi (2002), utvrđeno je da djevičansko maslinovo ulje sadrži male

količine dialdehidnog oblika oleuropein aglikona kao potencijalnog derivata hidrolize oleuropeina, dok je nazastupljeniji spoj bio 3,4-DHPEA-EDA. Moguće je da je prisutni 3,4-DHPEA-EDA nastao enzimskom hidrolizom demetiloleuropeina (Loscalzo i Scarpati, 2002). Pretpostavlja se i da enzimska pretvorba oleuropeina u 3,4-DHPEA-EDA uključuje aktivnost metilesteraza (Servili i sur., 2004). Također, tehnološki postupak poput malaksacije na oleozidnim konjugatima može utjecati na stvaranje različitih izomera. Na krajnji sastav derivata sekoiridoida u maslinovom ulju utječe aktivnost  $\beta$ -glukozidaza, peroksidaza te polifenoloksidaza (Obied i sur., 2008). Udio iridoida u maslinovom ulju opada tijekom skladištenja (Gomez-Alonso i sur., 2007), a osim antioksidativne aktivnosti na njihovu razgradnju utječu i hidrolitičke reakcije (Lavelli i sur., 2006).

### 1.1.3. Biološki učinci vrste *Olea europaea*

#### 1.1.3.1. Ekstrakt maslinova lista (*O. europaea* L., folium)

Maslinovo lišće i ekstrakt dobiven od listova biljke maslina koriste se u komplementarnoj i alternativnoj medicini zbog svojih brojnih bioloških učinaka (Sudjana i sur., 2009). Prema povijesnim izvorima, početkom 19. stoljeća španjolski liječnici su propisivali primjenu maslinovog lišća za liječenje vrućice („febrifuga“), a postoje i izvori da su maslinovo lišće za liječenje vrućice koristili („intermittent fever“) i francuski zdravstveni djelatnici (French Officers de Santé) tijekom španjolskog rata 1808. – 1813. god. Ova metoda liječenja često se primjenjivala i u Engleskoj za liječenje bolesnih Britanaca koji su boravili u tropskim kolonijama (Chinou, 2011). Smatralo se da je ključni sastojak odgovoran za liječenje gorka tvar prisutna u lišću (Cruess i Alsberg, 1934; Samuelsson i sur., 1951; Veer i sur., 1957). Početkom 20 stoljeća Bourquelot i Vintilesco su otkrili da je u maslinovom lišću prisutan oleuropein, spoj koji je odgovoran za gorki okus ovog lišća. Panizzi i sur. su utvrdili 1960. god. strukturu ovog heterozidnog estera elenolne kiseline i dihidroksifeniletanola čija je empirijska formula  $C_{25}H_{32}O_{13}$  (Chinou, 2011).

U maslinovom listu najzastupljeniji spojevi, uz oleuropein, su hidroksitirozol, tirozol, kofeinska kiselina, p-kumarinska kiselina, vanilinska kiselina, vanilin, luteolin, diosmetin, rutin, verbaskozid, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid i diosmetin-7-glukozid (Bianco i Uccella, 2000; Tasioula-Margari i Ologeri, 2001). U literaturi su opisani antioksidativni i antimikrobni učinci ekstrakta maslinova lista koji se pripisuju

visokom udjelu fenolnih spojeva (Skerget i sur., 2005; Sudjana i sur., 2009; Lee i Lee, 2010).

#### 1.1.3.1.1. Antioksidativni i hipolipemički učinci

Višak slobodnih radikala može uzrokovati oksidativna oštećenja biomolekula poput lipida i DNA, povećavajući rizik od nastanka velikog broja kroničnih oboljenja kao što su ateroskleroza, rak, kardiovaskularne bolesti, kronične upale, infarkt i druge degenerativne bolesti (Uttara i sur., 2009). Oni se kontinuirano stvaraju u ljudskom tijelu i kontroliraju ih endogeni enzimi poput superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze. Fenolni spojevi masline pokazali su pozitivno djelovanje protiv lipidne oksidacije, DNA oksidativnog oštećenja i općenito oksidativnog stresa u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Cicerale i sur., 2011). Utvrđena je aktivnost ekstrakta maslinova lista kao i mješavine pojedinačnih fenola prisutnih u maslinovom listu u sprječavanju reaktivnosti slobodnih radikala (Lee i Lee, 2010). U studiji koju su proveli Bouaziz i sur. (2008), obogaćeno rafinirano maslinovo ulje s maslinovim lišćem i njihov hidrolizirani ekstrakt pokazali su zaštitu od oksidativnog oštećenja koje se pripisuje fenolnom sastavu lišća i ekstrakta. Oleuropein i hidroksitirozol su bile najzastupljenije tvari u navedenom ekstraktu maslinova lista i hidrolizatnoj otopini. Dodatno je utvrđen antioksidativni potencijal ekstrakta maslinova lista na Dahl hipertenzivnim štakorima kod kojih je u krvi za 22% smanjena aktivnost glutation peroksidaze i za 24 % superoksid dismutaze (Somova i sur., 2003). Zaslaver i sur. (2005) su ispitali učinak ekstrakta maslinova lista na epitelnim plućnim stanicama štakora te utvrdili djelotvornost ekstrakta u smanjenju razine nitrita i smanjenju nastanka slobodnih radikala. Jemai i sur. (2008) su proveli ispitivanje na štakorima hranjenim kolesterolom-bogatom hranom kako bi utvrdili hipolipemički i antioksidativni učinak ekstrakta maslinovog lista s visokim sadržajem oleuropeina kao i njegovim hidrolizatima s visokim udjelom oleuropein aglikona i hidroksitirozola. Navedeni ekstrakti značajno su smanjili razinu ukupnih kolesterola, triglicerida i LDL-kolesterola u serumu, a istovremeno su povećali razinu HDL-kolesterola. Nadalje, polifenolima bogati ekstrakti maslinova lista djelovali su na smanjenje tiobarbituratna kiselina-reaktivnih vrsta u jetri, srcu, bubrezima i aorti. Dodatno su ekstrakti povećali antioksidativni potencijal seruma i aktivnosti jetrenih katalaza i superoksid dismutaza. Aktivnosti katalaze i superoksid dismutaze su značajno smanjene u bubrezima štakora hranjenih kolesterolom-bogatom dijetom u usporedbi sa štakorima na kontrolnoj dijeti.



Autori su zaključili da se hipokolesterolemija može pripisati učinku oleuropein-, oleuropein aglikon- i hidroksitirosol-bogatim ekstraktima uslijed sniženja serumskih razina ukupnih kolesterola, triglicerida i LDL-kolesterola, kao i usporavanja procesa lipidne peroksidacije i povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima.

#### 1.1.3.1.2. Antibakterijski i antiviralni učinci

U ispitivanju koje su proveli Grange i Davey (1990), tinktura (95% etanolni ekstrakt) vrste *O. europaea* je pokazala inhibitornu aktivnost u razrijeđenju 1:80 protiv vrste *Mycobacterium tuberculosis* (soj H37RvTMC 102). Ekstrakt maslinova lista ima djelovanje protiv velikog broja patogenih mikroorganizama, uključujući vrste *Salmonella typhi*, *Vibrio paraemoliticus*, *Staphylococcus aureus* (uključujući penicilin rezistentne sojeve), *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (Caturla i sur., 2005; Bisignano i sur., 1999). Baktericidni učinak 0,6% (w/v) vodenog ekstrakta maslinova lista utvrđen je protiv vrsta *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, kao i bakteriostatski učinak protiv vrste *Bacillus subtilis* (Markin i Duek, 2003). Također Pereira i sur. (2007) su utvrdili aktivnost vodenog ekstrakta maslinova lista u kojem je oleuropein bio najzastupljeniji spoj (oko 73% ukupnih identificiranih tvari) protiv velikog broja Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E.coli* i *K. pneumoniae*). Dodatno su Sudjana i sur. (2009) utvrdili antibakterijski učinak ekstrakta maslinova lista (deklariran minimalni sadržaj od 4,4 mg/ml oleuropeina) protiv vrsta *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* i meticilin-rezistentnih sojeva *S. aureus* s minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIK) u rasponu 0,31 -0,78% (v/v).

U *in vitro* uvjetima, na staničnoj kulturi (H9 T limfociti) utvrđena je antiviralna aktivnost ekstrakta maslinova lista (nije dalje definiran) protiv HIV-1 virusa ( $IC_{50} = 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) (Lee-Huang i sur., 2003). Motamedifar i sur. (2005) su ustanovili i virucidalno djelovanje ekstrakta maslinova lista u koncentraciji  $> 1 \text{ mg/ml}$  na *Herpes simplex virus-1* (HSV-1) u *in vitro* uvjetima.  $CC_{50}$  (50% citotoksična koncentracija) ekstrakta maslinova lista na Vero stanicama i  $IC_{50}$  su bili 1,75 mg/ml i 0,65 mg/ml. Kada je primijenjen na stanice već inficirane HSV virusom, ekstrakt nije pokazao antiviralno djelovanje, međutim kada je primijenjen na stanice 1 sat prije inficiranja virusom, ekstrakt je pokazao anti- HSV-1 aktivnost u koncentraciji  $> 1 \text{ mg/ml}$ . Virucidalni učinak ekstrakta se povezuje sa sprječavanjem ulaska virusa u stanicu. Iako taj mehanizam u potpunosti nije razjašnjen

moguće je da je navedeno posljedica interakcije ekstrakta sa staničnim membranama Vero stanica ili ovojnicom HSV-1 virusa (Khan i sur., 2007). Prema Micol i sur. (2005), ekstrakt maslinova lista inhibira virus u ranim fazama replikacije, vjerojatno sprječavanjem fuzije ovojnice virusa.

#### 1.1.3.1.3. Ostali biološki učinci

Ekstrakt lista masline poznat je po svom antidijabetičkom i antihipertenzivnom djelovanju (El i Karakaya, 2009). Hipoglikemijski učinak zgusnutog vodenog ekstrakta jačine 32 mg/kg utvrđen je na štakorima s aloksan-induciranom hiperglikemijom. Predložena su dva mehanizma hipoglikemijskog učinka (Gonzales i sur., 1992):

- utjecaj na glukozom inducirano otpuštanje inzulina i
- učinak na povećanje perifernog unosa glukoze.

Vodeni ekstrakt maslinova lista primijenjen na štakore u dozi 500 mg/kg pokazao je učinak na smanjenje razine glukoze u krvi kod normalnih ili štakora s aloksan-induciranim dijabetesom (Trovato i sur., 1993). Hipoglikemijska aktivnost etanolnog ekstrakta (75% etanola) ustanovljena je i na kunićima s induciranim dijabetesom (Al-Azzawie i Alhamdani, 2006). Ispitivanja na laboratorijskim životinjama su potvrdila hipoglikemijsko djelovanje ekstrakta, pri čemu je glavna aktivna sastavnica bio oleuropein (Kabchi i sur., 1999; Gonzales i sur., 1992).

Rađene su kliničke studije u kojima je ispitivano i antihipertenzivno djelovanje ekstrakta lista masline. Perrinjaquet-Moccetti i sur. (2008). su utvrdili antihipertenzivno djelovanje na ljudima (40 jednojajčanih blizanaca) koji su uzimali 500 ili 1000 mg na dan EFLA® ekstrakta maslinova lista. Također, Susalit i sur. (2011) su proveli ispitivanje antihipertenzivnog djelovanja EFLA® ekstrakta maslinova lista koji je sadržavao 18-26% oleuropeina na 232 pacijenta s hipertenzijom te su ustanovili da je ekstrakt koji su ispitanici uzimali dva puta dnevno po 500 mg slične djelotvornosti u snižavanju sistoličkog i dijastoličkog tlaka u usporedbi s kaptoprilom davanim u jačini 12,5 – 25 mg dva puta dnevno.

Dodatno je utvrđeno da ekstrakt maslinova lista ima i druge učinke poput antitrombocitnog (Petroni i sur., 1995; Hansen i sur., 1996) i protuupalnog djelovanja (Fehri i sur., 1996).

### 1.1.3.2. Fenolni spojevi masline - oleuropein i hidroksitirozol

#### 1.1.3.2.1. Antioksidativni učinci

Antioksidativni učinak oleuropeina i hidroksitirosola utvrđen je u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama (Benavente-Garcia i sur., 2000; Visioli i sur., 2002; Caturla i sur., 2005). LeTutour i Guedon (1992) su utvrdili da ova dva fenola pokazuju snažniji antioksidativni učinak nego vitamin E ili butilhidroksitoluen. U *in vitro* studiji koju su proveli Visioli i Galli (1994) oleuropein ( $10^{-5}$  M) je značajno inhibirao oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. low-density protein) iz ljudske plazme, induciranu bakrovim sulfatom,. Rezultati ispitivanja s DPPH (1,1-difenil-1-pikrilhidrazil) i LP-LUV testom potvrdili su sprječavanje reaktivnosti slobodnih radikala i antioksidativnu aktivnost za oba spoja. Iako je DPPH testom utvrđena slična učinkovitost oleuropeina i hidroksitirosola, rezultati LP-LUV testa pokazali su bolje djelovanje oleuropeina u odnosu na hidroksitirozol (Saija i sur., 1998). U *in vivo* uvjetima provedeni su testovi u kojima je utvrđeno smanjenje markera oksidativnog stresa nakon tretmana s oleuropeinom na kunićima kod kojih je induciran dijabetes (Al-Azzawie i Alhamdani, 2006), štakorima hranjenim kolesterolom-bogatom dijetom (Jemai i sur., 2008) i štakorima izloženim akutnom arsenu (Kotyzová i sur., 2011). Oleuropein također smanjuje otpuštanje enzima mijeloperoksidaze (katalizira stvaranje HOCl) kod ljudskih neutrofila. Nadalje, ovaj fenol povećava aktivnost enzima kreatinin fosfokinaze-MB, laktat dehidrogenaze, AST (aspartat transaminaze) i ALT (alanin transaminaze) te smanjuje stvaranje tiobarbituratna kiselina-reaktivnih vrsta kao i inhibiciju ekspresije inducibilne sintaze dušične kiseline (iNOS) (Andreadou i sur., 2007.).

#### 1.1.3.2.2. Antimikrobni učinci

Oleuropein pokazuje inhibitorno djelovanje protiv bakterija vrsta *S. aureus*, *B. subtilis* i *Pseudomonas solanacearum* (Fleming i sur., 1973). *In vitro* ispitivanjem ustanovljeno je da oleuropein i/ili produkt njegove hidrolize inhibiraju germinaciju i sporulaciju vrsta *Bacillus megaterium* (Rodriguez i sur., 1988) i *B. cereus* (Tassou i sur., 1991). Također, inhibitorna aktivnost protiv mikoplazmi u rasponu MIK vrijednosti od 20 do 320 mg/l utvrđena je na vrstama *Mycoplasma hominis*, *M. fermentas*, *M. pneumoniae* i *M. pirum*. Hidroksitirozol je pokazao baktericidni učinak na velikom broju bakterijskih vrsta, uključujući *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *Yersinia* sp. i *Shigella sonnei* (Fernández-Mar i sur., 2012).

Bisignano i sur. (1999) su utvrdili da hidroksitirozol ima antibakterijsko djelovanje protiv nekoliko vrsta koje uzrokuju intestinalne i respiratorne infekcije. Baktericidno djelovanje hidroksitirozola izoliranog iz vodenog ekstrakta i testiranog pri 5% svoje koncentracije u ekstraktu utvrđeno je u uvjetima *in vitro* i protiv vrste *Helicobacter pylori* (Romero i sur., 2007). Yangui i sur. (2009) su ustanovili antifungalni učinak ovog fenolnog spoja na vrstama *Fusarium sambucinum*, *Verticillium dahliae* i *Alternaria solani*. U usporedbi s oleuropeinom, hidroksitirozol pokazuje antimikrobno djelovanje na većem broju vrsta te se spektar i jačina njegovog učinka mogu usporediti s ampicilinom i eritromicinom (Bisignano i sur., 1999; Khan i sur., 2007).

#### 1.1.3.2.3. Ostali biološki učinci

Oleuropein je pokazao kardioprotektivne učinke u ispitivanjima provedenim u *in vivo* uvjetima. U doksorubicin-induciranoj akutnoj kardiotoksičnosti (20 mg/kg), intravenska injekcija oleuropeina je smanjila razinu kreatin fosfokinaze, kreatin fosfokinaze-MB, laktat dehidrogenaze, aspartat aminotransferaze i alanin aminotransferaze kod štakora. Također, oleuropein je smanjio razinu protein-karbonila, nitrotirozina, koji je uključen u patogenezu kronične miokardijalne disfunkcije. Histopatologija srca pokazala je smanjenje citoplazmatske vakuolizacije kod kardiomiocita što upućuje na protektivne učinke oleuropeina protiv doksorubicin-inducirane kardiotoksičnosti (Andreadou i sur., 2009). Rocha i sur. (2010) su utvrdili da je uzimanje oleuropeina povezano s povećanom potrošnjom kisika, oksidacijom masti i aktivnosti miokardijalne beta-hidroksiacil koenzim A dehidrogenaze. Dodatno, oleuropein obnavlja endotelne funkcije, oštećene stanjem anoksije, regulacijom ekspresije gena uključenih u proteolizu, angiogenezu i upalu zbog čega može doprinijeti liječenju i kemoprevenciji vaskularnih bolesti povezanih s disfunkcijom endotela (Lamy i sur., 2014; Palmieri i sur., 2012). Na temelju dostupnih literaturnih podataka može se zaključiti da oleuropein i/ili oleuropeinom-bogat ekstrakt može predstavljati obećavajuću alternativu za liječenje i prevenciju kardiovaskularnih bolesti zbog djelovanja na smanjenje oksidativnog stresa, krvnog tlaka i upale (Bester i sur., 2010; Parzonko i sur., 2013).

Također, rađena su ispitivanja u kojima je utvrđeno djelovanje hidroksitirozola na smanjenje upalnih markera povezanih s povećanim kardiovaskularnim rizikom, tromboksan B2 i leukotrien B4 (Visioli i sur., 2005; Bogani i sur., 2007). Gong i sur. (2008) su ustanovili da je kod štakora s karagenan-induciranom akutnom upalom,

hidroksitirozol pripremljen u mješavini koja je sadržavala 20% ovog fenola, značajno smanjio akutnu upalu i bol povezanu s karagenanom. Hidroksitirozol je djelovao na smanjenje pro-upalnih citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u tkivu izoliranom iz šape štakora, međutim nije imao učinak na povećanje mRNA ekspresije protupalnog citokina IL-10 (Gong i sur., 2008).

*In vivo* ispitivanje učinka oleuropeina (20 mg/kg/dan) na streptozotocin-induciranu dijabetičku nefropatiju kod miševa pokazalo je djelovanje ovog fenola na smanjenje sekrecije proupalnih citokina TNF- $\alpha$ , IF- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-18 i IL-17A u usporedbi s kontrolnom skupinom (Karabag-Coban i sur., 2017).

Također, oleuropein i drugi polifenoli masline pokazuju neuroprotektivno djelovanje. U miševa je intraperitonealna injekcija polifenola masline utjecala na značajno povećanje živčanog faktora rasta (NGF, engl. nerve growth factor) i neurotrofnog moždanog faktora (BDNF, engl. brain-derived neurotrophic factor) te potakla ekspresiju njihovih glavnih receptora (TrkA i TrkB) u ključnim područjima limbičkog sustava i neuralne strukture što ima značajnu ulogu u učenju i procesu memorije kao i proliferaciji te migraciji endogenih progenitornih stanica u mozgu kod glodavaca (De Nicoló i sur., 2013). Neuroprotektivni učinak hidroksitirozola, glavnog razgradnog produkta oleuropeina, je nedavno analiziran na modelu hipoksija-reoksigenacija kod štakora, pri čemu je utvrđena značajna inhibicija LDL efluksa pod utjecajem ovog fenola (Gonzales-Correa i sur., 2008).

Nadalje, Hamdi i Castellon (2005) su proveli *in vitro* i *in vivo* ispitivanje koje je pokazalo da oleuropein inhibira stanični rast (0,005 – 0,025% oleuropeina), motilitet (0,01% oleuropeina) i invazivnost (0,1% oleuropeina) putem utjecaja na aktin-citoskeleton kod nekoliko staničnih linija raka poput glioblastoma (LN-18), eritroleukemije (TF-1a), adenokarcinoma bubrežnih stanica (786-O), raka dojke (T-47D), adenokarcinoma mliječnih žlijezda (MCF-7), melanoma limfnih čvorova (RPMI-7951) i kolorektalnog adenokarcinoma (LoVo). U navedenoj studiji provedeno je i ispitivanje u *in vivo* uvjetima u kojem su miševi s tumorima (približno 2 cm promjera) podijeljeni u dvije skupine od kojih je jedna uzimala vodu za piće koja je sadržavala 1% oleuropeina, a druga je bila kontrolna skupina. Kod miševa koji nisu uzimali vodu s oleuropeinom utvrđena je 100% smrtnost do 10-og dana pokusa, dok je u tretiranoj skupini ustanovljena potpuna regresija tumora u 9-12 dana. Vodeni ekstrakt maslinova lista koji je sadržavao  $345,3 \pm 5,8$  mg/g ekstrakta oleuropeina je pokazao antikancerogeni učinak kod karcinoma mokraćnog mjehura s IC<sub>50</sub> koji je iznosio  $7,59 \pm 1,80$   $\mu$ M (Goulas i sur.,

2009). Nadalje, etanolni (80%) ekstrakt maslinova lista s 19,8% oleuropeina je imao i inhibitorni učinak na rast stanica melanoma kože (B16) u rasponu koncentracija 0,15 – 5 mg/ml (Mijatović i sur., 2011). Za hidroksitirozol je utvrđen antitumorni učinak na nekoliko staničnih linija kroz inhibiranje proliferacije i indukciju apoptoze, i to na Caco-2 staničnoj liniji pri ispitivanim koncentracijama 5 – 162,5  $\mu$ M (Corona i sur., 2009), na HL60 staničnoj liniji pri koncentraciji 100  $\mu$ M (Fabiani i sur., 2009) i na MCF-7 staničnoj liniji karcinoma dojke pri koncentraciji 50  $\mu$ g/ml (Han i sur., 2009).

## 1.2. Kvasci

### 1.2.1. Klasifikacija gljiva (Fungi, Mycota) unutar domene Eucarya

Gljive pripadaju eukariotskim organizmima koji mogu biti građeni od jedne ili više stanica (Slika 8). Ovi organizmi imaju stanične stijenke građene od hitina i  $\beta$ -glukana te se hrane heterotrofno apsorpcijom. Razlikuju se saprofitske gljive koje razgrađuju mrtvu organsku tvar i parazitske gljive koje se hrane organskim tvarima iz živih organizama. Osim manjeg broja vrsta, mogu tvoriti micelij odnosno nitasto, razgranato tijelo kojeg čine hife. Razmnožavaju se nespolno (sporama i pupanjem) i spolno (Hrvatska enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, 2017).



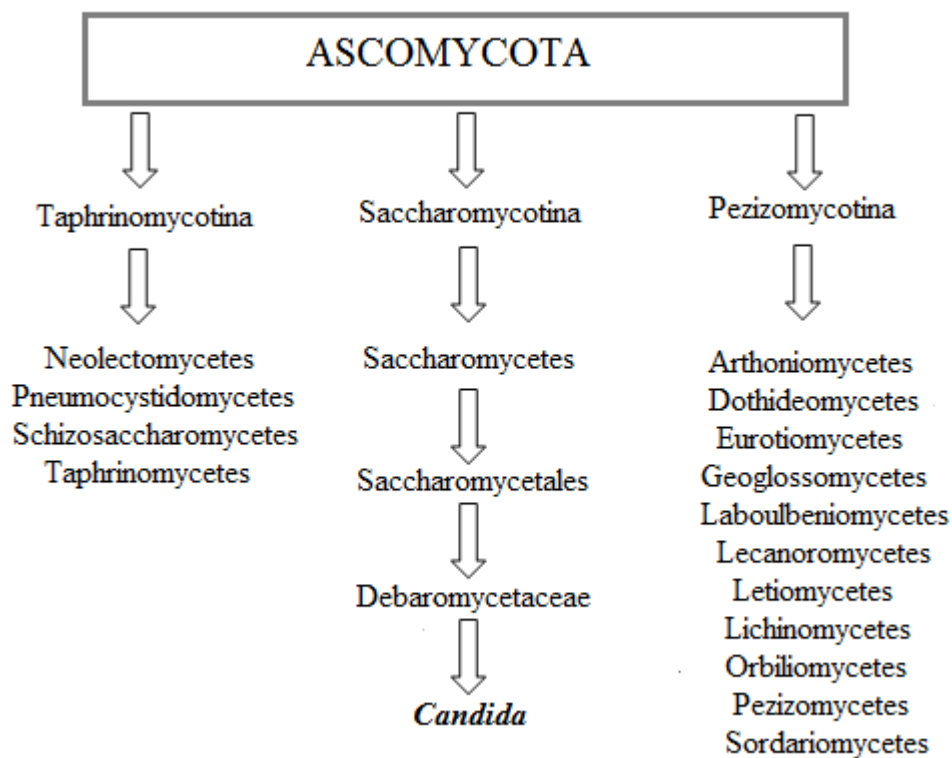
**Slika 8.** Raznolikost gljiva (askomiceti: a) *Mitrula paludosa*, b) *Aspergillus flavus*, c) *Mollisia ventosa*; bazidiomiceti: d) *Amanita muscaria*) (Hrvatska enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, 2017).

Sistematizacija organizama se povijesno temeljila na morfologiji koja nije u skladu s rezultatima molekularno-genetičkih analiza. Korištenjem molekularno-bioloških metoda za analizu nukleotidnih sekvenci gena D2 LSU rRNA (Kurtzmann i Robnett, 1991), D1/D2 LSU rRNA (Kurtzmann i Robnett, 1998), SSU rRNA (Cai i sur., 1996, James i sur., 1994, 1997), ITS (James i sur., 1996) i citokrom oksidaze II (Belloch i sur., 2000) utvrđeni su filogenetski odnosi unutar domene Eucarya. Sukladno

navedenoj sistematizaciji, gljive se mogu podijeliti na četiri koljena (Guarro i sur., 1999):

- hitridomiceti (Chytridiomycota),
- zigomiceti (Zygomycota),
- askomiceti (Ascomycota) i
- bazidiomiceti (Basidiomycota).

Kvasci se svrstavaju unutar koljena askomiceta i bazidiomiceta. Koljeno askomiceta uključuje rodove *Acremonium*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Blastoschizomyces*, *Cladosporium*, *Coccidioides*, *Fusarium*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*, *Pneumocystis*, *Saccaromyces*, *Scedosporium* kao i medicinski važne kvasce roda *Candida*. Slika 9 daje pojednostavljeni prikaz podjele askomiceta na osnovu multigenjskih analiza (Hibbett i sur., 2007; Kurtzman i Robnett, 2010; Kurtzman i Suzuki, 2010; Kurtzman i sur., 2008).



**Slika 9.** Pojednostavljeni prikaz taksonomske podjele askomiceta.



### 1.2.2. Osnovna obilježja kvasaca iz koljena askomiceti (Ascomycota)

Kvasci su jednostanične eukariotske gljivice koje se razmnožavaju pupanjem. Za kvasce iz koljena askomiceti karakteristično je stanično dijeljenje multilateralnim pupanjem, bipolarnim pupanjem i fisijom. Najzastupljeniji oblik dijeljenja je multilateralno pupanje, dok se druga dva oblika razmnožavanja javljaju samo u nekih rodova (pojava bipolarnog pupanja utvrđena je kod rodova *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes*, *Nadsonia* i *Wickerhamia*, dok je pojava fisije utvrđena kod rodova *Dipodascus*, *Galactomyces*, *Magnusiomyces* i *Schizosaccharomyces*) (Kurtzman, 2010). Mnogi pripadnici ovog koljena stvaraju pseudohife, hife i pregrađene hife. Prisutnost hifa i stvaranje pregrađenih hifa smatralo se u prošlosti taksonomskim obilježjem (Smith i de Hoog, 1998), pa je na primjer za vrste roda *Saccharomycopsis* karakteristično stvaranje pregrađenih hifa za koje je međutim ustanovljeno da se nalaze i kod mnogih drugih vrsta. Nadalje, vrste roda *Saccharomycopsis* imaju pregrade s višestrukim mikroporama, ali navedeno nije prisutno kod vrste *S. javanensis* koja ima hifalne pregrade s jednom središnjom mikroporom. Iz navedenih primjera vidljivo je da se prisutnost hifa i struktura hifalne pregrade ne mogu smatrati genski-specifičnim obilježjima. Dodatna karakteristika kvasaca iz ovog koljena je tvorba askusa u kojem se nalaze askospore iako je utvrđeno da morfologija askospora nije pouzdani prediktor srodnosti između vrsta ovog koljena (Kurtzman, 2010). Razlikovanje i identifikacija kvasaca moguća je i na osnovu fizioloških i biokemijskih osobina poput asimilacije i fermentacije ugljikohidrata koja je prisutna kod mnogih vrsta reda Saccharomycetales. Na primjer, vrste roda *Saccharomyces* podnose prisutnost etanola prisutnu u hranjivim podlogama u koncentraciji većoj od 8%. Utvrđeno je da neke vrste imaju mogućnost fermentacije D-ksiloze. Nadalje, iako većina bazidiomiceta raste na mioinozitolu, mali broj askomiceta može koristiti ovu tvar. Rast na mioinozitolu uočen je kod nekih vrsta rodova *Ascoidea*, *Babjeviella*, *Blastobotrys*, *Candida*, *Dipodascopsis*, *Lipomyces*, *Myxozyma*, *Saccharomycopsis* i *Zygoascus*. Poznato je da vrste rodova *Komagataella*, *Kuraishia*, *Ogataea* i *Ascoidea* mogu koristiti metanol za rast, dok je kod vrsta roda *Trichomonascus* uočena i asimilacija heksadekana i stvaranje ubikinona (koenzima Q-8 i Q-9). Prema Kurtzmanu (1984), istraživanjem filogenetskih odnosa rodova *Barnettozyma*, *Lindnera*, *Ogataea* i *Wickerhamomyces* utvrđena je bliska srodnost vrsta koje imaju mogućnost asimilacije nitrata kao jedinog izvora dušika. Dodatna osobina na osnovu

kojih se mogu razlikovati askomicetni od bazidiomicetnih kvasaca je sadržaj guanina + citozina u jezgri DNA koji je za kvasce iz koljena askomiceti u rasponu 30-50 mol% odnosno za kvasce iz koljena bazidiomicete 50-70 mol% (Price i sur., 1978). Van der Walt i sur. (1976) su izvijestili o mogućnosti diferencijacije vrsta dvaju koljena prema pigmentaciji kolonija u reakciji s dijazonij plavom pri čemu samo bazidiomicetni kvasci stvaraju crvene kolonije. Dodatno je analizom nukleotidnih sekvenci gena za SSU rRNA omogućena korelacija između filogenetskih odnosa i ugljikohidratnog sastava stanične stijenke vrsta rodova askomiceta (Schweigkofler i sur., 2002). Utvrđeno je da su u navedenom koljenu zastupljene tri vrste „uzoraka“, i to manozna-glukoza, glukoza-manoza-galaktoza i glukoza-manoza-galaktoza-ramnoza. Prva dva tipa su zastupljena kod vrsta iz reda Saccharomycetales, a treći tip je prisutan kod vrsta iz redova Taphrinomycotina i Pezizomycotina. Kawaguchi i sur. (1989) su također utvrdili mogućnost identifikacije pojedinih vrsta primjenom leucin CUG kodona budući da je CUG obično kod za aminokiselinu leucin, međutim kod nekih *Candida* vrsta navedeni kodon kodira za aminokiselinu serin.

### 1.2.3. Medicinski značajne gljivice roda *Candida*

#### 1.2.3.1. Epidemiologija

Poznato je više od 350 *Candida* vrsta, od kojih su *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. orto/meta/para -psilosis* kompleks, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. norvegiensis* i *C. dubliniensis* klinički značajne vrste (Kosmidis i Denning, 2017). Navedene gljivice su oportunistički mikroorganizmi koji su najčešće prisutni u ljudi kao dio komenzalne mikrobiote, ali u određenim uvjetima mogu postati patogeni i uzrokovati mikoze (Kosalec, 2015). Oslabljeni imunološki sustav uslijed malignih oboljenja (McCullers i sur., 2000), infekcija HIV virusom (+SIDA) (Hasan i sur., 2009), terapija kortikosteroidnim lijekovima (Hovi i sur., 2000), dijabetes (Rex i sur., 1995), transplantacija (Rex i sur., 1995), upotreba centralnih venskih i drugih katetera (Clancy i sur., 2000) te primjena antibiotika širokog spektra (Ortega i sur., 2011) su predisponirajući čimbenici koji doprinose povećanoj incidenciji ovih mikoza. Nedonošćad i djeca rođena s malom porođajnom težinom pripadaju rizičnoj skupini kao i osobe koje su prošle transplantacijske zahvate osobito tankog crijeva, gušterače i jetre (Kosmidis i Denning, 2017). Iako je najčešći uzročnik invazivne gljivične infekcije vrsta *C. albicans* (Horn i sur., 2009), zabilježen

je porast infekcija uzrokovanih ne-*albicans* vrstama. Nakon *C. albicans*, najčešći klinički izolati su *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*. Europska organizacija za istraživanje i liječenje raka (EORTC) provela je 1990. god. europsku studiju kojom je ustanovljeno da je 92% slučajeva kandidoza u pacijenata oboljelih od tumora i hematoloških malignih bolesti uzrokovano vrstom *C. albicans*. EORTC istraživanjem provedenim u 2015. god. utvrđeno je da je učestalost infekcija uzrokovanih vrstom *C. albicans* kod pacijenata oboljelih od raka 40%, vrstom *C. tropicalis* 13%, *C. glabrata* 10%, *C. parapsilosis* 9% i *C. krusei* 8%. Kod pacijenata s hematološkim malignim oboljenjima utvrđena je učestalost infekcija s vrstom *C. albicans* od 22%. U azijskim i nekim tropskim državama postoje razlike u distribuciji infektivnih *Candida* vrsta osobito u bolesnika s hematološkim malignim oboljenjima (25% kliničkih izolata se odnosi na vrstu *C. tropicalis*) (Kosmidis i Denning, 2017). Prema Nucci i sur. (2010) kandidoza uzrokovana vrstom *C. glabrata* dovodi se u svezu s primjenom flukonazola dok su infekcije uzrokovane vrstom *C. parapsilosis* obično povezane s kirurškim zahvatima, prostetičkim implantatima (Canton i sur., 2011) te neonatalnim infekcijama (Nucci i sur., 2010). 2005. god. predložena je zamjena *C. parapsilosis* s tri različite ali povezane vrste pod nazivima *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* i *C. metapsilosis* (Tavanti i sur., 2005). Pires i sur. (2011) su proveli istraživanje u kojem je izolirano 100 kliničkih izolata vrste *C. parapsilosis* na Odjelu za hemodijalizu te je molekularnom analizom ustanovljeno da se 53% odnosi na *C. parapsilosis* od kojih 47% odgovara *C. orthoparapsilosis*. Nadalje, vrsta *C. dubliniensis* se često nalazi u kliničkim izolatima u kombinaciji s vrstom *C. albicans* (Sullivan i sur., 2004). Prema Lasker i sur. (2001) utvrđena je velika učestalost vrste *C. dubliniensis* u usnoj šupljini pacijenata s HIV infekcijom (+ SIDA). Prikupljeni su i podaci o *C. dubliniensis* izoliranoj iz drugih dijelova tijela, i to rodnice, urina, kože i gastrointestinalnog trakta kod HIV-pozitivnih i HIV-negativnih pacijenata (Loreto i sur., 2010; Mokaddas i sur., 2011; Khan i sur., 2012). Budući da je kod pacijenata kod kojih je utvrđena prisutnost *C. dubliniensis* rijetko došlo do razvoja kandidoza, Jakson i sur. (2009) su proveli istraživanje kojim je utvrđeno da u genomu vrste *C. dubliniensis* nedostaju bitni geni vezani uz stvaranje micelnog oblika kvasca odnosno invazivnog oblika koji omogućuje prodiranje kroz tkivo nositelja.

### 1.2.3.2. Vrste kandidoza

Kolonizacija kandidama kod čovjeka događa se neposredno nakon rođenja. Navedeni komenzali prisutni su na površinama sluznica, koži, gastrointestinalnom (uključujući usnu šupljinu) i genitourinarnom traktu (Kuhn i sur., 2004). Razlikuju se dvije vrste mehanizama prijenosa kandida, i to endogena kandidoza prilikom koje kandidate iz komenzalne mikrobiote prelaze u oportunističkog patogena kod imunokompromitiranih pojedinaca uslijed djelovanja virulentnih čimbenika (Colombo i Guimaraes, 2003), te egzogena kandidoza koje se može dogoditi u dodiru sa zdravstvenim radnicima koji brinu za pacijente ili kao posljedica kontaminiranih katetera i intravenskih otopina (Calderone i Fonzi, 2001).

Prema kliničkoj manifestaciji, kandidoze se mogu nadalje podijeliti na mukokutane i sistemske infekcije. Najčešća klinička manifestacija infekcije kandidama je orofaringealna kandidoza koja se obično javlja u pojedinaca koji koriste antibiotike širokog spektra, terapiju kortikosteroidima inhalacijskim putem ili kod imunokompromitiranih osoba. Kod osoba koje imaju HIV infekciju kao i kod osoba koje boluju od limfoma ili leukemije povećan je rizik od razvoja infekcije ezofagitisa. Navedeni oblik infekcije također je prisutan kod imunokompetentnih osoba. Vrlo učestali oblik kandidoze je i vulvovaginitis, osobito kod pacijenata koji primaju antibiotike ili imunosupresive, oboljelih od dijabetesa kao i osoba koji koriste kontracepciju (Kosmidis i Denning, 2017). Poznat je i rijetki genetički poremećaj koji uzrokuje pojavu kronične mukokutane kandidoze koja se manifestira infekcijom mukoznih membrana, kose i noktiju (Kisan i sur., 2011). Invazivni oblici ovih infekcija uzrokuju pojavu kandidemije ili infekcije organa. Više od 90% invazivnih infekcija uzrokuju vrste *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei* (Pfaller i sur., 2007). Prema Xie i sur. (2008) utvrđeno je, na osnovu ispitivanja provedenog na pacijentima koji su podvrgnuti kirurškom zahvatu te kod kojih se razvila gljivična infekcija, da je najčešći uzročnik invazivne infekcije (58%) bila vrsta *C. albicans* te je također ustanovljeno da su najviše pogođena ovom infekcijom bila pluća bolesnika. Kao posljedica komplikacija uslijed diseminiranih kandidoza može doći do nastanka *Candida* meningitisa, encefalitisa, miokarditisa i endokarditisa koji je u 41% slučajeva uzrokovan ne-*albicans* vrstama (Kosmidis i Denning, 2017). Postoji i visok rizik od nastanka pankreatitisa prilikom abdominalne kirurgije (Hall i sur., 2013). Također, povećani rizik od pojave kronične diseminirane kandidoze imaju

pacijenti s malignim bolestima i neutropenijom iako je pojava navedene infekcije danas manje zastupljena uslijed primjene antifungalne profilakse.

### 1.2.3.3. Uzgojne karakteristike vrste *C. albicans*

Uzgojem vrste *C. albicans* na Sabouraud 2%-tnom glukoznom agaru nakon 24 sata inkubacije pri 37°C stvaraju se bijele kolonije, veličine 3-10 mm, okruglog, konveksnog oblika (Slika 10). Na rižinom- ili kukuruznom-polisorbatnom agaru nakon 24 sata inkubacije pri 30°C nastaju klamidospore i pseudomicelij s postraničnim blastosporama (Kosalec i sur., 2005) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Fermentacija, rast i druge karakteristike vrste *C. albicans*.

Vrsta	Fermentacija				Rast i druge karakteristike				
	glukoza	galaktoza	saharoza	maltoza	glukoza	saharoza	galaktoza	trehaloza	maltoza
<i>C. albicans</i>	+	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+

Vrsta	Rast i druge karakteristike							
	Metil- $\alpha$ -D-glukozid	škrob	D-manitol	D-ksiloza	arabinoza	riboza	etanol	glicerol
<i>C. albicans</i>	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-

+...pozitivan ili slab; -...negativan; +/-...promjenjiv



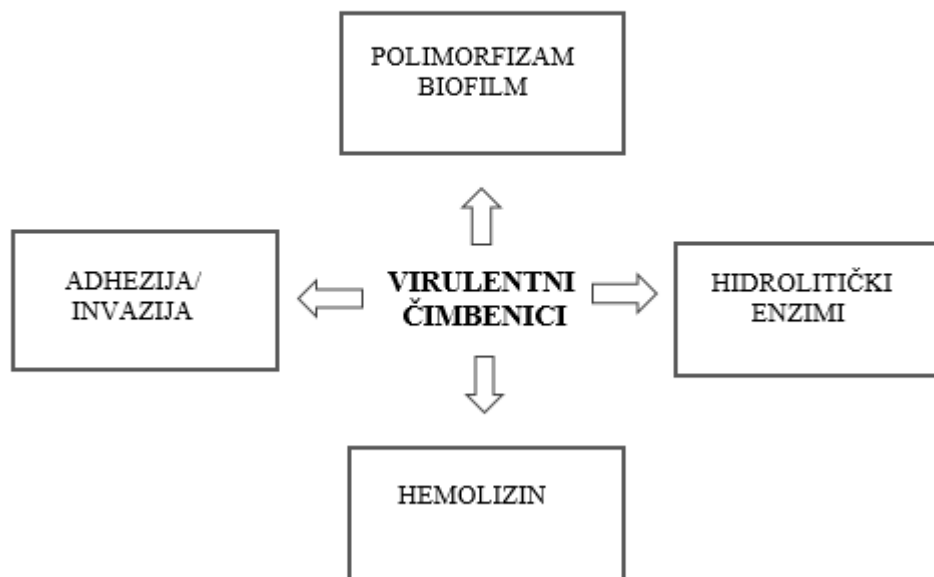
**Slika 10.** Okrugle mat bijele kolonije *C. albicans* na Sabouraud 2%-tnom glukoznom agaru (Anonimno, 2017).

#### 1.2.4. Oportunistički patogen *C. albicans*

##### 1.2.4.1. Virulentni čimbenici

Današnji koncept shvaćanja patogeneze prilikom razvoja gljivične infekcije razlikuje se od nekadašnjeg poimanja. U prošlosti se smatralo da kvasci pasivno sudjeluju u procesu patogeneze i da je imunokompromitirani nositelj jedini mehanizam odgovoran za razvoj oportunističke infekcije (Sardi i sur., 2013). Međutim, danas je poznato da je patogenost vrste determinirana virulentnim čimbenicima. Prema Casadevall i Pirofski (1999), virulentni čimbenik je mikroba komponenta koja oštećuje nositelja. Dakle, kvasci aktivno sudjeluju u patofiziologiji bolesti posredstvom mehanizama agresije zvanih virulentni čimbenici (Tamura i sur., 2007) (Slika 11). Patogena komenzalna gljivica poput vrste *C. albicans* uzrokuje bolesti samo u situacijama gdje je narušena ravnoteža u odnosu između nositelja i mikroba (Casadevall, 2007). Dva su izvora gljivičnih infekcija. Razlikuju se okolišni gljivični patogeni koji kada inficiraju nositelja uzrokuju bolest (Bliska, 2009) i endogena mikrobiota koja je prisutna u nositelju i samo pod uvjetima narušene ravnoteže uzrokuje bolest. Neki okolišni gljivični patogeni pripadaju rodovima *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces* ili *Aspergillus*. Za patogenezu je neophodno preživljenje infektivnog mikroorganizma te oštećenje nositelja koje se manifestira kroz pojavu simptoma bolesti (Brunke i sur., 2016). Oštećenje nositelja nije samo posljedica djelovanja mikroorganizma već navedeno proizlazi iz suodnosa mikroba i nositelja putem tzv. „okvira oštećenja i odgovora“ (engl. „damage-response framework“) (Casadevall i Pirofski, 2003). Rast

nije uvijek esencijalni čimbenik patogeneze kod patogenih gljivica budući da se i stanične nereplikativne faze na primjer u obliku biofilma dovode u svezu s rezistencijom na antimikotike (Pierce i Lopez-Ribot, 2013). Da bi se mikroorganizam mogao razmnožavati u nositelju potrebna mu je metabolička aktivnost na 37°C i mogućnost iskorištavanja nutrijenata iz nositelja (Ene i sur., 2014), pa tako na primjer gljivični patogen luči enzime aspartil-proteaze posredstvom kojih koristi dušik (Silva i sur., 2011). Za razvoj mikroorganizama neophodni su i mikronutrijenti poput željeza te patogen mora izbjeći mehanizme nositelja kako bi mogao dobiti neophodne sastojke za rast. Važnu ulogu u virulenciji ima stvaranje hemolizina kojeg mikroorganizmi koriste za dobivanje željeza koje je esencijalno u razvoju infektivnog procesa (Manns i sur., 1994). Nadalje, patogeni imaju mehanizme putem kojih izbjegavaju odgovore imunološkog sustava nositelja, na primjer mogu razgraditi antimikrobne tvari poput ROS molekula (engl. reactive oxygen species) (Sterkel, 2016). Utvrđeno je da i pigmenti mogu imati ulogu u zaštiti patogenih gljivica od mehanizama imunološkog sustava nositelja (Scharf i sur., 2014). Poznato je da neke vrste poput *Cryptococcus neoformans* mogu stvarati melanin te je sinteza melanina dovedena u svezu s virulentnošću usporedbom patogenosti sojeva divljeg-tipa s mutantima koji nisu mogli stvarati ovaj pigment (Salas i sur., 1996). Mehanizmi kojima melanin doprinosi virulenciji uključuju zaštitu od antioksidansa (Sichel i sur., 1991), nadalje melanizacija štiti stanice od antitijelima posredovane fagocitoze i makrofaga (Wang i sur., 1995.), a postoje i ispitivanja koja podupiru tvrdnju da se melanin stanične stijenke kriptokoka veže na amfotericin B i kaspofungin te sprječava vezivanje antimikotika na ciljno mjesto (Zugar i sur., 1986). Bitnu ulogu u patogenezi imaju i adhezini koje stvara mikroorganizam (kod vrste *C. albicans* značajnu ulogu u adheziji imaju produkti HWP1 i ALS obitelji gena) koji se specifično vežu na aminokiseline i ugljikohidrate na površini drugih ciljnih stanica i abiotskih površina (Verstrepen i Klis, 2006). Jačoj adherenciji doprinosi polimorfizam prisutan kod nekih vrsta koji omogućava pretvorbu jednostanične blastospore u micelarni oblik. Navedeni rast hifa smatra se značajnim virulentnim čimbenikom bitnim za invaziju i rezistenciju na fagocitozu (Jayatilake i sur., 2006).

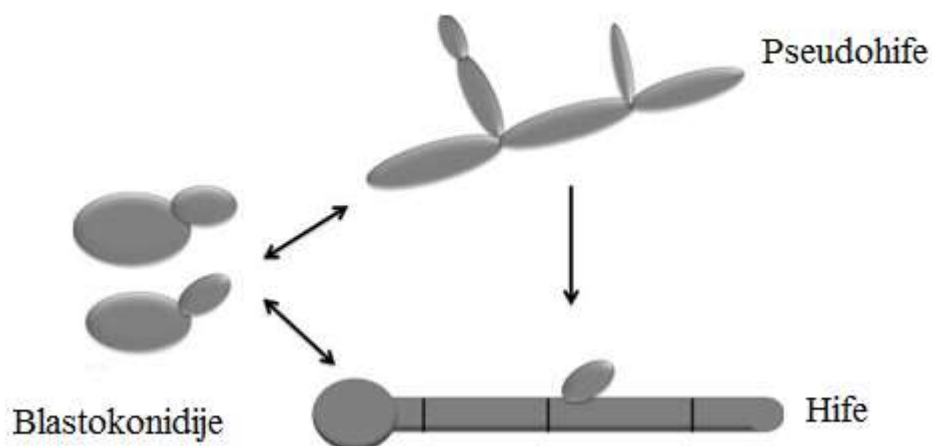


**Slika 11.** Najznačajniji virulentni čimbenici vrste *C. albicans*.

#### 1.2.4.1.1. Polimorfizam

Neke vrste kvasaca poput *C. albicans* mogu rasti u tri vegetativna oblika, i to u obliku blastokonidija, pseudohifa i hifa (Slika 12). Pseudohife i hife nastaju stvaranjem produžetaka (tzv. germinacija) od blastokonidije (Cullen i Sprague, 2012). Za razliku od pseudohifa, hife posjeduju poprečne septe, kao i specijalizirane organele Spitzenkörper koje imaju ulogu u promoviranju rasta hife. Također, prema Barelle i sur. (2003) utvrđeno je da blastokonidija i pseudohifalne stanice rastu sinkrono sa staničnim ciklusom, dok kod stvaranja hifa, inicijalna germinacija se događa prije G1/S prijelaza. Nakon završetka prvog staničnog ciklusa, hifalne stanice ostaju u G1 fazi dok se ne nakupi dovoljna citoplazmatska masa za ulazak u sljedeći stanični ciklus. Posljedično, hifalni produžeci su manje razgranati od onih kod pseudohifa (Sudbery i sur., 2004). U uvjetima u kojima su ograničeni nutrijenti, neke vrste (*C. albicans* i *C. dubliniensis*) stvaraju dodatan morfološki oblik odnosno klamidospore koje su 3-4 puta veće od blastokonidija i imaju zadebljanu staničnu stijenku. Klamidospore se rijetko nalaze u inficiranim tkivima (Cole i sur., 1991).





**Slika 12.** Pojednostavljeni prikaz morfoloških oblika prisutnih u nekim vrsta kvasaca (Pierce i Lopez-Ribot, 2013).

Morfološka promjena stanica događa se pod određenim vanjskim utjecajima. Čimbenici koji imaju utjecaj na promjenu vegetativnog oblika uključuju temperaturu, prisutnost seruma, pH, aminokiseline, određene supstrate poput N-acetilglukoamina, mikroaerofilne uvjete i određene ljudske hormone (Sudbery i sur., 2011). Promjena morfologije ima važnu ulogu u mnogim procesima vezanim uz virulenciju kod kandida poput kolonizacije, diseminacije u tkiva, adhezije na stanične površine nositelja i stvaranje biofilma. Prema Thompson i sur. (2011), stvaranje hifa kod vrste *C. albicans* doprinosi virulenciji kroz nekoliko mehanizama:

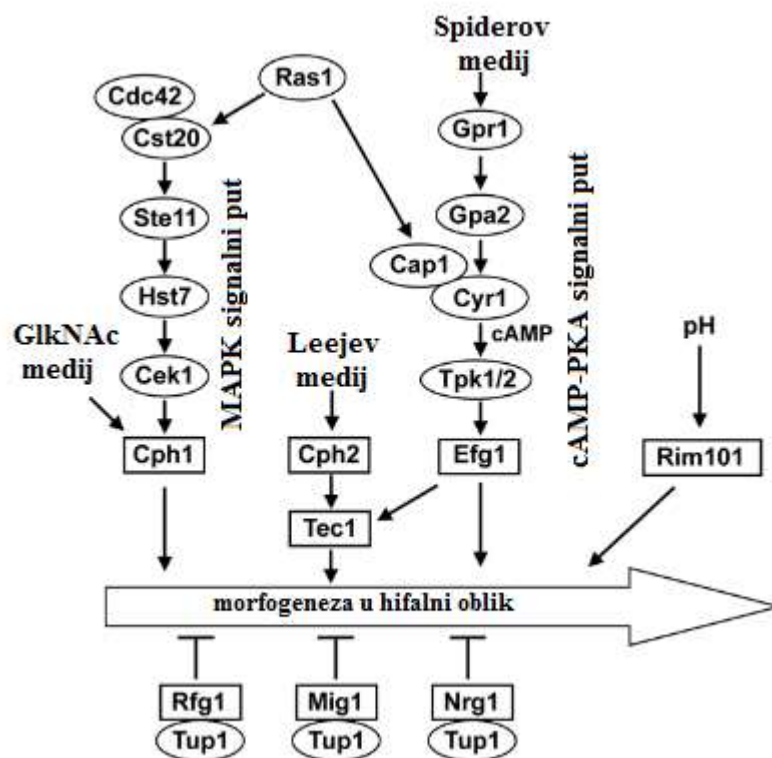
- mehaničkom silom prodiru kroz epitelna tkiva i stanice,
- oštećuju endotelne stanice,
- uzrokuju lizu makrofaga i neutrofila,
- uslijed tigmotropizma, tijekom infekcije, identificiraju i prodiru kroz male otvore u tkivima nositelja.

Dodatno je utvrđeno da klinički izolati drugih manje patogenih vrsta *Candida* (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*) sadržavaju uglavnom morfološku kombinaciju blastokonidija i pseudohifa, te rijetko ili nikada ne stvaraju hife (Sutton i sur., 1998).

Također, drugi virulentni čimbenici poput lučenja hidrolitičkih enzima dovode se u svezu s micelarnim rastom. Nekoliko aspartil-proteaza (Sap4, Sap5 i Sap6) je

inducirano tijekom morfološke promjene u hifalni oblik i imaju ulogu u invaziji tkiva nositelja (Sanglard i sur., 1997).

Istraživanjem molekularnih mehanizama vrste *C. albicans* ustanovljeni su značajni geni uključeni u regulaciju germinacije. Indukcija gena pozitivne regulacije CPH1, EFG1, HGC1 i UME6 događa se pod utjecajem višestrukih vanjskih signala (Tablica 2). Važnu ulogu u negativnoj regulaciji ima gen TUP1 koji predstavlja represor germinacije zajedno s proteinom Nrg1p. Kao odgovor na djelovanje vanjskih čimbenika, dolazi do aktivacije različitih staničnih signalnih puteva (MAP kinaza, cAMP-protein kinaza A, GlkNAc, pH- i amino-) koji utječu na regulatore transkripcije te posljedično uzrokuju indukciju ili represiju stvaranja hifa (Thompson i sur., 2011) (Slika 13).



**Slika 13.** Morfološki signalni putevi kod vrste *C. albicans* kao odgovor na djelovanje vanjskih čimbenika koji utječu na regulatore transkripcije te uzrokuju indukciju ili represiju nastanka hifa (Midkiff i sur., 2011).

**Tablica 2.** Vanjski signali i odgovarajući signalni putevi uključeni u morfogenezu vrste *C. albicans*.

Vanjski signal	Proteini/Signalni put
Serum Peptidoglikani	cAMP-PKA put
Nedostatak hranjivih tvari	Mep2, MAPK put
Metabolizam aminokiselina	Gpr1, Csh3, Gcn4, Cdc53
Lužnati pH	Rim 101 put
Mikroaerofilni uvjeti	Czf1, Rac1, Dck1
Povišeni CO <sub>2</sub>	cAMP-PKA put
Povišena temperatura	Hsp90, cAMP-PKA put
Zaustavljen stanični ciklus	Clb2, Clb4, Hgc1-Cdc28
Hiperosmotski stres	Hog put
„Quorum sensing“ molekule	cAMP-PKA put

#### 1.2.4.1.2. Modulacija morfogeneze

Budući da je promjena morfologije vrste *C. albicans* virulentni čimbenik, istraživanje molekula sa svojstvom modulacije morfogeneze predstavlja mogući pristup u otkrivanju novih terapeutika. U nastavku je dan pregled nekih molekula za koje je utvrđeno da imaju učinak na germinaciju kod vrste *C. albicans*.

Farnezol je prva „quorum-sensing“ molekula identificirana kod eukariota. Navedena molekula inhibira morfogenezu induciranu različitim čimbenicima poput seruma i N-acetil-D-glukoamina (Mosel i sur., 2005). Farnezol utječe na ekspresiju gena vezanih uz odgovor stanice na stres uvjete, rezistenciju na lijekove, metabolizam ugljika i aminokiselina, transport željeza, staničnu stijenku i stanični ciklus (Shareck i Belhumeur, 2011). Osim kod *Candida* vrsta, ova molekula utječe na razvoj mnogih drugih patogena poput *Aspergillus* spp., *Fusarium graminearum* i *Paracoccidioides brasiliensis* (Langford i sur., 2009).

Osim farnezola, vrsta *C. albicans* luči i druge autoregulatorne molekule koje utječu na promjenu iz blastokonidije u hifalni oblik. Među prvim opisanim molekulama s inhibitornim učinkom na stvaranje hifa bili su 2-feniletanol i triptofol. Navedeni

alkoholi se ne smatraju „quorum sensing“ molekulama budući da imaju inhibitorni učinak pri koncentracijama koje se ne mogu stvoriti prirodnim putem (Hazen i Cutler, 1979).

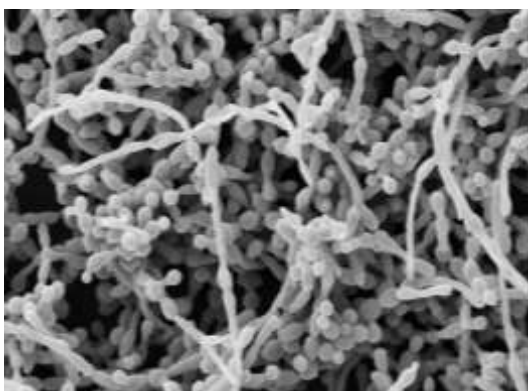
Utvrđeno je da mnoge bakterije također luče molekule koje moduliraju morfogenezu kod kvasaca. Na primjer, bakterija *Pseudomonas aeruginosa* luči 3-okso-C<sub>12</sub>-acil homoserin lakton (3OC12HSL) koji inhibira germinaciju induciranu u mediju koji sadrži N-acetilglukozamin. Dodatno je ustanovljen inhibitorni učinak na rast vrste *C. albicans* u uvjetima *in vitro*, u ranama nastalim kao posljedica opekotina i plućima pacijenata s cističnom fibrozom. Molekule odgovorne za navedeni učinak su piocijanin, fosfolipaza C i fenazin (Hogan i sur., 2002; Shareck i Belhumeur, 2011). Kod ovakvih vrsta mikrobnih zajednica lučenje navedenih tvari može biti mehanizam kompeticije između mikroorganizama budući da inhibicija germinacije ograničava adheriranje na površine i onemogućuje invaziju. Također, navedeno može biti i odgovor vrste *C. albicans* na prisutnost drugog mikroorganizma, na primjer u prisutnosti molekule 3OC12HSL vrsta *C. albicans* može spriječiti nastanak hifa kao način obrane od bakterije vrste *P. aeruginosa* (Shareck i Belhumeur, 2011).

Od drugih molekula koje imaju učinak na modulaciju morfogeneze kod vrste *C. albicans* treba istaknuti mnoge masne kiseline (laurinska, oleinska, palmitinska, linolenska i dr.), eikozanoide poput prostaglandina koji induciraju tvorbu hifa, rapamicin odnosno sekundarni metabolit bakterije *Streptomyces hygroscopicus*, geldanamycin, inhibitore histon deacetilaze kao i inhibitore staničnog ciklusa poput hidroksiuree i nokodazola (Shareck i Belhumeur, 2011).

### 1.2.4.1.3. Biofilm

#### A) Tvorba biofilma

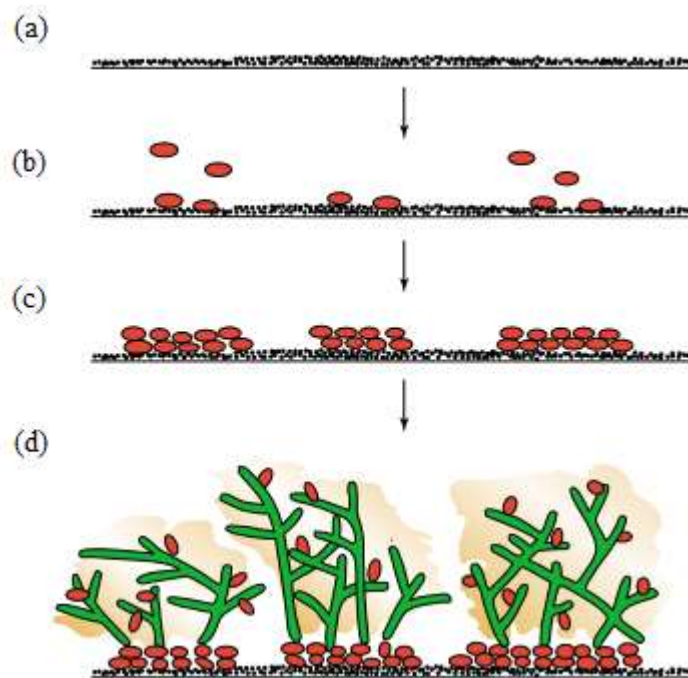
Većina infekcija uzrokovanih gljivičnom vrstom *C. albicans* dovodi se u vezu s rastom biofilma (Ramage i Lopez-Ribot, 2005). Prema Soll (2008), mikroorganizmi gotovo ne postoje u tkivu nositelja u slobodnom obliku već stvaraju višestaničnu 3D zajednicu, odnosno biofilm, na vlažnim biološkim površinama i inertnim abiotičkim površinama poput katetera (Slika 14). Biofilm je strukturirana mikrobna zajednica koja nastaje kompleksnim procesom kojeg čini više faza.



**Slika 14.** SEM mikrofotografija biofilma vrste *C. albicans* (preuzeto iz Pierce i Lopez-Ribot, 2014).

Prvi korak u tvorbi biofilma čini adherencija stanica na biološku ili inertnu površinu. Ovom vezanju stanica posreduju nespecifični faktori, poput površinske hidrofobnosti i elektrostatskih sila, te specifični adhezini. Na određenoj površini adhezini prepoznaju i vežu se na ligande poput proteina seruma (fibronektin i fibrinogen) ili faktora sline. Potom slijedi stanična podjela, proliferacija i formiranje biofilma uz stvaranje vanstaničnog matriksa i maturacije biofilma (Uppuluri i sur., 2010) (Slika 15). Naposljetku, dolazi i do disperzije stanica biofilma u planktonsku formu i njihovog širenja i vezanja za novu površinu. Matriks biofilma sadrži ugljikohidrate, proteine, fosfor i heksozamine, međutim njegov sastav ovisi o okolišnim čimbenicima poput sastava medija, pH, kisiku i vrsti gljivice. I druge vrste poput *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis* stvaraju biofilm, ali je utvrđeno da biofilm kojeg stvara vrsta *C. parapsilosis* sadrži matriks s visokim udjelom ugljikohidrata te manjim udjelom proteina u usporedbi s biofilmom vrsta *C. glabrata* i *C. tropicalis* (Silva i sur., 2011). Morfološka promjena stanica u germinirani oblik važan je korak u stvaranju biofilma

te je utvrđeno da mutantni sojevi koji ne stvaraju hife ne mogu tvoriti biofilm (Kruppa i sur., 2004). Genetičke analize su pokazale da i blastokonidije i hife imaju ulogu u nastanku biofilma (Douglas, 2003). Uz formiranje micelija koji daje strukturni integritet biofilmu, važnu ulogu u tvorbi biofilma ima „quorum sensing“. Ovaj oblik međustanične komunikacije kontrolira staničnu gustoću, kompeticiju mikroorganizama za hranjivim tvarima te ima ulogu u infektivnom procesu, osobito kod širenja infekcija. Farnezol je primjer „quorum-sensing“ molekule koja ima utjecaj na stvaranje biofilma (Ramage i sur., 2002). Izloženost biofilma farnezolu utječe na gene vezane uz nastanak hifa, ali i gene vezane uz rezistenciju na lijekove, staničnu hidrofobnost, transport željeza i stres proteine (engl. heat shock proteins) (Casadevall, 2012).



**Slika 15.** Faze nastanka biofilma vrste *C. albicans* na polivinilkloridnoj (PVC) površini katetera: (a) adsorbirani proteini nositelja na površini katetera (označeno crnim točkama); (b) početna adhezija kvasca na površinu (označeno crveno); (c) stvaranje bazalnog sloja kvašćevih mikrokolonija; (d) stvaranje gornjeg sloja kojeg čine uglavnom germinirane stanice i izvanstanični matriks (označeno žuto) koji okružuje blastokonidije i hifalne stanice. Zreli biofilm sadrži brojne mikrokolonije prožete vodenim kanalima koji omogućuju dotok hranjivih tvari (preuzeto iz Douglas, 2013).

Iako većina (približno 90%) sojeva vrste *C. albicans* stvara vrstu biofilma nepropusnu za molekule niske i visoke molekularne mase te u koji ne mogu prodrijeti bijele krvne stanice, postoji i manji broj onih koji stvaraju propusan biofilm. Vrsta stvorenog biofilma određena je razlikom u jednom genetičkom lokusu (engl. mating loci) i kontrolirana različitim signalnim putevima (Yi i sur., 2011).

Velika učestalost *Candida* vrsta u ljudskoj kolenzalnoj mikrobioti olakšava njihov kontakt s implantiranim biomaterijalima i površinama nositelja. Utvrđeno je da ove vrste koloniziraju i stvaraju biofilm na medicinskim proizvodima poput stentova, proteza, implantata, endotrahealnih cijevi, pejsmejdera i katetera. Najviše se u svezu sa stvaranjem biofilma dovodi gljivična vrsta *C. albicans* (Ramage i sur., 2005). Prema Hawser i Douglasu (1994), nastanak biofilma ovisi i o vrsti materijala od kojih su načinjeni medicinski proizvodi. Najveći afinitet za stvaranje biofilma imaju materijali poput lateksa i silikonskog elastomera, a najmanji poliuretan i 100% silikon. Većina kliničkih manifestacija kandidoza je povezana sa stvaranjem biofilma i povećanom upotrebom različitih medicinskih proizvoda osobito u populaciji imunokompromitiranih pacijenata (Ramage i sur., 2009). Prema Finkel i Mitchellu (2011) razina smrtnosti kod ovih vrsta infekcija je 30%. Stvaranje biofilma dovodi i do visoke rezistencije navedenih stanica na antifungalnu terapiju. Utvrđeno je da je kod vrsta roda *Candida* biofilm i do 1000 puta veće rezistencije na većinu antimikotika, osobito iz skupine azola i poliena (Nett i sur., 2006). Biofilm može biti i polimikrobni odnosno sadržavati, uz endogenu mikrobiotu, i druge bolničke patogene što otežava dijagnozu i liječenje takvih vrsta infekcija. Kod sistemskih infekcija pronađene su zajednice stanica u kojima je vrsta *C. albicans* rasla zajedno s vrstama *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* (Harriot i Noverr, 2011) i *Gardnerella vaginalis* (Sardi i sur., 2013), a kod kožnih infekcija uz vrste *Candida* ustanovljena je u zajednici prisutnost vrsta rodova *Curvularia*, *Malessezia*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Engodontium* i *Trichophyton* (Harriot i Noverr, 2011). Također, kod plućnih infekcija je utvrđeno stvaranje zajednica stanica vrsta *C. albicans* i *Pseudomonas aeruginosa* pri čemu vrsta *P. aeruginosa* djeluje antagonistički i uzrokuje smrt vrste *C. albicans*.

## B) Mehanizmi rezistencije stanica u biofilmu

Rezistencija stanica u biofilmu na lijekove koji se koriste u antifungalnoj terapiji je određena s više čimbenika (Ramage i sur., 2005). Istraživanja su do sad razmatrala mogući utjecaj sljedećih faktora (Slika 16):

### (1) Izvanstanični matriks

Matriks može otežati pristup antimikotika do stanica koje se nalaze duboko u biofilmu na način da usporava brzinu prijenosa lijeka ili specifično stupa u interakciju s molekulama lijeka (Mah i sur., 2001; Baillie i sur., 1999). Nadalje, budući da matriks sadrži polisaharid  $\beta$ -1,3-glukan, utvrđeno je da tretiranje biofilma s  $\beta$ -1,3-glukanazom povećava osjetljivost stanica u biofilmu na djelovanje flukonazola, kao i da dodatak vanjskog  $\beta$ -1,3-glukana povećava toleranciju slobodnih stanica na flukonazol (Nett i sur., 2007). Prema Vedyappan i sur. (2010), ustanovljeno je da se  $\beta$ -1,3-glukani matriksa mogu specifično vezati na amfotericin B i onemogućiti djelovanje lijeka na stanice biofilma.

### (2) Dostupne hranjive tvari i brzina rasta

Za utvrđivanje utjecaja navedenog čimbenika napravljena su ispitivanja na biofilmu uzgojenom u fermentoru pri različitim brzinama rasta te je osjetljivost stanica u biofilmu na amfotericin B uspoređena s planktonskim stanicama uzgojenim pri istim brzinama rasta u kemostatu. Pri svim brzinama rasta, stanice u biofilmu su bile rezistentne na antimikotik za razliku od slobodnih stanica od kojih su samo one uzgojene pri nižim brzinama rasta pokazivale rezistenciju na amfotericin B (Baillie i sur., 1998). Također, rezultati nezavisne studije su pokazali da biofilmovi uzgojeni pri niskim brzinama rasta u uvjetima manjka glukoze i manjka željeza imaju nepromijenjeni stupanj rezistencije na amfotericin B (Baillie i sur., 1998).

### (3) Utjecaj efluks pumpi

Povećana ekspresija gena za membranske efluks pumpe može uzrokovati rezistenciju na lijekove za liječenje gljivičnih infekcija. Kod vrste *C. albicans* postoje dvije vrste efluks pumpi koje doprinose rezistenciji: ABC transporteri (engl. ATP binding cassette) koji uključuju efluks gene CDR1 i CDR2 koji su koregulirani i čija ekspresija se događa istovremeno (Staib i sur., 2001) te MF proteini (engl. major facilitator) koji uključuju gen MDR1 (Sardi i sur., 2011). Ekspresija gena za efluks pumpe kod slobodnih stanica događa se kao odgovor na antimikotike, za razliku od biofilma kod



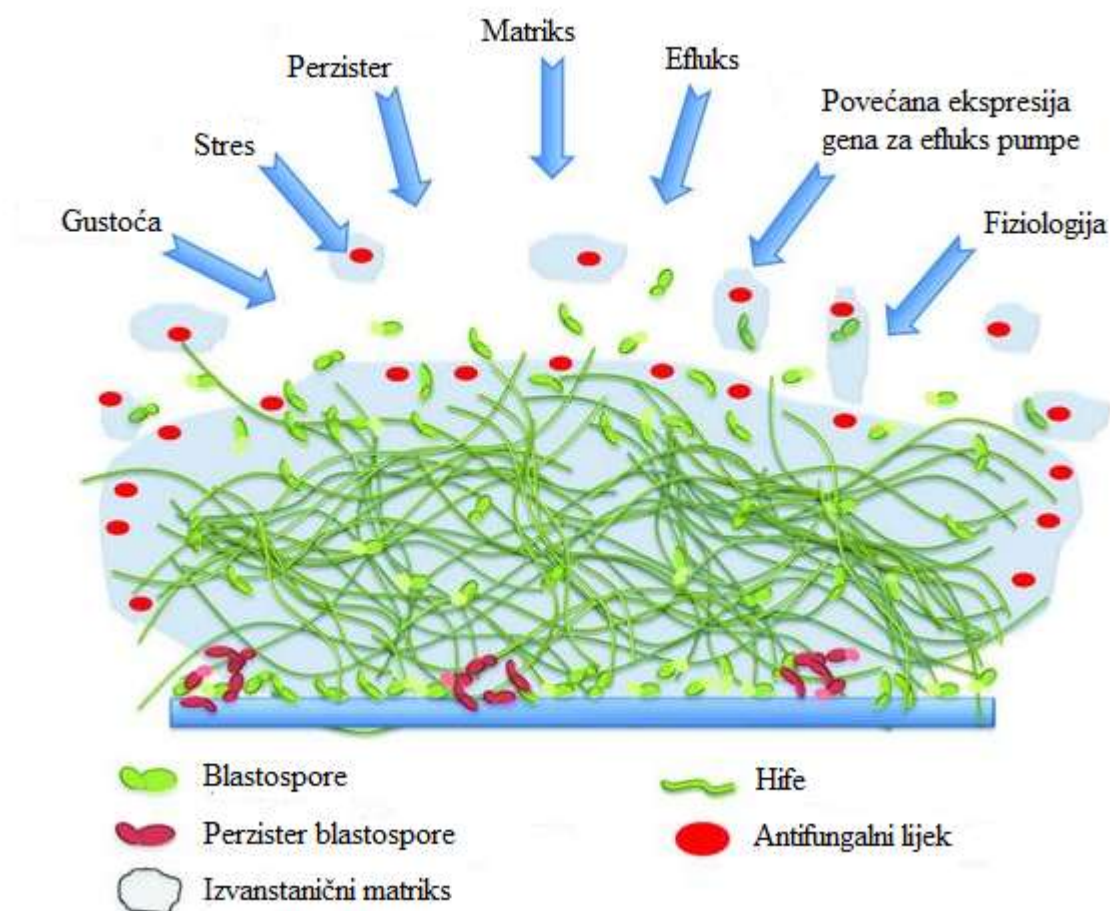
kojeg je povećana ekspresija prisutna već u fazi adhezije stanica i nastavlja se tijekom cijelog procesa nastanka biofilma, čak i u odsutnosti lijeka (Nobile i sur., 2012).

#### (4) Promjena membranskih sterola

Fungistatska svojstva azola u liječenju gljivičnih infekcija uzrokovanih vrstom *C. albicans* doprinose razvoju rezistencije preživjelih stanica. Povećana ekspresija ili točkaste mutacije gena ERG11 koji kodira za enzim 14 $\alpha$ -demetilazu utječu na biosintezu ergosterola. Utvrđena je 10 puta veća rezistencija na antimikotik kod stanica u biofilmu u usporedbi s planktonskim stanicama (Khot i sur., 2006).

#### (5) Perzister stanice

Visoka rezistencija stanica u biofilmu pripisuje se i postojanju tzv. perzister stanica čije obilježje je stanje metaboličkog mirovanja. Uslijed zaštite koju omogućuje izvanstanični matriks, ove stanice pokazuju veliku otpornost na antifungalne lijekove i mehanizme obrane nositelja (Mathe i sur., 2013). Prema LeFleur i sur. (2006) opisana je skupina stanica u biofilmu vrste *C. albicans* koje su vrlo tolerantne na amfotericin B čiji mehanizam rezistencije nije ovisio o ekspresiji efluks pumpi i sastavu stanične membrane. U navedenoj studiji perzister stanice su bile prisutne samo u biofilmu i nisu bile prisutne u planktonskim populacijama stanica. Nakon tretiranja biofilma amfotericinom B, nanovo je provedena inokulacija stanicama koje su preživjele tretman što je rezultiralo stvaranjem biofilma s novom subpopulacijom perzister stanica upućujući na zaključak da navedene stanice nisu mutantne vrste već fenotipske varijante divljeg tipa (Sardi i sur., 2013).



**Slika 16.** Shematski prikaz mehanizama rezistencije stanica vrste *C. albicans* u biofilmu (preuzeto i prilagođeno iz Ramage i sur., 2013).

#### 1.2.4.2. Kalcineurin

Kalcineurin je kalcij-kalmodulin ovisna serin/treonin fosfataza uključena u odgovor stanice na stresne uvjete preko MAPK signalne kaskade (MAPK – mitogenom-aktivirane protein-kinaze). Osim kod vrste *C. albicans*, značajna je u patogenezi gljivičnih patogena poput vrste *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* i drugih *ne-albicans* vrsta (Ramage i sur., 2012). Kod planktonskih stanica kalcineurin je kritičan za preživljenje stanica tretiranih azolima (Sanglard i sur., 2003). Inhibitori kalcineurina djeluju sinergistički s flukonazolom koji poprima fungicidno djelovanje što nudi novu terapijsku mogućnost u liječenju gljivičnih infekcija (Onyewu i sur., 2003). Također je utvrđeno, ispitivanjima na modelima biofilma u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, da kalcineurin ima ulogu u rezistenciji na azole (Uppuluri i sur., 2008). Rezistencija na azole i ehinokandine preko kalcineurina je regulirana proteinom Hsp90

(engl. heat shock protein) koji aktivira ovaj enzim stupajući u interakciju s katalitičkom podjedinicom kalcineurina. U mišjem modelu diseminirane infekcije uzrokovane vrstom *C. albicans*, inhibicija ekspresije gena za Hsp90 je smanjila virulenciju i pojačala terapijsku učinkovitost flukonazola. Inhibicija navedenog gena za Hsp90 je dovela do smanjenja kalcineurina kod planktonskih stanica, ali ne i stanica u biofilmu. Utvrđeno je smanjenje sadržaja glukana u matriksu koje predstavlja mogući mehanizam rezistencije stanica biofilma na azole (Robbins i sur., 2011).

#### 1.2.4.3. Stvaranje izvanstaničnih hidrolitičkih enzima

*Candida* vrste luče hidrolitičke enzime koji oštećuju staničnu membranu i olakšavaju prodor u stanice nositelja. Osim što imaju ulogu u razgradnji hranjivih tvari, smatra se da ovi enzimi sudjeluju u napadu na stanice i molekule imunološkog sustava nositelja (Schaller i sur, 2005; Silva i sur., 2011). Kod vrste *C. albicans* postoje tri skupine izvanstaničnih hidrolitičkih enzima, i to proteaze, fosfolipaze i lipaze (Sardi i sur., 2013).

##### 1.2.4.3.1. Aspartil-proteaze

Poznato je deset aspartil-proteaza koje nastaju ekspresijom SAP gena i imaju značajnu ulogu u virulenciji kod vrste *C. albicans*. Doprinos ovih enzima infekciji uzrokovanoj vrstom *C. albicans* potvrđen je u ispitivanjima u kojima su korišteni SAP-deficijentni mutantni sojevi i inhibitori proteaza. Ustanovljeno je da su različiti SAP geni važni za mukozne i sistemske infekcije, te da su uključeni u adherenciju, oštećenje tkiva i izbjegavanje imunološkog odgovora nositelja (Hube i Naglik, 2001). Sap proteini su prisutni i kod drugih *Candida* vrsta, poput *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. guilliermondii* (Zaugg i sur., 2001). Utvrđena je povezanost između povećane sinteze i aktivnosti ovih hidrolitičkih enzima i porasta virulentnosti vrste *C. albicans* koja dovodi do kliničkih simptoma kandidoze (Bramono i sur., 2006; Ingham i sur., 2012). Ekspresija gena SAP1, SAP3, SAP4, SAP7 i SAP8 je dovedena u svezu s oralnom infekcijom, dok je ekspresija SAP1, SAP3 i SAP6-8 povezana s infekcijom rodnice. Sap7 nije utvrđen u ispitivanjima provedenim u *in vitro* uvjetima, iako je utvrđena njegova prisutnost u kliničkim uzorcima. Ispitivanja ekspresije SAP gena provedena *ex vivo* i na životinjskim modelima su pokazala da je ekspresija određenih proteaza iz Sap obitelji ovisna o fazi i tipu infekcije (Brown i sur., 2007).

#### 1.2.4.3.2. Fosfolipaze i lipaze

Fosfolipaze vrste *C. albicans* mogu se podijeliti na četiri skupine (A, B, C i D). Samo fosfolipaze iz skupine B su izvanstanične i doprinose patogenosti ove gljivične vrste putem oštećenja stanične membrane nositelja. Ibrahim i sur. (1995) su utvrdili da je stvaranje fosfolipaza kod sojeva vrste *C. albicans* izoliranih iz krvi veće u usporedbi s komenzalnim izolatima. Izolat koji je imao visoku aktivnost izvanstaničnih fosfolipaza je bio invazivan na mišjem modelu i uzrokovao je visoku smrtnost. Dodatno, mutirani sojevi bez fosfolipaza plb1 (Leidich i sur., 1998) i plb5 (Theiss i sur., 2006) su pokazali manju virulentnost na mišjem modelu sistemske infekcije. Ekspresija fosfolipaze B je ustanovljena kod mukoznih, gastrointestinalnih i sistemskih modelnih infekcija (Brown i sur., 2007).

Mikrobne izvanstanične lipaze imaju ulogu u razgradnji lipida u svrhu opskrbe mikroorganizma s hranjivim tvarima, adheziji na stanice i tkiva nositelja te pokretanju nespecifičnih upalnih procesa djelovanjem na stanice imunološkog sustava i samoobranu putem lize kompetitivne mikrobiote (Sardi i sur., 2013). Kod vrste *C. albicans* postoji 10 izvanstaničnih lipaza (LIP 1-10) (Mayer i sur., 2013). Gacser i sur. (2007) su utvrdili da inhibitori lipaza značajno smanjuju oštećenje inficiranog ljudskog tkiva. Također je ustanovljeno da Lip8 mutant ima smanjenu virulenciju na mišjem modelu sistemske infekcije što potkrjepljuje tvrdnju da ovi enzimi imaju ulogu u patogenosti vrste *C. albicans*.

### 1.2.5. Mehanizmi imunološkog odgovora na kandidoze

U svrhu zaštite od infekcije, imunološki sustav čovjeka koristi složene urođene (nespecifične) i stečene (specifične) mehanizme obrane. Nespecifična otpornost uključuje anatomske prepreke kože i sluznice, fiziološke prepreke (temperatura, sadržaj kisika ili pH u tkivima, mikrobiocidne tvari u izvanstaničnoj tekućini, lizozim, interferon, sustav komplementa, beta-lizin, C-reaktivni protein i dr.), stanične mehanizme, osobito fagocite (monocitno-makrofagna loza, neutrofilni leukociti) i stanice NK te upalnu reakciju koja prethodi specifičnoj imunološkoj reakciji. Specifična otpornost je posredovana antitijelima i citotoksičnim limfocitima te je usmjerena na određeni antigen. Patogeni poput vrste *C. albicans* su razvili brojne načine interferiranja, kontroliranja ili izbjegavanja ljudskih obrambenih mehanizama što posljedično može rezultirati infekcijom i razvojem bolesti (Luo i sur., 2013) (Slika 17). Prelasku ove oportunističke vrste u invazivni oblik pogoduje: (1) narušavanja ravnoteže mikrobiote, (2) oštećenja anatomske prepreke nositelja i/ili (3) imunosupresija.

Značajnu ulogu u zaštiti vrste *C. albicans* protiv imunoloških mehanizama nositelja te čimbenika okolišnog stresa ima stanična stijenka. Strukturu stanične stijenke čini mreža polisaharida s uklopljenim glukanima ( $\beta$ -1,3- i  $\beta$ -1,6-), hitinom, GPI proteinskim sidrima i manoproteinima (Chaffini i sur., 1998). Stanična stijenka ima nekoliko važnih funkcija u preživljavanju gljivice kod imunokompetentnog nositelja kao i u razvoju infekcije, i to: (1) nosi značajne antigenske determinante, (2) stvara kontakt sa stanicama nositelja, plazmom i tjelesnim tekućinama, (3) posreduje u adherenciji patogena na površine nositelja i (4) omogućuje interakciju s nositeljem (Luo i sur., 2013).

Kod mukokutanih kandidoza, adhezin kandidate INT1p prepoznaje specifičnu RGD sekvencu (arginin-glicin-aspartatna kiselina) prilikom adhezije na površine nositelja (Hostetter, 2000). Mehanizmi obrane nositelja uključuju zaštitu mukoznog sloja i cilija, brojne antimikrobne peptide,  $\beta$ -defenzine i katelicidine u koži, demicidin u znoju, lizozime, laktoferin, inhibitor leukoproteaze i defenzine u nosu i plućima kao i lučenje antitijela. U obrani protiv mukokutane kandidoze neophodni su i funkcionalni T-limfociti što je utvrđeno ispitivanjima osoba oboljelih od djelomične ili selektivne deficijencije T-limfocita (Erdős i sur., 2017).

Gastrointestinalna kolonizacija s vrstom *C. albicans* inducira nastanak antitijela i aktivaciju mukoznih T-limfocita. Antitijela protiv manana, uglavnom IgG te u manjoj

mjeri IgM i IgA pronađena su u većini zdravih ljudi (Faux i sur., 1992). Osim što kao opsonini posreduju u vezanju gljivičnih stanica na Fc-gama receptor, cirkulirajuća antitijela usmjerena protiv manana vrste *C. albicans* imaju ulogu u prijenosu C3 komponente komplementa na površinu gljivice pokretanjem puta aktivacije (Zhang i Kozel, 1998).

Istraživanjima kongenitalne deficijencije komplementa prikupljeni su podaci o ulozi sustava komplementa u invazivnim kandidozama. Utvrđeno je da osobe s navedenim genetičkim poremećajima nisu imale povećan rizik za razvoj gljivične infekcije. Dodatno je također utvrđeno da je i kod osoba s kroničnom granulomatoznom bolesti učestalost invazivnih kandidoza vrlo nizak. Prema Koh i sur. (2008), budući da invazivna kandidoza uglavnom nastaje kao posljedica endogene infekcije, integritet crijevne barijere može pružati dostatnu zaštitu od invazivne kandidoze. Učinak C3 komponente komplementa u infekcijama uzrokovanim vrstom *C. albicans* uglavnom se dovodi u vezu s otkrićem da opsonizacija C3b na  $\beta$ -1,6-glukanu dovodi do pojačane fagocitoze (Rubin-Bejerano i sur., 2007). Prema Sonesson i sur. (2007), cijepanjem komponente C3a nastaju manji peptidi koji imaju antifungalnu aktivnost što doprinosi djelovanju C3. Nadalje, miševi koji nemaju funkcionalni gen za C5 komponentu komplementa imaju veliku osjetljivost na invazivne *C. albicans* infekcije (Ashman i sur., 1993). Deficijencija C5 je u svezi s povišenim razinama pro-upalnih citokina uključujući TNF- $\alpha$  i IL6 te širenjem gljivične infekcije u mnogim organima što posljedično može dovesti do srčanog zastoja (Mullick i sur., 2004, 2006). Proteolitičkim cijepanjem komponente C5 nastaju podjedinice C5a i C5b. C5a je anafilatoksin s jakim pro-upalnim djelovanjem koji aktivira mnoge imunološke stanice uključujući monocite/makrofage i neutrofile koji imaju značajnu ulogu u odgovoru protiv vrste *C. albicans* (Laursen i sur., 2012).

Središnju ulogu u odgovoru protiv vrste *C. albicans* imaju neutrofili. Ove stanice se oslanjaju na brojne antimikrobne efektorske mehanizme uključujući stvaranje reaktivnih kisikovih međuspojeva (ROI, engl. reactive oxygen intermediates), fagocitozu, oslobađanje granula s enzimima, oslobađanje antimikrobnih peptida te nastanak neutrofilnih izvanstaničnih zamki (NET, engl. neutrophil extracellular traps) (McKenzie i Schreiber, 1998; Brinkmann i sur., 2004; Quinn i Gauss, 2004; Segal, 2005; Fuchs i sur., 2007). Neutrofili prepoznaju, vežu se i oštećuju hife vrste *C. albicans* te sudjeluju u regulaciji gljivičnog transkriptoma u ljudskoj krvi na način da induciraju odgovor stanice koji se javlja pri uvjetima manjka ugljikohidrata i dušika te

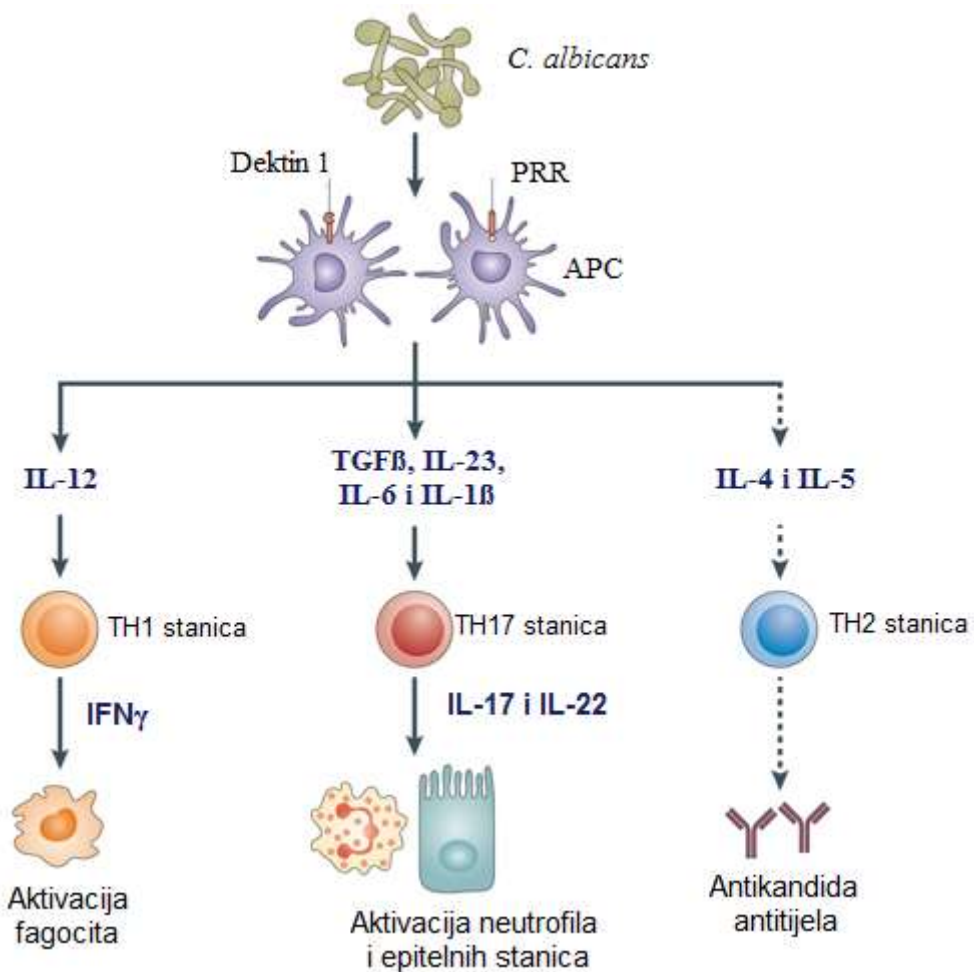
oksidativnog stresa (Miramon i sur., 2012). Također, neutrofilni pokazuju morfološki specifičnu aktivaciju koja se javlja kao odgovor na germinirani oblik vrste *C. albicans* (Wozniok i sur., 2008).

Nakon ingestije kandida, fagociti djeluju fungicidno stvaranjem reaktivnih kisikovih, dušikovih i kloridnih spojeva. Djelovanjem NADPH oksidaze nastaju superoksidi ( $O_2^-$ ) koji su neznatno toksični, ali mogu prijeći u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksilni radikal ( $HO^\cdot$ ) koji imaju kandidacidno djelovanje. U granulama neutrofila i lizosomima monocita nalaze se enzimi mijeloperksidaze (MPO) koje kataliziraju pretvorbu vodikovog peroksida u hipoklornu kiselinu (HClO) koja je vrlo toksična za kandidate. Također, stvaranje dušikova oksida je katalizirano sintazom preko oksidativne deaminacije L-arginina. Reakcijom dušikova oksida i superoksida nastaje peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) koji ima jako fungicidno djelovanje (Dühring i sur., 2015).

Važna uloga MPO enzima u fungicidnom djelovanju je poduprijeta *in vitro* ispitivanjima u kojima je utvrđeno da MPO-obogaćeni ljudski monociti imaju značajno bolje fungicidno djelovanje nego makrofagi potekli od monocita koji imaju malo MPO enzima. Dodatno, primjenom rekombinantnog ljudskog MPO uočeno je značajno bolje djelovanje makrofaga protiv kandidate.

Nasuprot značaju koji ima specifični imunitet posredovan T-limfocitima u zaštiti protiv mukokutane kandidoze, urođeni mehanizmi obrane, osobito fagocitne stanice, imaju ključnu ulogu u eliminaciji kandidate kod sistemskih infekcija. Navedeno je dokazano ispitivanjima neutropenije i genetičkih poremećaja fagocitne aktivnosti (Erdős i sur., 2017).

Kako bi izbjegla imunološku obranu nositelja, vrsta *C. albicans* koristi različite mehanizme: (1) sposobnost adheriranja i kolonizacije epitelnih površina (Zakikhany i sur., 2007, 2008), (2) kontrolu aktivacije komplementa vezanjem regulatora komplementa poput Factor H, FHL-1, C4BP i plazminogena iz ljudske plazme na svoju površinu (Luo i sur., 2013) te (3) invaziju tkiva stvaranjem enzima, kao i putem morfogeneze (Meiller i sur., 2009). Nakon vezanja regulatora komplementa, vrsta *C. albicans* luči hidrolitičke enzime aspartil-proteaze (Sap, engl. secreted aspartyl protease) koji razgrađuju i inaktiviraju komponente ljudskog komplementa C3b, C4b i C5 (Gropp i sur., 2009). Ova gljivična vrsta luči i proteine poput Pra1 koji direktno blokiraju aktivaciju komplementa (Luo i sur., 2010).



**Slika 17.** Shematski prikaz imunološkog odgovora na infekciju vrstom *C. albicans* prema Cassone (2013). Infekcija vrstom *C. albicans* započinje prepoznavanjem i interakcijom između *C. albicans* specifičnih PAMP „obrazaca“ (engl. pathogen-associated molecular pattern) i PRR receptora nositelja (engl. pattern recognition receptors), i to uglavnom TLR (engl. toll-like receptors) i CLR receptora (engl. C-lectin-like receptors). Dektin 1 prepoznaje  $\beta$ -glukane iz stanične stijenke vrste *C. albicans*. Slijedi stvaranje citokina i diferencijacija pomoćnih TH stanica (TH1, TH2 i TH17) u pokrenutoj kaskadi staničnih događaja. Interleukini IL-12 i IL-23 imaju značajne uloge u diferencijaciji i aktivaciji stanica imunološkog sustava. Aktivacija T-limfocita dovodi do upalnog odgovora te posljedično pokretanja humoralnih i staničnih čimbenika nespecifične imunosti (uključujući peptide, neutrofile i makrofage) i stvaranja specifičnih antitijela. APC – antigen-prezentirajuće stanice (engl. antigen presenting cells),  $\text{IFN}\gamma$  – interferon  $\gamma$ ,  $\text{TGF}\beta$  – transformacijski faktor rasta (engl. transforming growth factor) (preuzeto i prilagođeno iz Cassone, 2013).



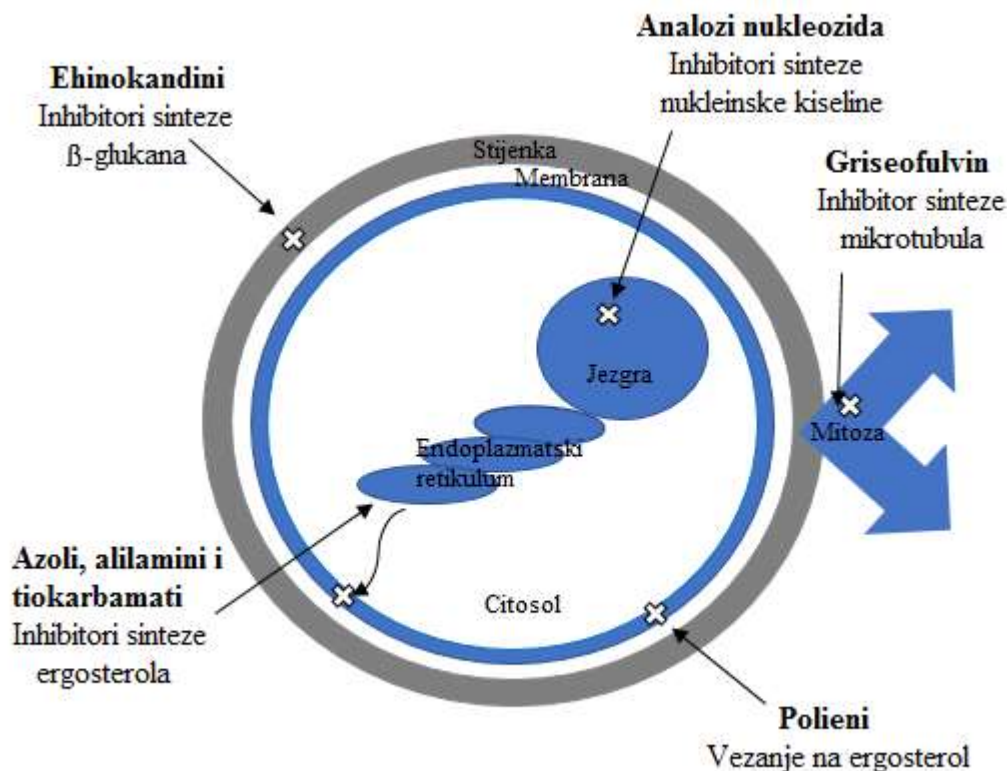
Vrsta *C. albicans* sadrži površinske obrasce tzv. MAMP (engl. microbe-associated molecular pattern) putem kojih izbjegava prepoznavanje od strane fagocita. U germiniranom obliku, površinski manani vrste *C. albicans* štite  $\beta$ -glukan iz stanične stijenke od prepoznavanja od strane ljudskog PRR receptora (engl. pattern recognition receptor) dektina-1 te posljedično fagocitoze (Chai i sur., 2009).

Nadalje, vrsta *C. albicans* također modulira otpuštanje citokina i interferira s citokin-receptor interakcijama korištenjem višestrukih mehanizama. Na primjer, hife vrste *C. albicans* mogu izbjeći prepoznavanje od strane TLR4 receptora (engl. toll-like receptor) što dovodi do inhibicije Th1 posredovanog pro-upalnog otpuštanja citokina. Dodatno, može doći do TLR2 posredovanog Th2 odgovora koji inducira protupalne citokine, poput IL-10, i posljedično dolazi do inhibicije aktivacije makrofaga i brzog otpuštanja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) (Netea i sur., 2004; Luo i sur., 2013).

### 1.2.6. Antimikotici i mehanizam njihovog djelovanja

Antimikotici za liječenje gljivičnih infekcija se mogu podijeliti prema načinu njihovog djelovanja na (Bondaryk i sur., 2013; Perea i Patterson, 2002) (Slika 18):

- inhibitore RNA i/ili DNA sinteze (flucitozin),
- modulare membranske funkcije (polieni: nistatin, natamicin, amfotericin B),
- modulare biosinteze stanične stijenke putem inhibicije  $\beta(1,3)$ -glukan sintaze (ehinokandini: kaspofungin, mikafungin i anidulafungin),
- inhibitore biosinteze ergosterola putem inhibicije skvalen epoksidaze i/ili nakupljanja toksičnog međuprodukta sterola (alilamini: terbinafin, naftifin),
- inhibitore lanosterol demetilaze u biosintezi ergosterola (azoli).



**Slika 18.** Mehanizmi djelovanja nekih antimikotika (preuzeto i prilagođeno iz Spampinato i Leonardi, 2013).

## I. Flucitozin

Flucitozin je fluorirani derivat citozina koji se koristi u liječenju kandidoza. Mehanizam djelovanja se sastoji u pretvorbi ovog spoja unutar stanice u 5-fluorouracil. Fluorouracil se ugrađuje u stanični RNA čime onemogućuje sintezu gljivičnih proteina a ujedno inhibira DNA djelovanjem na enzim timidilat sintetazu. Za ulazak flucitozina u stanicu neophodan je enzim citozin permeaze. Pretvorbu u 5-fluorouracil vrši enzim citozin deaminaza, dok se daljnja pretvorba u 5-fluorouridin monofosfat (5-fluoroUMP) događa posredstvom enzima uracil-fosforiboziltransferaze. Većina micelarnih gljivičnih vrsta nema potrebne enzime stoga je primjena flucitozina ograničena na određene patogene vrste (*Candida* vrste, *Cryptococcus neoformans*) (Odds i sur., 2003). Do sada je rezistencija na flucitozin utvrđena u *in vitro* uvjetima na 3-10% izolata *C. albicans*. 30% izolata razvilo je rezistenciju tijekom terapije s navedenim lijekom (Bondaryk i sur.,

2013). Flucitozin se uglavnom primjenjuje u kombiniranoj antibiotskoj terapiji budući da je utvrđena visoka učestalost pojave primarnih i sekundarnih rezistencija (Pfaller i sur., 2002; Odds i sur., 2003).

## II. Polieni

Polieni su makrolidni antimikotici prstenaste strukture koje proizvode *Streptomyces* vrste. Ovi lijekovi se vežu na sterole u staničnim membranama (ergosterol u gljivičnim stanicama i kolesterol u ljudskim stanicama) čime uzrokuju oštećenje njene funkcije te posljedično veću propusnost membrane i gubitak staničnog sadržaja (Larson i sur, 2000). Glavni predstavnici ove skupine su nistatin, natamicin i amfotericin B. Amfotericin B je lijek širokog spektra djelovanja koji se koristi u liječenju infekcija uzrokovanih patogenim vrstama poput *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cryptococcus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Trichosporon* spp., *Scedosporium* spp. i *Malassezia* spp. (Vandeputte i sur., 2012). Ovaj antimikotik se godinama koristi za liječenje sistemskih mikoza. Veći afinitet amfotericina B za gljivični ergosterol u usporedbi s kolesterolom u membranama ljudskih stanica se može objasniti konformacijskim razlikama dviju molekula. Antifungalna selektivnost amfotericina B za ergosterol se pripisuje osim navedenoj konformacijskoj razlici i većem omjeru sastavnica ergosterol:fosfolipidi kod gljivica. Budući da je navedena selektivnost niska, amfotericin B ima toksičan učinak i na ljudske stanice osobito uzrokujući nefrotoksičnost (Brajtburg i sur., 1974). Kako bi se smanjio toksičan učinak ovog antimikotika razvijene su nove formulacije. Najuspješnijim su se pokazale formulacije lipidnih kompleksa s amfotericinom B (liposomi) (Dupont, 2002). Drugi predstavnik ove skupine, nistatin, ima uglavnom topikalnu primjenu zbog visoke toksičnosti. Koristi se u liječenju infekcija uzrokovanih *Candida* vrstama (Martins i sur, 2012). Natamicin ima također topikalnu primjenu i koristi se u liječenju površinskih mikoza oka. Djelotvoran je protiv gljivica i plijesni (Vandeputte i sur., 2012).

## III. Azoli

Ovu skupinu spojeva karakterizira peteročlani azolni prsten, te se s obzirom na broj dušika u navedenom prstenu mogu klasificirati u dvije skupine: imidazoli i triazoli. Klinički značajni imidazoli su klotrimazol, mikonazol i ketokonazol. Među triazole se ubrajaju flukonazol, vorikonazol, itrakonazol i posakonazol. Azolni antifungalni

lijekovi imaju fungicidno djelovanje protiv *Aspergillus* spp. i fungistatsko djelovanje protiv *Candida* spp. (Robbins i sur., 2011). Mehanizam djelovanja azola se sastoji u inhibiciji djelovanja enzima citokrom P450-Erg11p odgovornog za 14 $\alpha$ -demetilaciju lanosterola iako u nekih gljivičnih vrsta mogu inhibirati i sljedeći  $\Delta$ 22-desaturacijski korak. Posljedično dolazi do zamjene ergosterola s neuobičajenim sterolima što uzrokuje promjenu permeabilnosti i fluidnosti stanične membrane (Kelly i sur., 1997). Usljed mutacija i povećane ekspresije membranskih efluks pumpi pojavila se rezistencija na azole. Oba mehanizma rezistencije utvrđena su kod izolata vrste *C. albicans*. U studiji koju su proveli Ramesh i sur. (2011) utvrđena je rezistencija kod kliničkih izolata vrste *C. albicans* izoliranih iz usne šupljine pacijenata s HIV infekcijom u rasponu od 11,9% do 41,1% ovisno o vrsti ispitivanog azola. Triazoli, flukonazol i itrokonazol zamijenili su amfotericin B u liječenju određenih vrsta sistemskih infekcija. Osim navedenih antimikotika, širok spektar djelovanja u liječenju gljivičnih infekcija imaju vorikonazol i posakonazol. Vorikonazol pokazuje fungicidno djelovanje i protiv nekih micelarnih vrsta (Espinell i sur., 2001). Također ima antifungalno djelovanje protiv teških infekcija uzrokovanih vrstama roda *Fusarium* i *Scedosporium*, ali njegovu primjenu ograničava interakcije s mnogim lijekovima (Ghannoum i Kuhn, 2002).

#### IV. Ehinokandini

Ehinokandini su skupina semisintetskih lipopeptidnih lijekova dobivenih iz prirodnih lipopeptida koje stvaraju gljivične vrste *Aspergillus rugulovalvus*, *Zalerion arboricola* i *Papularia sphaerosperma* (Vandeputte i sur., 2012; Petraitiene i sur., 1999). U ovu skupinu ubrajamo anidulafungin, kaspofungin i mikafungin koji se isključivo primjenjuju intravenskom injekcijom što ograničava njihovu upotrebu (Vanden, 2002). Ovi antimikotici pokazuju fungicidno djelovanje protiv vrste *C. albicans* (uključujući *Candida* vrste rezistentne na terapiju azolima) i fungistatsko djelovanje protiv *Aspergillus* spp. Nemaju široki spektar djelovanja te nisu djelotvorni protiv patogena poput *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Scedosporium* i *Fusarium* vrsta (Kanafani i sur., 2008; Denning, 2003; Ripeau i sur., 2002). Mehanizam djelovanja se sastoji u inhibiciji enzima 1,3- $\beta$ -glukan sintaze koji je odgovoran za sintezu značajne komponente stanične stijenke 1,3- $\beta$ -glukana. Nedostatak ovog glukana uzrokuje osmotsku nestabilnost i posljedično lizu stanica (Odds i sur., 2003). 1,3- $\beta$ -glukan sintaza sadrži dvije

podjedinice, regulatornu podjedinicu Rho1p i aktivno mjesto enzima Fksp (Bal, 2010). Rezistencija na ehinokandine posljedica je mutacije FKS gena (Cannon i sur., 2009). Utvrđeno je da lijek ne izbacuje iz stanice niti jedna od poznatih efluks pumpi (Odds i sur., 2003).

## V. Ostali antimikotici

Od drugih antimikotika koji se koriste u liječenju mikoza potrebno je navesti terbinafin i naftifin koji pripadaju skupini alilamina. Ovi antifungalni lijekovi pokazuju fungicidno djelovanje protiv dermatofita i fungistatsko djelovanje protiv vrste *C. albicans* (Brennan i Leyden, 1997). Alilamini utječu na biosintezu ergosterola na način da se vežu na enzim skvalen epoksidazu (Erg1) što dovodi do nakupljanja skvalena u stanici i inhibicije biosinteze ergosterola. Navedeno uzrokuje povećanu propusnost stanične membrane i posljedično smrt stanice (Odds i sur., 2003). Terbinafin se može primijeniti za sistemske i topikalne infekcije te se osobito koristi u liječenju gljivičnih infekcija kože, noktiju i kose (Gauwerky i sur., 2009; Ghannoum i Elewski, 1999). Utvrđeno je sinergističko djelovanje terbinafina s drugim antimikoticima (Odds i sur., 2003). Ghannoum i Elewski (1999) su pokazali da je kod orofaringealne kandidoze čije je liječenje flukonazolom bilo neuspješno, učinkovita bila terapija terbinafinom u kombinaciji s flukonazolom. Također, *in vitro* studijom je utvrđeno da terbinafin ima jako fungicidno djelovanje na gljivične vrste rezistentne na itrakonazol (Hazen, 1998). Utvrđena je rezistencija na terbinafin uslijed zamjene jedne aminokiseline u Erg1p (Cannon i sur., 2009; Osborne i sur., 2006). U studiji koju su proveli Odds i sur. (2009) ustanovljeno je da je mehanizam rezistencije na alilamine isti kao i mehanizam rezistencije na azole posredovan efluks pumpama. Za topikalno liječenje površinskih mikoza koristi se i amorolfin koji pripada skupini fenilmorfolina te inhibira sintezu sterola djelovanjem na enzime Erg24p ( $\Delta^{14}$  reduktaza) i Erg2p ( $\Delta^8$ - $\Delta^7$  izomeraza) (Odds i sur., 2003). Ograničeno djelovanje na liječenje mikoza uglavnom uzrokovanih dermatofitima, ima griseofulvin čiji se antifungalni učinak objašnjava kroz njegovu interferenciju sa staničnim mikrotubulima (Odds i sur., 2003).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Ekstrakt lista masline (*Olea europaea* L.) je poznat po svojim brojnim biološkim učincima i ima široku primjenu u narodnoj medicini mediteranskih zemalja. Kroz povijest su list masline i njegov ekstrakt korišteni u komplementarnoj i alternativnoj medicini zbog svog antimikrobnog djelovanja osobito kod virusnih infekcija. 2011. godine objavljena je biljna monografija Povjerenstva za biljne lijekove pri Europskoj agenciji za lijekove (EMA) za *Olea europaea* L., folium. U literaturi postoje podaci iz polovice 20 stoljeća koji pripisuju biološke učinke masline gorkoj tvari izoliranoj iz lišća i nazvanoj oleuropein. Provedena su ispitivanja u *in vitro* i *in vivo* uvjetima kojima je potvrđeno da oleuropein ima antioksidativno, kardioprotektivno, neuroprotektivno i antikancerogeno djelovanje. Oleuropein je pokazao i antibakterijsko djelovanje protiv bakterija poput *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas solanacearum* kao i inhibitornu aktivnost protiv mikoplazmi. Budući da su ograničeni podaci o antifungalnom učinku ovog iridoida, kroz ovo istraživanje ispitat će se hipoteza kojom se želi potvrditi da oleuropein pokazuje i protugljivično djelovanje na medicinski značajnoj vrsti roda *Candida* spp. Potreba ove vrste istraživanja proizlazi iz povećane incidencije mikoza od kojih je najčešći uzročnik invazivne gljivične infekcije vrsta *C. albicans*. Iako je *C. albicans* prisutna kod ljudi kao dio endogene mikrobiote, u određenim uvjetima može prijeći u invazivni oblik i postati patogena. Oslabljeni imunološki sustav organizma uslijed različitih oboljenja, upotreba katetera te primjena antibiotika širokog spektra doprinose razvoju ovih vrsta infekcija. Nadalje, pojava rezistentnih sojeva, ograničeni broj antimikotika i njihovo toksično djelovanje potaknuli su istraživanja novih potencijalnih terapeutika. Stoga je prvenstveno cilj ovog istraživanja provođenje *in vitro* testova kojima će se ispitati učinak oleuropeina, njegovog razgradnog produkta hidroksitirosola i vodenog ekstrakta maslinova lista na staničnu vijabilnost vrste *C. albicans*.

Povijesno se smatralo da gljivice pasivno sudjeluju u procesu patogeneze i da je imunokompromitirani nositelj jedini mehanizam odgovoran za razvoj oportunističke infekcije. Danas je promijenjen koncept shvaćanja patogeneze prilikom razvoja gljivične infekcije te je poznato da je patogenost vrste određena virulentnim čimbenicima. Virulentni čimbenik predstavlja mikrobn mehanizam agresije koji nanosi štetu nositelju. Temeljem navedenog, definiran je dodatni cilj ovog istraživanja kojim će se ispitati učinak oleuropeina i hidroksitirosola na najznačajnije virulentne čimbenike vrste *C. albicans*. Među najznačajnije čimbenike ubraja se polimorfizam, svojstvo koje omogućuje nekim gljivicama rast u više vegetativnih oblika poput blastokonidija, pseudohifa i hifa. Promjena morfologije u hifalni oblik ima značajnu ulogu u mnogim procesima vezanim uz virulenciju poput kolonizacije, diseminacije u tkiva, adhezije na staničnu površinu nositelja i stvaranje biofilma. Većina

infekcija uzrokovanih gljivicom *C. albicans* dovodi se u vezu s rastom biofilma, stoga će se osim učinka na germinaciju induciranu u uvjetima staničnog gladovanja ispitati učinak oleuropeina i hidroksitirosola na stvaranje biofilma. Nadalje, važnu ulogu u interakciji između patogena i nositelja ima stanična stijenka. Proteini stanične stijenke su glikozilirani i imaju negativno nabijene fosfatne skupine u polisaharidnim bočnim lancima koje utječu na elektrostatski naboj te na staničnu površinsku hidrofobnost koja se dovodi u svezu s adherencijom vrste *C. albicans* na biomaterijale i smatra se čimbenikom povezanim s gljivičnom patogenošću. Osim učinka na navedeni čimbenik, provest će se određivanja inhibitornog djelovanja ispitivanih tvari na hidrolitičke enzime koje luči vrsta *C. albicans*, među kojima su najznačajniji aspartil-proteaze koje nastaju ekspresijom SAP gena. Ovi enzimi oštećuju staničnu membranu i olakšavaju prodor u stanice nositelja. Osim što razgrađuju hranjive tvari, sudjeluju također u napadu na stanice i molekule imunološkog sustava nositelja. Kako bi se objasnili mehanizmi djelovanja oleuropeina i njegovog derivata hidroksitirosola, postavljen je dodatni cilj kojim će se ispitati kroz *in vitro* testove mehanizmi antifungalnog učinka. Ispitat će se kako se djelovanje ovih tvari odražava na oštećenja stanične stijenke, stanične membrane, kao i na citoplazmatski sadržaj. Ergosterol je glavna sterolna komponenta gljivične stanične membrane i ima ulogu u održavanju staničnog integriteta i funkcije. Mnogi antimikotici poput polienskog amfotericina B i azola djeluju kao inhibitori biosinteze ergosterola. Stoga će se osobit naglasak dati ispitivanju modulacije ergosterola u staničnoj membrani gljivične vrste pod utjecajem oleuropeina i hidroksitirosola. U drugoj fazi istraživanja ispitat će se dodatna hipoteza kojom se želi potvrditi da oleuropein pokazuje antigenotoksične učinke na humanim limfocitima *ex situ*. Izuzev testova kojim se utvrđuju učinci određene tvari na gljivičnu vrstu, neophodno je provesti testove kojim će se ispitati eventualni citotoksični i genotoksični učinci na stanice nositelja. Ispitivanje protektivnog djelovanja oleuropeina i njegovog derivata hidroksitirosola na limfocitima periferne krvi čovjeka *ex situ* provest će se kometnim testom. Oštećenja DNA inducirat će se s  $H_2O_2$  koji inducira kromosomske aberacije, mutacije gena i jednolančane lomove u DNA molekuli te usporedno s bleomicinom koji uzrokuje jednolančane i dvolančane lomove DNA molekule. Kometni test je izabran za provedbu analize s obzirom da je to vrlo osjetljiva metoda kojom je moguće detektirati obje vrste lomova u DNA molekuli. Dodatno će se provesti ispitivanja antioksidativnog djelovanja oleuropeina i hidroksitirosola ABTS metodom te mjerenje aktivnosti navedenih antioksidansa na redukciju metalnih iona FRAP i CUPRAC metodom.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3. Materijali i metode

#### Gljivični sojevi *Candida* vrste

U istraživanju su korišteni gljivični sojevi vrste *C. albicans* ATCC 10231, klinički izolati *C. albicans* (br. soja: MFBF 11103, MFBF 10351, MFBF 10353, MFBF 10354, MFBF 10422, MFBF 10424, MFBF 10425, MFBF 10774, MFBF 10775, MFBF 10781, MFBF 10783, MFBF 10784, MFBF 10799, MFBF 10802, MFBF 11099 i MFBF 11101), druge vrste roda *Candida* (*C. dubliniensis* MFBF 10837, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. kefyr* ATCC 2512, *C. curvata* MFBF 10827) uzeti iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### Ispitivane tvari

Ispitivanja antifungalnog i antigenotoksičnog učinka provedena su s tvarima oleuropeinom (Extrasynthese, Francuska), stupnja čistoće (HPLC)  $\geq 90\%$  hidrositiosolom (Extrasynthese, Francuska), stupnja čistoće (HPLC)  $\geq 90\%$  i komercijalnim ekstraktom maslinova lista (Magdis d.o.o., Hrvatska).

Ostali korišteni materijali, osim ako nije drugačije navedeno, kupljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, SAD).

#### Priprema radnih otopina ispitivanih tvari

Radne otopine oleuropeina i hidrositiosola pripremljene su otapanjem tvari u fosfatnom puferu PBS pH 7,4 (Gibco, Life Technologies, SAD). Koncentracija radnih otopina iznosila je 50 mg/ml za obje tvari. Pripremljene otopine čuvane su na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Priprema ekstrakta maslinova lista

Ekstrakt lista masline dobiven je iz osušene i usitnjene biljne droge. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je sterilna destilirana voda. Mješavina je stavljena 45 minuta u vodenu kupelj na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  i ostavljena stajati kroz 15 dana. Potom je iscrpina filtrirana preko grubog, naboranog, filter papira. Dobiveni filtrat uparen je do suha pomoću vakuum uparivača (Leborota 4000 Efficient, Njemačka).

Polifenolni sastav ekstrakta analiziran je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

### 3.1. Analiza polifenola u ekstraktu maslinova lista tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografska analiza ekstrakta maslinova lista primjenom Varian ProStar System (Varian, Walnut Creek, CA, SAD) provedena je prema postupku opisanom u International Olive Council metodi (2009).

Za analizu polifenolnog sastava ekstrakta korištena je reverzno-fazna kromatografija s DAD detektorom (DAD, engl. Diode-Array Detector - detektor s nizom dioda). Komercijalni ekstrakt otopljen je u otopini metanol/voda (80/20, V/V) i filtriran kroz 0,45 µm poliviniliden-difluorid (PVDF) filtar (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Razdvajanje polifenolnih sastojaka u uzorku provedeno je na RP C18 koloni (Luna 250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenax, SAD) pri sobnoj temperaturi. Protok otapala kroz kolonu je bio 1 ml/min. Za razdvajanje injektiranog uzorka korišten je gradijent otapalima: 0,2 % fosforne kiseline (eluent A), metanol (eluent B) i acetonitril (eluent C). Gradijentni program je bio sljedeći: pri 0 minuta, 96% A, 2% B i 2% C; od 0 do 40 minuta, 50% A, 25% B i 25% C; od 40 do 45 minuta, 40% A, 30% B i 30% C; od 45 do 60 minuta, 50% B i 50% C; nakon toga su vrijednosti ostale na navedenom sve do 70 minute; od 70 do 72 minute postoci su se vratili na početne vrijednosti na kojima su ostali sljedećih 10 minuta. Fenolni spojevi su utvrđeni pri 280 nm i identificirani usporedbom njihovih retencijskih vremena i UV spektra (od 200 do 400 nm) sa sljedećim standardima: 4-hidroksibenzoičnom kiselinom, apigeninom, kafeinskom kiselinom, klorogeničnom kiselinom, p-kumarinskom kiselinom, feruličnom kiselinom, galskom kiselinom, hidroksitirosolom, luteolinom, oleuropeinom, pinorezinolom, protokatehuidnom kiselinom, sinapinskom kiselinom, siringaldehidom, siringičnom kiselinom, trans-cinamičnom kiselinom, vanilinskom kiselinom, vanilinom i tirosolom. Kvantifikacija polifenolnih spojeva provedena je na osnovu kalibracijske krivulje dobivene injektiranjem standardne otopine (1-25 µg/ml) tirosula. Dobiveni rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri mjerenja i izraženi su u g tirosula / 100 g suhog ekstrakta.

## 3.2. Ispitivanje antifungalnog učinka na vrsti *C. albicans*

### 3.2.1. Testovi ispitivanja djelovanja na gljivičnu vijabilnost

#### 3.2.1.1. Određivanje antimikrobnog učinka metodom mikrodilucije

##### Materijali

- Sabouraudov (SAB) agar (Merck, Njemačka) pripremljen vaganjem sljedećih sastojaka: 10 g peptona, 20 g D-(+) glukoze, 40 g dekstroze, 15 g agara i destilirane vode do 1000 ml (pH  $5,6 \pm 0,2$ ).
- SAB tekuća podloga pripremljena vaganjem sljedećih sastojaka: 10 g peptona, 20 g D-(+) glukoze, 40 g dekstroze i destilirane vode do 1000 ml (pH  $5,6 \pm 0,2$ ).  
Sterilizacija podloga provodi se autoklaviranjem na 1 atmosferi (121 °C) kroz 15 minuta. Pripremljena podloga SAB agara razlije se, nakon autoklaviranja, u Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm).
- Otopina amfotericina B koncentracije 1 mg/ml pripremljena je otapanjem antimikotika (Sigma, SAD) u dimetil-sulfoksidu (DMSO). Pripremljena radna otopina čuvana je na -20 °C i iskorištena unutar nekoliko dana.
- RPMI 2% G - komercijalni RPMI (Sigma-Aldrich, SAD) u koji je aseptički dodano 2% (m/v) glukoze

##### Priprema inokuluma

Inokulum je pripremljen suspendiranjem 5 kolonija kvasaca u sterilnoj fiziološkoj otopini. Za pripremu suspenzije je korištena svježa kultura kvasaca dobivena 48 satnim uzgojem na SAB agaru. Krajnja gustoća inokuluma izmjerena denzimetrom Densimat (Biomerieux, Francuska) iznosila je 0,5 McFarlanda ( $5 \times 10^6$  blastospora kandida/ml).

##### Metoda mikrodilucije

Primjenom mikrodilucijske metode prema smjernicama EUCAST E.DEF 7.3 (2015) utvrđena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ispitivanih tvari, oleuropeina i hidroksitirosola. Antifungalni MIK definiran je kao najniža koncentracija, u mg/ml, tvari koja inhibira 80% gljivičnog rasta. MIK vrijednost daje informaciju o osjetljivosti ili rezistenciji mikroorganizama na djelovanje tvari s antifungalnim učinkom. U sklopu istraživanja provedeno je ispitivanje antimikrobnog učinka na medicinski važnim kvascima roda *Candida* uzetim iz Zbirke mikroba Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mikrodilucijski postupak u tekućoj hranjivoj podlozi (RPMI 2% G) proveden je u mikrotitracijskoj ploči ravnog dna s jažicama nominalnog volumena 300  $\mu$ l (Greiner, Njemačka). U svaku jažicu dodano je 100  $\mu$ l tekuće hranjive podloge RPMI 2% G. Potom je u prvu jažicu dodano 100  $\mu$ l otopine oleuropeina odnosno hidroksitirosola koncentracije 50 mg/ml. Dvostrukim serijskim razrjeđenjem dobivene su koncentracije ispitivanih tvari u rasponu od 25 mg/ml do 0,0122 mg/ml. Unutar 30 minuta od pripreme suspenzije kvasaca, kako bi se održala odgovarajuća koncentracija vijabilnih stanica, inokulirane su jažice mikrotitracijskih ploča s po 20  $\mu$ l inokuluma. Usporedno su napravljene negativna kontrola koja nije sadržavala ispitivane tvari i pozitivna kontrola s amfotericinom B. Nakon 24-satne inkubacije (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) pri 37 °C, po 10  $\mu$ l iz svake jažice preneseno je sterilnom ezom na površinu krute hranjive podloge (SAB agar). MIK ispitivanih tvari koji inhibira 80% gljivičnog rasta utvrđen je nakon 48 satne inkubacije nasadenih ploča pri 37 °C. Test je proveden u triplikatu.

3.2.1.2. Određivanje antimikrobnog učinka metodom bojanja s tripan plavom

Ispitivanje učinka vodenog ekstrakta maslinova lista na vijabilnost blastospora vrste *C. albicans* ATCC 10231 provedeno je po uzoru na rad Strober (2001). Uzgoj i priprema inokuluma napravljena je u skladu s točkom 3.2.1.1. Nakon uzgoja, stanice kandidate isprane su dva puta s fosfatnim puferom PBS pH 7,4 i pripremljen je inokulum gustoće 0,5 McFarlanda izmjeren denzimetrom Densimat (Biomérieux, Francuska). 150  $\mu$ l suspenzije stanica inokulirano je u tekuću hranjivu podlogu RPMI 2% G koja je sadržavala ekstrakt maslinova lista u koncentracijama 46,875; 15,625; 1,5625 i 0,390625 mg/ml. Usporedno su napravljene pozitivna kontrola (amfotericin B, 1  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich, SAD) i negativna kontrola (netretirane stanice). Nakon 18-satne inkubacije (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) pri 37 °C, uzorci su centrifugirani (2 minute, 2000 rpm) i vijabilnost stanica obojanih s 0,4%-tnom otopinom tripan plave (Sigma-Aldrich, SAD) u 0,81% NaCl (Kemika, Hrvatska) i 0,06% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kemika, Hrvatska) utvrđena je pomoću brojača stanica Countess<sup>TM</sup> (Invitrogen, SAD). Za mjerenje je pomiješano 20  $\mu$ l stanične suspenzije s 20  $\mu$ l 0,4%-tne otopine tripan plave. Određen je postotak vijabilnih blastospora i log<sub>10</sub> CFU/ml stanica tretiranih s različitim koncentracijama vodenog ekstrakta maslinova lista te su rezultati prikazani grafički.

### 3.2.1.3. Određivanje kinetike stanične smrti vrste *C. albicans* („time-kill“ metoda)

Učinak oleuropeina i hidroksitirosola na preživljenje testnog soja *C. albicans* ATCC 10231 u ovisnosti o vremenu ispitan je po uzoru na rad autora Khan i sur. (2013). Uzgoj i priprema inokuluma napravljena je u skladu s točkom 3.2.1.1. Koncentracije ispitivanih tvari korištene u ispitivanju bile su jednake dvostrukoj vrijednosti eksperimentalno određenog MIK-a (25 mg/ml za oleuropein i 12,5 mg/ml za hidroksitirosol). 250 µl suspenzije inokuluma gustoće 0,5 McFarlanda dodano je u 5 ml tekuće hranjive podloge RPMI 2% G koja je sadržavala 2 x MIK koncentraciju pojedine tvari. Usporedno je pripremljen kontrolni uzorak koji nije sadržavao ispitivane tvari. Pozitivna kontrola izvođena je s amfotericinom B (10 µg/ml, Sigma-Aldrich, SAD). Svi uzorci su inkubirani na 37 °C (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan). U predefiniranim vremenskim intervalima (0, 1, 3, 5, 18 i 24 sata), 100 µl alikvota uzeto je iz tikvice s pojedinim uzorkom i serijski razrijeđeno (1:10) u fiziološkoj otopini. 100 µl svakog razrijeđenja preneseno je na čvrstu hranjivu podlogu (SAB agar) i inkubirano 48 sati na 37 °C. Na zadnja dva razrijeđenja s poraslim kolonijama vrste *C. albicans* određen je broj živih stanica u ovisnosti o vremenu. Srednja vrijednost broja mikroorganizama u pojedinom uzorku određena je prema sljedećoj formuli:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

pri čemu je N – broj mikroorganizama (CFU/ml ili CFU/g uzorka); C – zbroj poraslih kolonija na svim pločama razrijeđenja;  $n_1$  – broj mikrobnih kolonija u prvom razrijeđenju;  $n_2$  – broj mikrobnih kolonija u drugom razrijeđenju; d – faktor razrijeđenja uzorka prvog razrijeđenja.

### 3.2.1.4. Određivanje apoptoze/nekroze uslijed gubitka membranskog integriteta stanica vrste *C. albicans*

Diferencijacija između živih i mrtvih stanica vrste *C. albicans* pod utjecajem oleuropeina i hidroksitirosola provedena je postupkom bojanja s fluorescentnim DNA-vezujućim bojama prema metodologiji opisanoj prema Kosalec i sur., 2008 s manjim izmjenama. Testni mikroorganizam vrste *C. albicans* ATCC 10231 uzgojen je na SAB agaru kroz 24 sata pri 37 °C (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan). Suspenzija inokuluma gustoće 1,5 McFarland za

ispitivanje pripremljena je iz svježe kulture u fiziološkoj otopini. Postupak je proveden na način da je 100 µl pripremljenog inokuluma pomiješano s 900 µl tekuće hranjive podloge RPMI 2% G koja je sadržavala oleuropein u koncentracijama 12,5 mg/ml, 1,25 mg/ml i 0,195 mg/ml, odnosno hidroksitirozol u koncentracijama 6,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,0976 mg/ml i 0,01221 mg/ml. Amfotericin B (1 µg/ml) je korišten kao pozitivna kontrola dok su uzorci netretirani ispitivanim tvarima bili negativna kontrola. Svi uzorci su inkubirani 3 sata pri 35 °C. Smjesa boja etidij-bromid i akridin-narančasto u završnoj koncentraciji od 100 µg/ml (1:1; V/V) dodana je u uzorke koji su potom analizirani mikroskopom pod fluorescentnim svjetlom i povećanjem 400x. Broj živih stanica, odnosno broj apoptotičkih stanica i nekrotičkih stanica određivan je na uzorku od 300 stanica. Razlikovanje blastospora nakon tretiranja ispitivanim uzorcima i bojanja etidij-bromidom i akridin-narančastom se sastoji u tome da žive stanice isključuju etidij-bromid i da su njihove jezgre svijetlozelene s intaktnom strukturom. Ne-vijabilne stanice imaju narančasto do crveno obojani kromatin s organiziranom strukturom. Apoptotičke stanice su svijetlozelene s jako kondenziranom ili fragmentiranom jezgrom.

### 3.2.1.5. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja u kombinaciji s antimikotikom

Antimikrobno djelovanje ispitivanih tvari u kombinaciji s amfotericinom B (Sigma-Aldrich, SAD) analizirani su po uzoru na rad Wei i sur. (2011). Ispitivanje je provedeno u mikrotitracijskim pločama (Greiner, Njemačka) na soju *C. albicans* ATCC 10231. Iz stanica kvasaca prekulturnih preko noći na 37 °C (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) u tekućoj hranjivoj podlozi (SAB), te ispranih dva puta s fosfatnim puferom PBS pH 7,4 (Gibco, Life Technologies, SAD) pripremljen je inokulum gustoće 0,5 McFarlanda (Densimat, Biomerieux, Francuska). Jažice ploča sadržavale su otopine odgovarajućih ispitivanih tvari, u rasponu koncentracija 25 – 0,195 mg/ml za oleuropein i hidroksitirozol, i 8 – 0,0625 µg/ml za amfotericin B (Sigma-Aldrich, SAD) te 20 µl inokuluma kandida. Nakon inkubacije na 37 °C kroz 24 sata, stanični rast ispitan je mjerenjem apsorbancije na 500 nm. Test je napravljen u triplicatu kroz tri nezavisna mjerenja. Iz dobivenih podataka mjerenja izračunat je FIK indeks (engl. FIC-Fractional Inhibitory Concentration Index) prema formuli:

$$\sum \text{FIK} = \frac{\text{MIK}(\text{Akombinacija})}{\text{MIK}(\text{A})} + \frac{\text{MIK}(\text{Bkombinacija})}{\text{MIK}(\text{B})}$$

pri čemu  $\sum \text{FIK} < 0,5$  upućuje na sinergističko djelovanje;  $0,5 - 4,0$  indiferentno djelovanje;  $> 4$  antagonističko djelovanje.

### 3.2.2. Testovi ispitivanja djelovanja na virulentne čimbenike vrste *C. albicans* u uvjetima *in vitro*

#### 3.2.2.1. Ispitivanje inhibicije germinacije

##### Materijali

- Hranjiva tekuća podloga s N-acetil-D-glukozaminom koja sadrži 0,5% N-acetil-D-glukozamina (Sigma-Aldrich, Njemačka), 0,3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, Hrvatska) i destilirane vode do 100 ml
- Spiderova hranjiva tekuća podloga koja sadrži 1% hranjivog bujona (Sigma-Aldrich, Njemačka), 1% manitola (Difco Laboratories, SAD), 0,2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Kemika, Hrvatska) i destilirane voda do 100 ml.

Pripremljene podloge profiltrirane su preko Millex filtera s veličinom pora  $0,45 \mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, Njemačka).

##### Uzgoj gljivične vrste *C. albicans*

Uzgoj i priprema inokuluma vrste *C. albicans* ATCC 10231 provedena je u skladu s točkom 3.2.1.1.

##### Metoda

Postupak je napravljen u skladu s metodom opisanom u radu Toenjes i sur (2005) uz manje izmjene. Za induciranje hifalnog rasta korištene su restriktivne tekuće hranjive podloge (podloga s N-acetil-D-glukozaminom ili Spiderova podloga). Ispitivanje inhibitornog učinka tvari oleuropeina i hidroksitirosola na germinaciju vrste *C. albicans* provedeno je na način da je u eppendorf epruvete od 2 ml dodano po 100  $\mu\text{l}$  inokuluma gustoće 0,5 McFarlanda pripremljenog iz kulture kandida u stacionarnoj fazi rasta i 900  $\mu\text{l}$  odgovarajuće tekuće podloge koja je sadržavala ispitivane tvari u subinhibitornim koncentracijama 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml i 0,125 mg/ml. Usporedno su napravljene negativna kontrola koja nije sadržavala tvari i pozitivna kontrola s amfotericinom B (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Sve epruvete su inkubirane (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) 3 sata na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, za svaku koncentraciju ispitivanih tvari i kontrole, izbrojane su stanice u hemocitometru pod mikroskopom (Olympus BX51, Olympus Life



Sciences, USA), povećanja faznog kontrasta 800x, u 50 vidnih polja (250 µm x 250 µm), te je izračunat odnos između postotka germiniranih i ne-germiniranih stanica.

### 3.2.2.2. Modulacija površinske stanične hidrofobnosti (CSH)

#### Uzgoj i priprema gljivične suspenzije

U ispitivanju utjecaja oleuropeina i hidroksitirosola na modulaciju površinske stanične hidrofobnosti korišten je klinički soj vrste *C. albicans* MFBF 10773. Kolonije kultura navedenih gljivičnih vrsta uzgojenih na SAB agaru, u skladu s postupkom opisanom u točki 3.2.1.1., subkultivirane su u SAB tekućoj podlozi. Nakon 24 sata inkubacije (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) na 37 °C, gljivične kulture su centrifugirane 5 minuta na 5000 g. Talog dobivenih stanica ispran je dva puta i resuspendiran u fosfatnom puferu PBS pH 7,4. Inokulum stanica podešen je na  $0,5 \pm 0,05$  mjerenjem pri 620 nm na spektrofotometru iEMS Microplate Reader (Labsystems, Finska).

#### Metoda

Određivanje učinka oleuropeina i hidroksitirosola na površinsku staničnu hidrofobnost provedeno je u skladu s postupcima opisanom u radovima autora Hazen KC i sur. (1991); Jayant Raut i sur. (2010); Rosenberg i sur. (1980). Test je napravljen u triplicatu i proveden je pri subinhibitornim koncentracijama tvari (97,6 µg/ml, 48,83 µg/ml i 24,41 µg/ml za oleuropein te 390,4 µg/ml, 195 µg/ml i 97,6 µg/ml za hidroksitirosol). Epruvete za mjerenje uzoraka sadržavale su 1 ml suspenzije stanica apsorbancije  $0,5 \pm 0,05$  te otopine ispitivanih tvari odgovarajućih koncentracija do ukupnog volumena 1,3 ml. Pripremljeni uzorci su vorteksirani (Laboratory Vortex Shaker, IKA, Njemačka) i potom stavljeni na inkubaciju (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) 24 sata pri 25 °C. Nakon inkubacije, suspenzije su vorteksirane otprilike 20 sekundi i iz svake epruvete preneseno je 100 µl uzorka u mikrotitracijsku ploču (Greiner, Njemačka) te je izmjerena početna apsorbancija pri 620 nm. Potom je preostala suspenzija stanica pomiješana s 0,6 ml ksilena (Kemika, Hrvatska), vorteksirana 30 sekundi i ostavljena 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se postiglo razdvajanje faza. Pri 620 nm izmjeren je turbiditet 100 µl svakog uzorka uzetog iz vodene faze.

Indeks površinske stanične hidrofobnosti (IH) izračunat je prema formuli:

$$IH = \frac{\text{Apočetna} - \text{Akonačna}}{\text{Apočetna}}$$

pri čemu je Apočetna - apsorbanacija uzoraka prije dodatka ksilena, a Akonačna - apsorbanacija uzoraka nakon dodatka ksilena.

### 3.2.2.3. Ispitivanje učinka na stvaranje biofilma vrste *C. albicans*

Učinak na stvaranje biofilma vrste *C. albicans* ATCC 10231 ispitan je po uzoru na metode Stepanović i sur. (2000) te Costa i sur. (2014). Stanice kvasca subkultivirane su u tekućoj hranjivoj podlozi (SAB) te inkubirane 18 sati na 37 °C (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan). Uzgojene stanice isprane su dva puta fosfatnim puferom PBS pH 7,4 (Gibco, Life Technologies, SAD) i resuspendirane u istom mediju (SAB) do gustoće 1 x 10<sup>6</sup> stanica/ml. Po 200 µl alikvota suspenzije stanica navedene gustoće dodano je u jažice polistirenskih mikrotitracijskih ploča (Greiner, Njemačka) i ostavljeno preko noći na inkubaciji (37 °C, 24 sata), nakon čega je medij pažljivo uklonjen kako ne bi došlo do narušavanja integriteta biofilma. Nastali biofilm ispran je tri puta s fosfatnim puferom PBS pH 7,4 kako bi se uklonile neadherirane stanice. Otopine oleuropeina (3,125 – 150 mg/ml) i hidroksitirosola (3,125 – 150 mg/ml) dodane su u različitim koncentracijama nakon čega je uslijedila inkubacija 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, tvari su uklonjene i tretirani biofilm ispran je tri puta s fosfatnim puferom PBS pH 7,4. Adherirani mikroorganizmi fiksirani su dodatkom 200 µl 99%-tnog metanola (Sigma-Aldrich, SAD) po jažici. Nakon 15 minuta, uklonjen je metanol i ploče su ostavljene na zraku radi sušenja. Potom je dodano po 200 µl 2% otopine kristal violeta (Sigma-Aldrich, SAD) u svaku jažicu, i nakon 5 minuta uklonjen je višak boje pažljivim ispiranjem s vodom. Nakon sušenja, vezana boja otopljena je dodatkom 160 µl 33% (v/v) ledene octene kiseline (Sigma-Aldrich, SAD) po jažici. Adherencija stanica kvantificirana je mjerenjem apsorbanacije na 570 nm (iEMS Microplate Reader, LabSystems, Finska).

### 3.2.2.4. Inhibicije aktivnosti gljivičnih hidrolitičkih enzima

#### 3.2.2.4.1. Inhibicija aktivnosti aspartil-proteaza (Sap)

##### Materijali

- za ispitivanje učinka oleuropeina i hidroksitirosola na aktivnost proteaza korišteni su klinički izolati vrste *C. albicans*, stolice (MFBF br. soja: 10351, 10353, 10354, 10422, 10424 i 10425) i rodnice (MFBF br. soja: 10774, 10775, 10781, 10783, 10784 i 10799) iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

- za uzgoj sojeva korištena je Remoldova BSA tekuća hranjiva podloga (pH 5,2-5,6; bez  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i aminokiselina) sastava: 2% (m/v) glukoze, 0,1% (m/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5% (m/v)  $\text{MgSO}_4$ ; 0,7% (m/v) YNB (kvaščeva bazična podloga s dušikom, Sigma-Aldrich, SAD), 1% (m/v) BSA (goveđi serumski albumin, Sigma-Aldrich, SAD)

## Metoda

Za ispitivanje su pripremljene suspenzije svježih kultura kliničkih izolata gustoće 0,5 McFarlanda (Densimat, Biomerieux, Francuska). Indukcija proteaza provedena je po uzoru na radove autora Yordanov i sur. (2008) te Dostal i sur. (2003). Suspenzija stanica sojeva vrste *C. albicans* dodana je u BSA-Remoldovu tekuću podlogu. Uzorci su inkubirani pri aerobnim uvjetima 7 dana na orbitalnoj tresilici (150 rpm) i temperaturi 27 °C. Nakon inkubacije, uzorci su profiltrirani na nitroceluloznom membranskom filtru (0,22 µm), a dobiveni supernatanti s enzimima čuvani su na -20°C.

Selekcija soja s najvećom produkcijom proteaza i ispitivanje učinaka oleuropeina i hidroksitirosola provedeno je u skladu s postupcima opisanim u radovima Höfling i sur. (2011) te Yordanov i sur. (2008). Reakcijske smjese za selekciju najproduktivnijeg soja sadržavale su 0,2 mol/l HCl/natrij-citratnog pufera, 1% BSA u istom puferu i 0,5 ml supernatanta s kulturom *C. albicans*. Svi uzorci su inkubirani (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) 1 sat na 37 °C, a potom je reakcija prekinuta dodatkom 0,5 ml 20%-tne triklorooctene kiseline. Dodatno je napravljena kontrola koja je osim svih ranije navedenih sastojaka reakcijske smjese sadržavala 20% triklorooctenu kiselinu. Nakon inkubacije, reakcijske smjese su centrifugirane 30 minuta na 3000 g i 160 µl alikvota iz supernatanta je odvojeno za spektrofotometrijsku analizu. Osim alikvota, u mikrotitracijsku ploču (Greiner, Njemačka) dodano je 40 µl boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, SAD), a potom je spektrofotometrijski pri 595 nm (Thermo Labsystems iEMS MF Type 1401, Finska) selektiran soj s najvišom apsorbancijom za sljedeću fazu ispitivanja.

Određivanje učinka ispitivanih tvari na aktivnost proteaza provedeno je u skladu sa selekcijom soja osim što su reakcijske smjese uz ranije navedene sastojke sadržavale različite koncentracije oleuropeina (12,5 mg/ml; 6,25 mg/ml; 3,125 mg/ml) odnosno hidroksitirosola (6,25 mg/ml; 3,125 mg/ml; 1,5625 mg/ml). Usporedno je napravljena pozitivna kontrola koja je sadržavala pepstatin A (Sigma-Aldrich, SAD) otopljen u 5% DMSO.

Proteazna aktivnost izračunata je kao razlika optičkih gustoća,  $T_{60} - T_0$ , pri čemu je:

$T_{60}$  - optička gustoća reakcijske smjese nakon 60 minuta inkubacije

$T_0$  – optička gustoća reakcijske smjese koja je uz ostale navedene sastojke sadržavala 20% triklorooctene kiseline.

#### 3.2.2.4.2. Inhibicija aktivnosti gljivične $\alpha$ -glukozidaze

##### Materijali

- za ispitivanje učinka oleuropeina i hidroksitirosola na aktivnost  $\alpha$ -glukozidaza korišteni su klinički izolati vrste *C. albicans*, MFBF br. soja: 10781, 10802, 11103, 11099 i 11101 iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
- za uzgoj i indukciju  $\alpha$ -glukozidaza pod restriktivnim uvjetima korištena je tekuća hranjiva podloga sastava: 0,7% (m/v) YNB (kvaščeva bazična podloga s dušikom, Sigma-Aldrich, SAD), 0,6% (m/v) maltoze, 0,9% (m/v) NaCl i destilirana voda.

##### Metoda

Klinički sojevi vrste *C. albicans* prekultivirani su u SAB tekućoj podlozi inkubacijom (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) na 37 °C kroz 24 sata. Nakon inkubacije gljivične kulture su centrifugirane 5 minuta na 5000 g. Talog dobivenih stanica ispran je dva puta u fosfatnom puferu PBS pH 7,4. Indukcija  $\alpha$ -glukozidaza provedena je po uzoru na rad Bramono i sur. (2006). Suspenzija stanica u koncentraciji  $2 \times 10^5$  stanica/ml kultivirana je u pripremljenoj tekućoj hranjivoj podlozi za uzgoj pod restriktivnim uvjetima na orbitalnoj tresilici (150 rpm) 3 dana pri 37 °C. Aktivnost  $\alpha$ -glukozidaza mjerena je korištenjem p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida (Sigma-Aldrich, SAD) kao substrata. Intaktni organizmi od  $4 \times 10^7$  stanica u 0,2 ml fosfatnog pufera PBS pH 7,4 inkubirani su 3 sata na 37 °C s 5 mM substrata u 1,0 ml 0,1 M fosfat-citratnog pufera (pH 6,0). Reakcija je zaustavljena dodatkom 2 ml 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u reakcijsku smjesu i oslobođeni p-nitrofenol izmjeran je pri 405 nm (Thermo Labsystems iEMS MF Type 1401, Finska). Određivanje inhibitornog učinka ispitivanih tvari na soju s najvećom produkcijom  $\alpha$ -glukozidaze provedeno je u skladu s opisanim postupkom indukcije ovog enzima, osim što su reakcijske smjese sadržavale oleuropein u koncentracijama 25 mg/ml, 12,5 mg/ml i

6,25 mg/ml odnosno hidroksitirosol u koncentracijama 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml i 3,125 mg/ml. Kao pozitivna kontrola testa korištena je akarboza (Sigma-Aldrich, SAD).

### 3.2.3. Ispitivanje mehanizama fungicidnog djelovanja oleuropeina i hidroksitirosola

#### 3.2.3.1. Modulacija sadržaja membranskog ergosterola

##### 3.2.3.1.1. Određivanje ergosterola spektrofotometrijskom metodom

Ispitivanje inhibicije sinteze ergosterola pod djelovanjem oleuropeina i hidroksitirosola provedeno je u skladu s postupkom opisanim u radu Arthington-Skaggs i sur. (1999). Za ispitivanje je pripravljena suspenzija svježe kulture *C. albicans* ATCC 10231 gustoće 0,5 McFarlanda (Densimat, Biomerieux, Francuska). Uzorci sa suspenzijom stanica navedene gustoće tretirani su različitim koncentracijama ispitivanih tvari, oleuropeina (24,41 µg/ml, 195,31 µg/ml i 1250 µg/ml) odnosno hidroksitirosola (12,21 µg/ml, 97 µg/ml, 625 µg/ml). Tretirane stanice inkubirane su pri aerobnim uvjetima 18 sati na orbitalnoj tresilici (170 rpm) i temperaturi 37 °C. Usporedno je pripravljena pozitivna kontrola tretirana amfotericinom B (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon inkubacije, suspenzije su centrifugirane (2700 g, 5 minuta) i potom je određena masa staničnih peleta. 3 ml svježe pripravljene alkoholne otopine kalijeva hidroksida (25% m/v) dodano je svakom peletu i snažno vorteksiran 1 minutu. Dobivene stanične suspenzije prenesene su u borosilikatne staklene epruvete i inkubirane 1 sat u vodenoj kupelji na 85 °C. Nakon hlađenja, provedena je ekstrakcija sterola dodatkom smjese voda: n-heptan (1:3, v/v) i vorteksiranjem kroz 3 minute. Nastali heptanski slojevi preneseni su u nove borosilikatne staklene epruvete i čuvani na -20 °C. Prije skeniranja, 0,6 ml sterolnih ekstrakata otopljeno je u 100% -tnom etanolu (1:5) i skenirano između 240 i 300 nm (Varian Cary 1 UV-VIS spektrofotometru, Agilent, SAD).

Sadržaj ergosterola izračunat je kao postotak vlažne mase stanica putem sljedećih jednadžbi:

$$\% \text{ergosterola} + \% 24(28) \text{ DHE} = [(A_{281,5}/290) \times F] / \text{masa stanica}$$

$$\% 24(28) \text{ DHE} = [(A_{230}/518) \times F] / \text{masa stanica}$$

$$\text{ergosterola} = [\% \text{ergosterola} + \% 24(28) \text{ DHE}] - \% 24(28) \text{ DHE},$$

pri čemu je F faktor razrjeđenja uzorka u etanolu (1:5) a 290 i 518 su E vrijednosti (u postocima po centimetru) određene za kristalični ergosterol i 24(28) DHE (Arthington-Skaggs i sur.,1999).

### 3.2.3.1.2. Određivanje ergosterola metodom plinske kromatografije sa spektrometrom masa (GC/MS)

Tretiranje stanične suspenzije vrste *C. albicans* ATCC 10231 oleuropinom i hidroksitirozolom te ekstrakcija ukupnih sterola provedena je u skladu s postupkom opisanim pod točkom 3.2.3.1.1. Nakon dodatka internog standarda (50 µg), uzorci su sušeni pod dušikom i derivatizirani dodatkom 100 µl N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 200 µl bezvodnog piridina (Sigma-Aldrich, Njemačka). Derivatizacija je provedena na 60 °C kroz 30 minuta. Za analizu sterola koristio se Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra Gas Chromatograph Mass Spectrometer (Shimadzu, Japan), opremljen kapilarnom kolonom BPX5 (0,25 mm unutarnjeg promjera, 0,25 µm debljine filma, 30 m duljine) (SGE, USA). Temperatura injektora podešena je na 280 °C, i po 2 µl svakog uzorka injektirano je uz omjer razdjeljenja 1:80. Helij je korišten kao plin nosilac, i linearna brzina je iznosila 35 cm/s. Postavljen je sljedeći program pećnice plinskog kromatografa: temperatura na 280 °C kroz 1 minutu, potom povećana na brzinu 4 °C/minuti do 340 °C i držana kroz 10 minuta. Kolesterol (Sigma-Aldrich, Njemačka) je korišten kao interni standard, dok je ergosterol (Sigma-Aldrich, Njemačka) korišten za kalibracijsku krivulju. Kvantifikacija je provedena usporedbom površine krivulje (pika) ergosterola s krivuljom (pikom) unutarnjeg standarda.

### 3.2.3.2. Modulacija permeabilnosti stanične membrane

Otpuštanja staničnog sadržaja vrste *C. albicans* ATCC 10231 koji apsorbira svjetlost pri 260 nm/ 280 nm (DNA, proteini) izmjereno je spektrofotometrijskim mjerenjem staničnog supernatanta po uzoru na metodu autora Khan i sur. (2013). Stanice kandidate uzgojene su u tekućoj hranjivoj podlozi SAB kroz 48 sati na 37 °C (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan). Nakon uzgoja, pripravljena je stanična suspenzija koncentracije  $2,5 \times 10^7$  CFU/ml (Densimat, Biomerieux, Francuska) u fosfatnom puferu PBS 7,4 (Gibco, Life Technologies, SAD). Navedena stanična suspenzija tretirana je različitim koncentracijama ispitivanih tvari oleuropeina (1,25 mg/ml; 3,125 mg/ml; 6,25 mg/ml; 12,5 mg/ml; 50

mg/ml) i hidroksitirosola (0,625 mg/ml; 1,562 mg/ml; 3,125 mg/ml; 6,25 mg/ml; 25 mg/ml) u različitim vremenskim intervalima (1, 6, 12 i 24 sati). Usporedno su pripremljeni netretirani uzorci kao negativna kontrola dok je vorikonazol (Sigma-Aldrich, SAD) bio pozitivna kontrola. Svi uzorci inkubirani su u navedenim vremenskim intervalima pri 37 °C. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani (10000 rpm, 10 minuta) i apsorbancija supernatanata izmjerena je pri 260 nm/ 280 nm (Biospec Nano, Shimadzu, Japan).

### 3.2.3.3. Modulacija sadržaja 1,3-β-D-glukana u staničnoj stijenci

Modulacija sadržaja 1,3-β-D-glukana u staničnoj stijenci vrste *C. albicans* ATCC 10231 pod utjecajem oleuropeina i hidroksitirosola analizirana je po uzoru na rad Lopes i sur. (2013). 10 μl stanične suspenzije gustoće 0,5 McFarlanda (pripremljeno u skladu s postupkom opisanom u točki 3.2.1.1.) inokulirano je u 10 ml tekuće hranjive podloge RPMI 2% G koja je sadržavala različite koncentracije oleuropeina (3,9 mg/ml i 0,39 mg/ml) odnosno hidroksitirosola (3,9 mg/ml i 0,39 mg/ml). Usporedno je pripremljena negativna kontrola koja nije sadržavala ispitivane tvari. Uzorci su inkubirani 48 sati aerobno na orbitalnoj tresilici (150 rpm) pri 37 °C. Nakon inkubacije, reakcijske smjese centrifugirane su na 3000 x g, a dobiveni talog stanica ispran je s 0,1 M NaOH (Sigma-Aldrich, SAD) te potom liofiliziran preko noći. 5 mg liofiliziranog staničnog materijala korišteno je za određivanje sadržaja 1,3-β-D-glukana. Analiza 1,3-β-D-glukana provedena je po uzoru na rad Fortwendel i sur. (2009). Liofilizirani materijal resuspendiran je u 250 μl 0,1 M NaOH, sonificiran kroz 30 sekundi i inkubiran 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, 50 μl alikvota iz svakog uzorka preneseno je u mikrotitracijsku ploču (Greiner, Njemačka). 185 μl anilin-blue smjese (0,067% anilin-blue, 0,35 N HCl, 0,98 M glicin-NaOH pH 9,5; Sigma-Aldrich, SAD) dodano je u svaku jažicu, nakon čega je uslijedila dodatna inkubacija u trajanju od 30 minuta na 37 °C. Potom je mikrotitracijska ploča s uzorcima ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi prije analize. Intenzitet fluorescencije (F) izmjeren je pri ekscitaciji od 485/20 nm i emisiji od 528/20 nm (Infinite 200 microplate reader Tecan Group Ltd., Švicarska). Kvantifikacija glukana provedena je na temelju standardne krivulje s analogom 1,3-β-D-glukana (kurdlan, Sigma-Aldrich, SAD).

Sadržaj glukana u uzorcima izračunat je putem sljedeće jednadžbe:

$$[F_{\text{eks485/20/em528/20}}(\text{nepoznati uzorak}) - F_{\text{eks485/20/em528/20}}(\text{kontrola})/\text{nagib pravca}] \times 0,0235$$

Dobiveni rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri mjerenja i izraženi su u pg (kurdiana)/100 mg (suhe tvari).

#### 3.2.3.4. Modulacija sadržaja hitina u staničnoj stijenci

Učinak na sadržaj hitina ispitan je u skladu s metodom opisanom u radu Maoz i Neeman (2000). Uzgoj gljivične kulture vrste *C. albicans* ATCC 10231 i tretiranje s oleuropeinom (3,9 mg/ml i 0,39 mg/ml) i hidroksitirozolom (3,9 mg/ml i 0,39 mg/ml) provedeno je na isti način i pri istim uvjetima kao i za određivanje 1,3-β-D-glukana. 10 μg suhe tvari stanica suspendirano je u 4 ml natrijeva laurilsulfata (4%, m/v) a potom je 0,5 ml suspenzije grijano 14 minuta na 100 °C. Nakon hlađenja, uzorci su centrifugirani (1500 x g, 5 minuta, 2 °C) i dobiveni peleti su isprani destiliranom vodom, resuspendirani s KOH (55%, m/v) (Sigma-Aldrich, SAD) i zagrijani kroz 1 sat (130 °C). Nakon hlađenja, dodano je 8 ml ohlađenog etanola (75%, v/v) (Sigma-Aldrich, SAD) i uzorci su snažno vorteksirani (Laboratory Vortex Shaker, IKA, Njemačka) do postizanja jedne faze. Uzorci su stavljeni u hladnu vodu kroz 15 minuta i potom im je dodano 0,3 ml suspenzije Celite 545 (Merck KGaA, Njemačka) (1,0 g Celite 545 u 75%-tnom (v/v) etanolu). Nakon centrifugiranja (1500 x g, 5 minuta, 2 °C), dobiveni pelet ispran je s ohlađenim 40%-tnim (v/v) etanolom i potom dva puta ispran s hladnom vodom. Navedeni pelet sadržavao je netopljivi kitozan. Sadržaj glukozamina određen je na način da je kitozan-peletu dodana destilirana voda do volumena 0,5 ml. Potom je uzorcima dodano po 0,5 ml NaNO<sub>2</sub> (5%, m/v) i KHSO<sub>4</sub> (5%, m/v) i dobivena suspenzija je centrifugirana kroz 5 minuta (1500 x g, 2 °C). 0,2 ml amonijeva sulfamata (Sigma-Aldrich, SAD) (12,5%, m/v) dodano je u 0,6 ml supernatanta i uzorci su snažno vorteksirani (5 minuta). Potom je dodano 0,2 ml svježe pripremljenog reagensa MBTH (50 mg 3-metilbenzo-2-tiazolon hidrazon HCl (Sigma-Aldrich, SAD) u 10 ml vode) i uzorci su zagrijani kroz 3 minute (100 °C). Nakon hlađenja, dodano je 0,2 ml FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0,83%, m/v, Sigma-Aldrich, SAD) i apsorbancija uzoraka izmjerena je pri 630 nm (Biospec Nano, Shimadzu, Japan). Kvantifikacija hitina stanične stijenske provedena je na temelju standardne krivulje s D-(+)-glukozaminkloridom.

Sadržaj hitina u uzorcima izračunat je putem sljedeće jednadžbe:

$$[\text{Aps}_{630}(\text{nepoznati uzorak}) - \text{Aps}_{630}(\text{kontrola})/\text{nagib pravca}] \times 0,15$$

Dobiveni rezultati predstavljaju srednju vrijednost tri mjerenja i izraženi su u μg (glukozamina)/100 mg (suhe tvari).



### 3.2.3.5. Depolarizacija mitohondrijskog membranskog potencijala

Promjene u polarizaciji gljivične mitohondrijske membrane vrste *C. albicans* ATCC 10231 analiziranu su bojanjem s 3,3'-diheksiloksakarbocijanin jodidom [DiOC<sub>6</sub>(3)] (Molecular Probes, SAD). Postupak je napravljen po uzoru na rad Cho i Lee (2011). Stanice kandidate uzgojene su u skladu s opisom u točki 3.2.1.1. i za rad je pripremljen inokulum koncentracije stanica 10<sup>7</sup> CFU/ml. Stanice su tretirane koncentracijama oleuropeina (6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml) odnosno hidroksitirosola (3,125 mg/ml, 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml). Nakon tretmana s ispitivanim tvarima, stanice su dodatno inkubirane 1 sat na 37 °C (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) uz dodatak boje DiOC<sub>6</sub>(3). Nakon inkubacije, stanice su isprane fosfatnim puferom PBS pH 7,4 (Gibco, Life Technologies, SAD), a potom su uzorci analizirani. Intenzitet fluorescencije izmjeren je pri eksitaciji od 488 nm i emisiji od 510 nm (Infinite 200 microplate reader, Tecan Group Ltd., Švicarska).

### 3.3. Ispitivanje antimikrobnog učinka na vrste roda *Lactobacillus* u uvjetima *in vitro*

Primjenom mikrodilucijske metode prema smjernicama EUCAST E.DEF 7.3 (2015) utvrđena je inhibitorna koncentracija (IC) ispitivanih tvari, oleuropeina i hidroksitirosola na bakterijske vrste roda *Lactobacillus*. U sklopu testa provedeno je ispitivanje antimikrobnog učinka na dvije vrste *L. acidophilus* MFBF 12590 i *Lactobacillus* sp. MFBF 11091 uzete iz Zbirke mikroba Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Antimikrobni IC definiran je kao najniža koncentracija, u mg/ml, tvari koja inhibira 50 % (IC<sub>50</sub>) i 80 % (IC<sub>80</sub>) bakterijskog rasta.

Mikrodilucijski postupak u tekućoj hranjivoj podlozi (MRS bujon, Fluka, SAD) proveden je u mikrotitracijskoj ploči ravnog dna s jažicama nominalnog volumena 300 µl (Greiner, Njemačka). U svaku jažicu dodano je 100 µl tekuće hranjive podloge MRS bujona. Potom je u prvu jažicu dodano 100 µl otopine oleuropeina odnosno hidroksitirosola koncentracije 25 mg/ml. Dvostrukim serijskim razrjeđenjem dobivene su koncentracije ispitivanih tvari u rasponu od 12,5 mg/ml do 0,0488 mg/ml. Unutar 30 minuta od pripreme suspenzije bakterija, kako bi se održala odgovarajuća koncentracija vijabilnih stanica, inokulirane su jažice mikrotitracijskih ploča s po 20 µl inokuluma gustoće 0,5 McFarlanda (Densimat, BioMerieux, Francuska) razrijeđenog u omjeru 1:10. Usporedno je napravljena kontrola koja nije sadržavala ispitivane tvari i kontrola bujona. Nakon 24 satne inkubacije (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan) pri 37 °C, izmjerene su apsorbancije pri 540 nm (iEMS Microplate Reader, LabSystems, Finska). Test je proveden u triplikatu.

### 3.4. Ispitivanje antigenotoksičnog učinka kometnim testom

#### Materijali

1. Agaroza: za pripremu mikrogelova korištena je 1% i 0,6%-tna agaroza normalne točke tališta (engl. normal melting point – NMP; Sigma-Aldrich, SAD) i 0,5%-tna agaroza niske točke tališta (engl. low melting point – LMP; Sigma-Aldrich, SAD) otopljena u PBS puferu.
2. Pufer za lizu staničnih struktura: za pripremu matične otopine u 890 ml redestilirane vode otopi se 146,6 g NaCl, 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma-Aldrich, SAD) i 1,2 g Tris-HCl (Sigma-Aldrich, SAD). Uz dodatak NaOH pH se podese na 10 te se doda 10 g Na-laurilsarkozinata (Sigma-Aldrich, SAD). Radna otopina priprema se prije uporabe miješanjem 89 ml matične otopine, 10 ml 10%-tne otopine DMSO i 1 ml detergenta Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD).
3. Pufer za denaturaciju i elektroforezu (pH=13): 300 mM NaOH i 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA u redestiliranoj vodi (ukupni V=1000 ml).
4. Pufer za neutralizaciju i ispiranje (pH=7,5): 0,4 M Tris-HCl u redestiliranoj vodi (ukupni V=1000 ml).
5. Otopina boje etidij bromid (Sigma-Aldrich, SAD) za bojanje preparata (20 µg/ml).
6. Otopina 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u redestiliranoj vodi – korištena kao pozitivna kontrola za kometni test.
7. Otopina 10 µg/ml bleomicina u redestiliranoj vodi – korištena kao pozitivna kontrola za kometni test.

#### Limfociti ljudske krvi

Korišteni su limfociti periferne krvi zdravog dobrovoljca, nepušača, starog 44 godina koji je dao informativni pristanak za sudjelovanje. Unazad godinu dana davatelj krvi nije bio izložen ionizirajućem ili neionizirajućem zračenju, niti kemijskim mutagenima. Krv je izvađena u heparinizirane spremnike (BD vacutainer, Becton Dickinson) volumena 5 ml. Za potrebe pokusa izvađeno je ukupno 40 ml venske krvi.

Izolacija limfocita provedena je pomoću reagensa Histopaque®-1077 reagent, prema uputama proizvođača ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

Stanice su za vrijeme pokusa inkubirane u hranjivom mediju RPMI 1640 (Sigma, USA) koji je sadržavao 10% inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (FBS; od engl. Fetal Bovine Serum) (GIBCO, Scotland, UK) na temperaturi 30 °C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>.

Stanice su tretirane s hidroksitirozolom i oleuropeinom u koncentracijama 1, 5 i 10  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$ , 2,7  $\mu\text{g/ml}$  i 5,4  $\mu\text{g/ml}$  oleuropeina odnosno 0,15  $\mu\text{g/ml}$ , 0,75  $\mu\text{g/ml}$ , 1,5  $\mu\text{g/ml}$  hidroksitirosola) kroz 120 minuta za procjenu genotoksičnog potencijala ispitivanih spojeva. U pokusima procjene protektivnog učinka spojeva limfociti su pred-tretirani s istim koncentracijama ispitivanih spojeva, a zatim 30 min tretirani s 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Usporedno su držane negativne i pozitivne kontrole.

U pokusu za procjenu genotoksičnog učinka korištene su dvije pozitivne kontrole: bleomicin u koncentraciji 10  $\mu\text{g/ml}$  (3 h *in vitro* tretman) te 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (tretman 10 min na ledu).

### Postupak kometnog testa

Ispitivanje je napravljeno u skladu s postupkom opisanim u radu Singh i sur. (1988).

Izrada mikrogelova agaroze: pripremljene su svježije otopine 1% i 0,6%-tne agaroze normalnog tališta (NMP), te 0,5%-tne agaroze niskog tališta (LMP) otapanjem agaroze u PBS puferu uz zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici. 1%-tna agarozna nakapana je na brušeno predmetno stakalce i pokrivena pokrovnicom. Nakon polimerizacije na sobnoj temperaturi, gel i pokrovnica uklonjeni su sa stakalca. Mikropipetom je na osušeno staklo nakapano 300  $\mu\text{l}$  0,6%-tne NMP agaroze, koja je zatim pokrivena pokrovnicom i ostavljena na ledu 10 minuta. Nakon polimerizacije i skidanja pokrovnica, stavljen je novi sloj od 100  $\mu\text{l}$  0,5%-tne LMP agaroze pomiješane s uzorkom stanica u hranjivom mediju (10  $\mu\text{l}$ ).

Nakon 10 minuta polimeriziranja na ledu, sloj je prekriven sa 100  $\mu\text{l}$  0,5%-tne LMP agaroze i opet držan na ledu 10 minuta. Svi postupci izrade preparata izvođeni su u zamračenoj prostoriji, kako bi se izbjegao nastanak dodatnih oštećenja molekule DNA u uzorcima.

Usporedo s testiranim uzorcima, pripremljeni su i uzorci za negativnu te pozitivne kontrole na kojima su provedeni svi postupci jednako kao i s ostalim testiranim uzorcima.

Liza staničnih struktura: priređeni preparati uronjeni su u otopinu za lizu. Svježi pufer (pH=10) pripremljen je neposredno prije upotrebe iz matične otopine za lizu uz dodatak 10%-tne otopine DMSO i detergenta Tritona X-100. Preparati su u puferu za lizu držani najmanje 1 h na 4°C. Zbog osjetljivosti tehnike, preparati su za vrijeme lize bili zaštićeni od svjetla.

Denaturacija: preparati su iz pufera za lizu prebačeni u pufer za denaturaciju (pH=13) priređen neposredno prije upotrebe. Denaturacija je trajala 20 minuta, zaštićena od svjetla.

Elektroforeza: nakon denaturacije, preparati su u kadici za horizontalnu elektroforezu izloženi električnom polju. Elektroforeza je provedena u istom puferu kao i denaturacija, pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V, a trajala je 20 minuta.

Neutralizacija: Nakon elektroforeze, preparati su ispirani tri puta po 5 minuta u neutralizacijskom puferu (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5).

Bojanje: nakon zadnjeg ispiranja, preparati su obojani sa 100 µl etidij-bromida (20 µg/ml) u trajanju od 10 minuta. Obojani gelovi kratko su isprani u Tris-HCl puferu (pH=7,5) i pokriveni pokrovnicom. Radi stabilizacije boje, preparati su prije početka analize držani u mraku najmanje 15 minuta.

Mikroskopska analiza i obrada podataka mjerenja: analiza preparata provedena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX 51; povećanje 200x; Olympus, Tokyo, Japan). Mikroskop je preko kamere visoke rezolucije povezan s računalom. Mjerenja su provedena pomoću programa za analizu slike (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK). Po svakom testiranom uzorku izmjereno je 3x50, tj. ukupno 150 kometa. Premda program istovremeno mjeri niz parametara, među njima su za daljnja razmatranja kao najvažniji uzeti dužina repa kometa (izražena u mikrometrima), %DNA u repu i repni moment kometa. Izmjerene podatke računalo automatski pohranjuje u obliku tablica (u programu Excel). Podaci su podvrgnuti matematičkoj i statističkoj obradi primjenom odgovarajućih programa (Excel i Statistica 12.0, StatSoft Inc.). Nakon logaritmiranja podataka, pomoću analize varijance i post-hoc Scheffé testa uspoređene su i tumačene dobivene vrijednosti.

### 3.5. Ispitivanje hemolitičkih učinaka

Za ispitivanje citotoksičnosti oleuropeina i hidroksitirosola na humanim eritocitima, napravljen je test hemolitičke aktivnosti po uzoru na metodu Sung i sur. (2007).

Svježa krv (muški donor, 44 godine), tretirana u aseptičkim uvjetima uz sterilni pribor, centrifugira se 10 minuta na 1500 rpm. Nakon odvajanja supernatanta, eritrociti su dva puta isprani s fosfatnim puferom PBS 7,4 (Gibco, Life Technologies, SAD), a potom je za rad pripremljena 4%-tna suspenzija eritrocita u istom puferu.

Ispitivanje je provedeno u eppendorf epruvetama, u koje su dodane otopine ispitivanih tvari u različitim koncentracijama 3, 10, 30 i 60  $\mu\text{M}$  što odgovara 1,6  $\mu\text{g/ml}$ , 5,4  $\mu\text{g/ml}$ , 16,2  $\mu\text{g/ml}$  i 32,4  $\mu\text{g/ml}$  oleuropeina odnosno 0,46  $\mu\text{g/ml}$ , 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , 4,6  $\mu\text{g/ml}$  i 9,2  $\mu\text{g/ml}$  hidroksitirosola i 4%-tne suspenzije eritrocita (snažno pomiješane na tresilici prije dodavanja) do ukupnog volumena od 1000  $\mu\text{l}$ . Nakon pripreme, uzorci su inkubirani 1 sat na 37 °C (Sanyo MIR-553, Sanyo, Japan). Usporedno je pripremljena pozitivna kontrola za koju je korišten detergent Triton X-100. Radna 10%-tna otopina Triton X-100 dobivena je otapanjem 100%-tni Triton X-100 u PBS-u (pH 7.4). Negativna kontrola sadržavala je samo 4%-tnu suspenziju eritrocita (volumena 1000  $\mu\text{l}$ ). Nakon inkubacije, reakcijske smjese centrifugirane su 10 minuta na 1500 rpm. 100  $\mu\text{l}$  alikvota preneseno je na mikrotitracijsku ploču i izmjerena je apsorbancija na 414 nm (valna duljina apsorpcije hemoglobina) (Varian Cary 1 UV-VIS spektrofotometru, Agilent, SAD). Sva ispitivanja napravljena su u 3 neovisna mjerenja.

Postotak hemolize izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ hemolize} = \frac{A_{414}(\text{ispitivane tvari u 4\% hERC}) - A_{414}(\text{ispitivane tvari u PBS-u})}{A_{414}(0,1\% \text{ Triton X-100}) - A_{414}(\text{ispitivane tvari u PBS-u})} \times 100$$

### 3.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

#### 3.6.1. Određivanje antioksidativnog kapaciteta ABTS metodom

Određivanje antioksidativne aktivnosti oleuropeina i hidroksitirosola ABTS metodom provedeno je u skladu s radom Re i sur. (1999). Ova metoda se zasniva na redukciji generiranog  $ABTS^{\cdot+}$  radikala nakon dodatka antioksidansa. Za pripremu  $ABTS^{\cdot+}$  radikala pomiješano je 7 mM vodene otopine ABTS reagensa (Sigma Chemical Co., SAD) s kalijevim peroksodisulfatom do konačne koncentracije 2,45 mM. ABTS i kalijev peroksodisulfat (Sigma Chemical Co., SAD) reagiraju u stehiometrijskom omjeru 1:0,5 te ne dolazi do potpune oksidacije zbog čega je pripremljena otopina omotana folijom i ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 16 sati zaštićena od svjetlosti. Prije analize, dobivena otopina  $ABTS^{\cdot+}$  radikala razrijeđena je s 96%-tnim etanolom do apsorbancije od 0,70 ( $\pm 0,02$ ) izmjerene pri 734 nm (UV-VIS spektrofotometar Agilent 8453E, Hewlett Packard, Njemačka). U 2 ml otopine  $ABTS^{\cdot+}$  radikala dodano je 20  $\mu$ l oleuropeina (1-3  $\mu$ M) odnosno hidroksitirosola (1-3  $\mu$ M) i izmjerena je apsorbancija pri 734 nm nakon 6 minuta. Usporedno je za mjerenje pripremljen slijepi uzorak koji je sadržavao 20  $\mu$ l vode dodane u 2 ml otopine  $ABTS^{\cdot+}$  radikala. Za baždarenje spektrofotometra korišten je fosfatni pufer PBS pH 7,4 (Gibco, Life Technologies, SAD). Za izradu kalibracijske krivulje korišten je Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) odnosno analog vitamina E (Sigma Chemical Co., SAD). Iz osnovne 2 mM otopine Troloxa dobivene otapanjem u fosfatnom puferu PBS pH 7,4 pripremljena su razrijeđenja u koncentracijama 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM i 1 mM. 20  $\mu$ l svake koncentracije Troloxa pomiješano je s po 2 ml otopine  $ABTS^{\cdot+}$  radikala te je nakon 6 minuta očitana apsorbancija pri 734 nm. Antioksidativna aktivnost nepoznatih uzoraka odnosno ispitivanih fenolnih spojeva određena je na temelju grafa ovisnosti  $\Delta A$  o koncentraciji Troloxa, pri čemu je vrijednost  $\Delta A$  dobivena oduzimanjem apsorbancije pojedinog uzorka od apsorbancije slijepe probe. Rezultati ispitivanih uzoraka izraženi su u mM Trolox ekvivalentima.

#### 3.6.2. Redukcija metalnih iona FRAP metodom

FRAP metoda određivanja antioksidativne aktivnosti oleuropeina i hidroksitirosola provedena je sukladno postupku opisanom u radu Benzie i sur. (1996). Ova metoda se zasniva na redukciji bezbojnog kompleksa željezova(III) tripiridiltriazina ( $Fe^{3+}$  - TPTZ) u fero oblik ( $Fe^{2+}$  - TPTZ) intenzivne plave boje pri niskom pH. Nastanak plavog  $Fe^{2+}$  -

TPTZ mjeri se spektrofotometrijski pri 593 nm. Postupak je proveden na način da je po 50  $\mu$ l svakog fenolnog spoja u rasponu koncentracija 1-3  $\mu$ M pomiješano s 950  $\mu$ l svježe pripremljenog FRAP reagensa. Uzorci s reakcijskim smjesama držani su 4 minute na sobnoj temperaturi prije nego im je izmjerena apsorbancija pri 593 nm (UV-VIS spektrofotometar Agilent 8453E, Hewlett Packard, Njemačka). Otopina FRAP reagensa sadržavala je 25 ml 300 mM acetatnog pufera, 2,5 ml 10 mM otopine 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ-a) (Sigma Chemical Co., SAD) i 2,5 ml 20 mM vodene otopine željezova(III) klorida heksahidrata (Sigma Chemical Co., SAD). 10 mM otopina TPTZ-a pripremljena je otapanjem 0,07808 g TPTZ-a u 25 ml prethodno pripremljene 40 mM otopine klorovodične kiseline. Usporedno je pripremljena slijepa proba koja je umjesto uzorka sadržavala 50  $\mu$ l vode pomiješane s 950  $\mu$ l FRAP reagensa. Za izradu kalibracijske krivulje korištena je vodena otopina željezova(II) sulfata heptahidrata (Kemika d.d., Hrvatska). Iz osnovne 1 mM vodene otopine željezova(II) sulfata heptahidrata pripremljena su razrijeđenja u koncentracijama 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM. 50  $\mu$ l svake koncentracije prethodno pripremljenih razrijeđenja otopine željezova(II) sulfata heptahidrata pomiješano je s 950  $\mu$ l otopine FRAP reagensa te je nakon 4 minute izmjerena apsorbancija pri 593 nm u odnosu na slijepi uzorak. Antioksidativna aktivnost nepoznatih uzoraka odnosno ispitivanih fenolnih spojeva određena je na temelju kalibracijskog pravca ovisnosti apsorbancija izmjerenih pri 593 nm o koncentraciji otopine željezova(II) sulfata heptahidrata. Rezultati ispitivanih uzoraka izraženi su u mM željezova(II) sulfata heptahidrata.

### 3.6.3. Redukcija metalnih iona CUPRAC metodom

Mjerenje antioksidativne aktivnosti oleuropeina i hidrokšitirozola CUPRAC metodom provedeno je u skladu s postupkom opisanim u radu Apak i sur. (2004). Princip ove metode temelji se na spektrofotometrijskom određivanju Cu(I)-neokuproin kelatnog kompleksa nastalog kao rezultat redoks reakcije antioksidansa s CUPRAC reagensom [bis(neokuproinbakar(II) kationa)], pri čemu se apsorbancija uzoraka mjeri na valnoj duljini od 450 nm. Za ispitivanje je pripremljena otopina bakrova(II) klorida otapanjem 0,4262 g  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Chemical Co., SAD) u 250 ml vode. Nadalje, pripremljeno je 250 ml otopine amonijevog acetata pH 7,0 otapanjem 19,27 g amonijeva acetata (Kemika d.d., Hrvatska) u vodi i 25 ml otopine neokuproina otapanjem 0,039 g neokuproina u 96%-tnom etanolu. Reakcijske smjese sadržavale su ispitivane tvari



koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$  oleuropeina odnosno 0,15  $\mu\text{g/ml}$  hidroksitirosola),  $10^{-2}$  M otopine bakrova(II) klorida,  $7,5 \times 10^3$  M alkoholne otopine neokuproina i otopinu amonijeva acetata pH 7,0. Usporedno je pripravljena slijepa proba koja nije sadržavala ispitivane tvari. Nakon 30 minuta, izmjerena je apsorbancija uzoraka pri 450 nm (UV-VIS spektrofotometar Agilent 8453E, Hewlett Packard, Njemačka). Za izradu kalibracijske krivulje korišten je Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina). Pripremljena su razrijeđenja Troloxa (Sigma Chemical Co., SAD) otapanjem u fosfatnom puferu PBS pH 7,4 (Gibco, Life Technologies, SAD) u rasponu koncentracija 40 – 400  $\mu\text{M}$ . Antioksidativna aktivnost nepoznatih uzoraka određena je na temelju kalibracijskog pravca ovisnosti apsorbancije izmjerene pri 450 nm o koncentraciji Troloxa. Rezultati ispitivanih uzoraka izraženi su u mM Trolox ekvivalentima.

### Statistička obrada podataka

Svi testovi su napravljeni u triplikatu kroz tri nezavisna mjerenja. Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička analiza provedena je primjenom testa analize varijance (ANOVA) ili studentovog t-testa uz razinu statističke značajnosti  $p < 0,05$ . Statistička značajnost podataka metode s fluorescentnim bojanjem analizirana je  $\chi^2$  testom. Razina statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ . Inhibitorne koncentracije (IC) na vrste roda *Lactobacillus* određene su nelinearnom regresijom.

Za obradu podataka korišten je program GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, SAD).

Podaci iz antigenotoksičnog ispitivanja podvrgnuti su statističkoj obradi primjenom programa Excel i Statistica 12.0 (StatSoft Inc., SAD). Nakon logaritmiranja podataka, pomoću analize varijance i post-hoc Scheffé testa uspoređene su i tumačene dobivene vrijednosti.

## **4. REZULTATI**

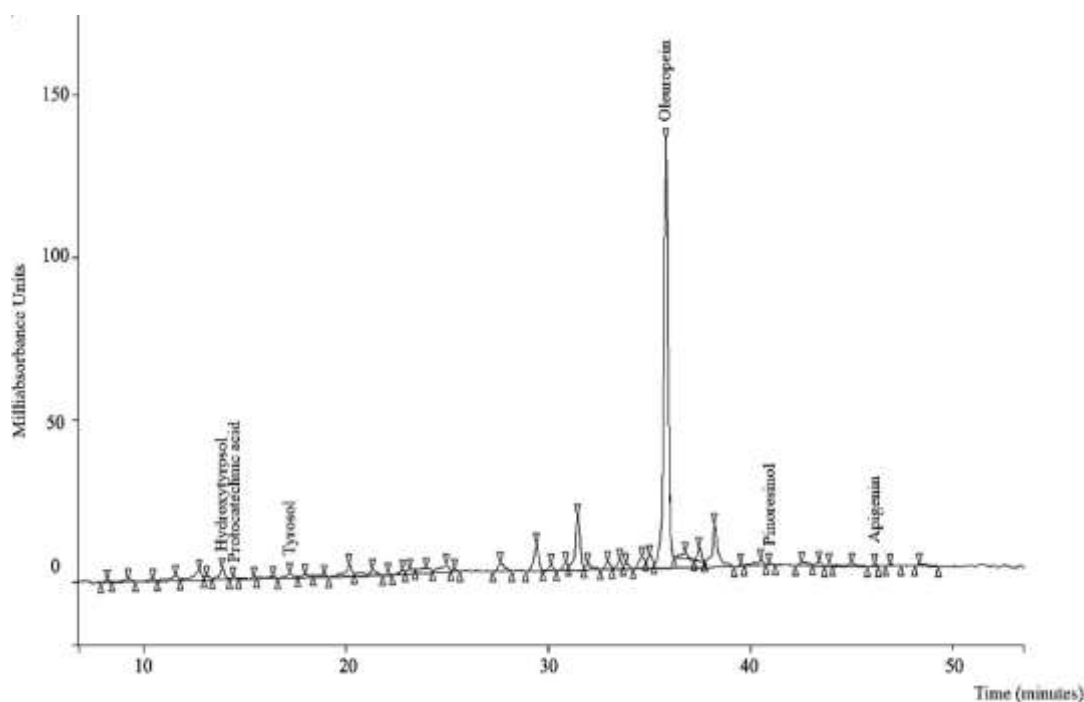
#### 4.1. Analiza polifenola u ekstraktu maslinova lista HPLC metodom

HPLC analizom polifenola u vodenom ekstraktu maslinova lista identificirani su sljedeći spojevi: oleuropein, hidroksitirozol, tirozol, pinorezinol, protokatehuična kiselina i apigenin (Tablica 3). U analiziranom ekstraktu, oleuropein je bio najzastupljeniji spoj ( $9,281 \pm 0,185$  g tirosole / 100 g suhog ekstrakta). HPLC kromatogram fenolnih spojeva u ekstraktu maslinova lista prikazan je na Slici 19.

**Tablica 3.** Sastav fenolnih spojeva u ekstraktu maslinova lista utvrđen HPLC analizom.

Fenolni spoj	Retencijsko vrijeme	Koncentracija fenolnih spojeva (g tirosole/100 g suhog ekstrakta)
Hidroksitirozol	13.9	$0.252 \pm 0.033$
Protokatehuična kiselina	14.4	$0.036 \pm 0.015$
Tirozol	17.2	$0.144 \pm 0.030$
Oleuropein	35.8	$9.281 \pm 0.185$
Pinorezinol	40.9	$0.088 \pm 0.039$
Apigenin	46.1	$0.024 \pm 0.013$
n.i.*		$9.807 \pm 0.362$

\*ukupni neidentificirani fenolni spojevi



**Slika 19.** HPLC kromatogram vodenog ekstrakta maslinova lista pri 280 nm; fenolni spojevi identificirani usporedbom njihovih retencijskih vremena i UV spektra (200 – 400 nm).

## 4.2. Ispitivanje antifungalnog učinka

### 4.2.1. Testovi ispitivanja djelovanja na gljivičnu vijabilnost

#### 4.2.1.1. Određivanje antimikrobnog učinka metodom mikrodilucije

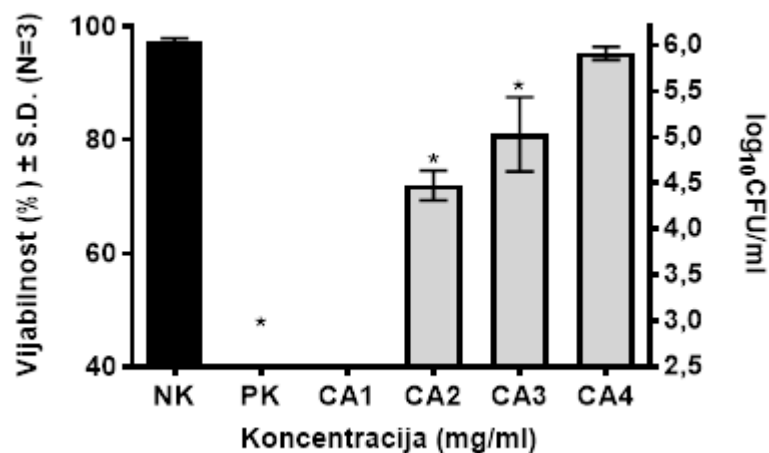
Rezultati ispitivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) na gljivičnim vrstama uzetim iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu metodom mikrodilucije u skladu s EUCAST smjernicama E.DEF 7.3 (2015) dani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) u mg/ml gljivičnih vrsta utvrđene mikrodilucijskom metodom.

Vrsta	Hidroksitirozol	Oleuropein	Ekstrakt maslinova lista
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6,25	12,5	25
<i>Candida albicans</i> MFBF 11103	6,25	12,5	25
<i>Candida dubliniensis</i> MFBF 10837	6,25	6,25	12,5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1,5625	1,5625	6,25
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	6,25	1,5625	6,25
<i>Candida kefyr</i> ATCC 2512	1,5625	3,125	1,5625
<i>Candida curvata</i> MFBF 10827	0,0976	0,781	0,3906
<i>Blastoschizomyces</i> <i>capitatum</i> MFBF 10837	0,1953	1,5625	6,25
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> NCTY 87	6,25	3,125	6,25

#### 4.2.1.2. Određivanje antimikrobnog učinka metodom bojanja s tripan plavom

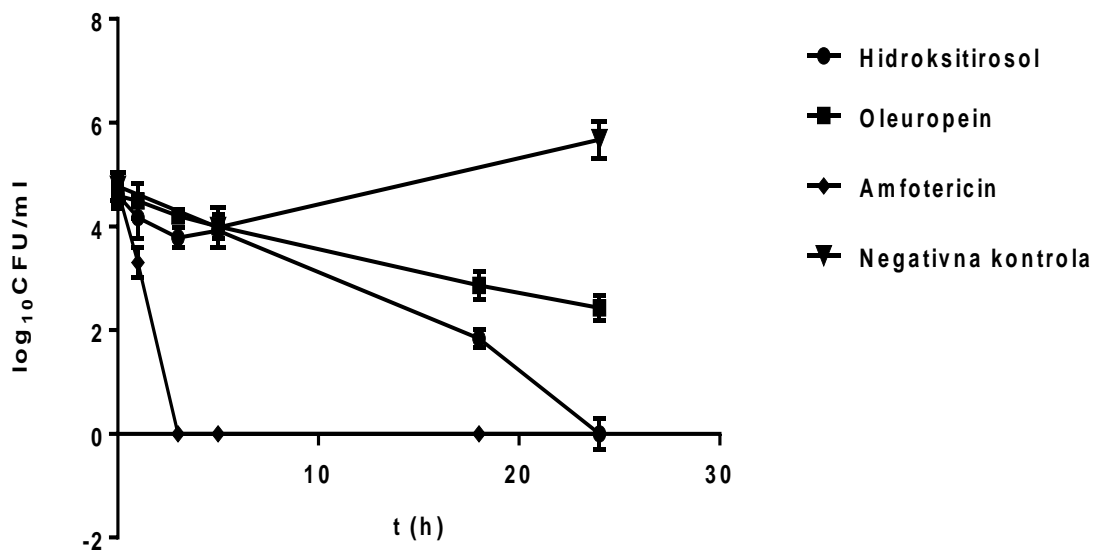
Rezultati određivanja učinka na vrstu *C. albicans* metodom bojanja s tripan plavom pokazuju da je nakon 18 sati inkubacije tretiranih stanica došlo do smanjenja vijabilnih blastospora te da je navedeni učinak bio ovisan o primijenjenoj koncentraciji, međutim uzorci koji su sadržavali gustoću stanica manju od  $10^4$  CFU/ml nisu se mogli mjeriti. Vodeni ekstrakt maslinova lista u koncentracijama 46,875; 15,625 i 1,5625 mg/ml uzrokovao je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) smanjenje vijabilnosti stanica vrste *C. albicans* u usporedbi s negativnom kontrolom.



**Slika 20.** Vijabilnost vrste *C. albicans* ATCC 10231 nakon tretmana s ekstraktom maslinova lista pri različitim koncentracijama (46,875 (CA1); 15,625 (CA2); 1,5625 (CA3) i 0,390625 (CA4) mg/ml) primjenom metode s tripan plavom (PK-pozitivna kontrola: amfotericin B, 1  $\mu$ g/ml; NK-negativna kontrola, netretirane stanice, \* $p < 0,05$  u usporedbi s negativnom kontrolom). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti  $\pm$  SD.

#### 4.2.1.3. Određivanje kinetike stanične smrti vrste *C. albicans* („time-kill“ metoda)

U svrhu ispitivanja učinka koji imaju oleuropein i hidroksitirozol na staničnu vijabilnost vrste *C. albicans* u ovisnosti o vremenu proveden je „time-kill“ test. Usporedni rezultati ispitivanja za oleuropein, hidroksitirozol, amfotericin i negativnu kontrolu (netretirane stanice) dani su na Slici 21. Ispitivane tvari u koncentracijama dva puta većim od njihove eksperimentalno utvrđene MIK vrijednosti pokazale su antifungalni učinak koji je doveo do redukcije stanične vijabilnosti nakon 24-satne inkubacije. Log redukcija blastospora vrste *C. albicans* tretiranih oleuropeinom i hidroksitirozolom bila je sporija u usporedbi s amfotericinom.



**Slika 21.** „Time-kill“ krivulje vrste *C. albicans* tretirane oleuropeinom (25 mg/ml), hidroksitirozolom (12,5 mg/ml) i amfotericinom (10 µg/ml); negativna kontrola – netretirane stanice. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD.

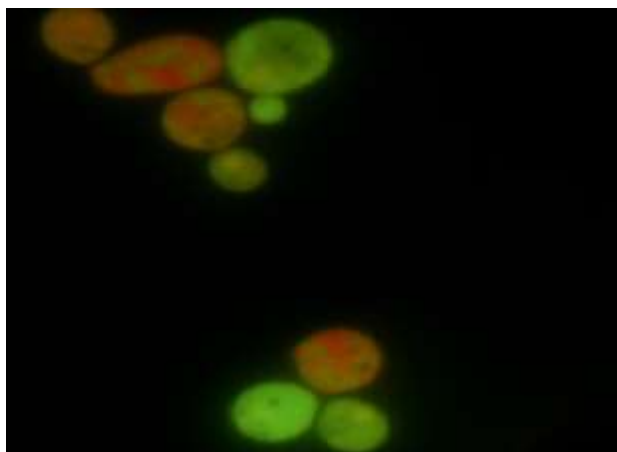
#### 4.2.1.4. Određivanje apoptoze/nekroze uslijed gubitka membranskog integriteta stanica vrste *C. albicans*

**Tablica 5.** Rezultati kvantitativnog testa s fluorescentnim bojanjem za identifikaciju apoptotičkih i nekrotičkih stanica uslijed gubitka membranskog integriteta kod vrste *C. albicans* ATCC 10231 tretirane kroz 18 sati s oleuropeinom u uvjetima *in vitro*.

Uzorak	Vijabilne stanice (%)	Ne-vijabilne stanice		
	$\Sigma$	Apoptoza (%)	Nekroza (%)	
<b>OLP<sub>1</sub></b>	16,3±2,1	83,7±2,1 <sup>OLP2,OLP3,NK</sup>	39,3±11,2 <sup>OLP2,OLP3,NK,PK</sup>	44,3±10,2 <sup>OLP2,OLP3,NK,PK</sup>
<b>OLP<sub>2</sub></b>	61,3±6,0	38,7±6,0 <sup>OLP3,NK,PK</sup>	29,0±4,6 <sup>OLP3,NK,PK</sup>	9,7±1,5 <sup>NK</sup>
<b>OLP<sub>3</sub></b>	76,0±6,6	24,0±6,6 <sup>NK, PK</sup>	14,7±5,5 <sup>NK,PK</sup>	9,3±1,5 <sup>NK</sup>
<b>PK</b>	11,7±3,2	88,3±3,2 <sup>NK</sup>	78,7±0,6 <sup>NC</sup>	9,7±3,8 <sup>NK</sup>
<b>NK</b>	97,3±0,6	2,7±0,6	1,0±1,0	1,7±1,1

Analizirano je 300 stanica po uzorku za svaku eksperimentalnu točku. Prikazana je srednja vrijednost ± SD. OLP – koncentracija oleuropeina (OLP<sub>1</sub> – 12,5 mg/ml; OLP<sub>2</sub> – 1,25 mg/ml; OLP<sub>3</sub> – 0,195 mg/ml); PK – pozitivna kontrola (amfotericin B, 1 µg/ml); NK – negativna kontrola (RPMI). Statistička značajnost podataka analizirana je  $\chi^2$  testom. Razina statističke značajnosti je postavljena na  $p < 0,05$ . Kratice naznačene pored srednjih vrijednosti označavaju u odnosu na koju grupu se određena grupa razlikuje sa statističkom razlikom.

Kvantitativnom metodom s fluorescentnim bojanjem (Tablica 5) utvrđeno je da oleuropein značajno ( $p < 0,05$ ; Pearson  $\chi^2$  test) smanjuje staničnu vijabilnost u usporedbi s negativnom kontrolom pri testiranim koncentracijama (12,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,195 mg/ml). Analizom stanica vrste *C. albicans* nakon 18-satnog tretmana s oleuropeinom utvrđen je koncentracijski ovisan citotoksični učinak. Nadalje, usporedba pojedinih skupina, vijabilnih vs. ne-vijabilnih stanica, primjenom Pearsonovog  $\chi^2$  testa pokazala je statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) između testiranih koncentracija. U uzorcima tretiranim s koncentracijama oleuropeina, 1,25 mg/ml i 0,195 mg/ml, apoptoza je bila predominantni tip stanične smrti. Diferencijacija između vijabilnih i ne-vijabilnih stanica nakon tretmana s ispitivanom tvari i promijenjena morfologija kromatina jezgre snimljena fluorescencijskim mikroskopom vidljiva je na Slici 22.



**Slika 22.** Izgled blastospora vrste *C. albicans* tretirane oleuropeinom nakon bojanja s etidijevim bromidom i akridin narančastom u skladu s metodom fluorescentnog bojanja: vijabilne normalne blastospore isključuju etidijev bromid i njihove jezgre su svijetlo zelene s intaktnom strukturom. Ne-vijabilne stanice imaju narančasto do crveno obojan kromatin s organiziranom strukturom. Apoptotičke stanice su svijetlo zelene s jako kondenziranim ili fragmentiranim jezgrama (snimljeno pri povećanju mikroskopa 400x).

**Tablica 6.** Rezultati kvantitativnog testa s fluorescentnim bojanjem za identifikaciju apoptotičkih i nekrotičkih stanica uslijed gubitka membranskog integriteta kod vrste *C. albicans* ATCC 10231 tretirane kroz 18 sati s hidroksitirozolom u uvjetima *in vitro*.

Uzorak	Vijabilne stanice (%)	Ne-vijabilne stanice		
		Σ	Apoptoza (%)	Nekroza (%)
HT <sub>1</sub>	12,0±1,0	88,0±1,0 <sup>HT2,HT3,NK</sup>	1,6±1,2 <sup>HT2,PK</sup>	86,3±2,5 <sup>HT2,HT3,NK</sup>
HT <sub>2</sub>	66,0±2,5	34,0±2,5 <sup>HT3,NK,PK</sup>	23,0±1,6 <sup>HT3,NK,PK</sup>	11,0±1,1 <sup>NK,PK</sup>
HT <sub>3</sub>	96,0±1,5	4,0±1,5 <sup>NK,PK</sup>	2,3±2,5 <sup>PK</sup>	1,6±1,0 <sup>PK</sup>
PK	8,0±1,3	92,0±1,3 <sup>NK</sup>	6,3±0,6 <sup>NK</sup>	85,6±0,7 <sup>NK</sup>
NK	99,0±3,2	1,0±3,2	0,3±3,8	0,6±0,6

Analizirano je 300 stanica po uzorku za svaku eksperimentalnu točku. Prikazana je srednja vrijednost ± SD. HT – koncentracija hidroksitirozola (HT<sub>1</sub> – 625 µg/ml; HT<sub>2</sub> – 97,6 µg/ml; HT<sub>3</sub> – 12,21 µg/ml); PK – pozitivna kontrola (amfotericin B, 1 µg/ml); NK – negativna kontrola (RPMI). Statistička značajnost podataka analizirana je  $\chi^2$  testom. Razina statističke značajnosti je postavljena na  $p < 0,05$ . Kratice naznačene pored srednjih vrijednosti označavaju u odnosu na koju grupu se određena grupa razlikuje sa statističkom razlikom.



Pri subinhibitornim koncentracijama (625 µg/ml; 97,6 µg/ml; 12,21 µg/ml), ispitan je učinak hidroksitirosola na staničnu vijabilnost vrste *C. albicans* ATCC 10231 metodom s fluorescentnim bojanjem (Tablica 6). Nakon 18-satnog tretmana utvrđena je koncentracijski ovisna redukcija stanične vijabilnosti u usporedbi s kontrolom. Statističkom analizom vijabilnih vs ne-vijabilnih stanica Pearsonovim  $\chi^2$  testom utvrđena je značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između testiranih koncentracija.

**Tablica 7.** Rezultati kvantitativnog testa s fluorescentnim bojanjem za identifikaciju apoptotičkih i nekrotičkih stanica uslijed gubitka membranskog integriteta kod vrste *C. albicans* ATCC 10231 tretirane kroz 18 sati s vodenim ekstraktom maslinova lista u uvjetima *in vitro*.

Uzorak	Vijabilne stanice (%)	Ne-vijabilne stanice		
		$\Sigma$	Apoptoza (%)	Nekroza (%)
E <sub>1</sub>	28,3±11,0	71,6±11,0 <sup>E3,E4,NK</sup>	21,3±10,9 <sup>E2,E3,E4,PK</sup>	50,3±1,5 <sup>E2,E3,E4,NK</sup>
E <sub>2</sub>	27,3±2,3	72,6±2,3 <sup>E3,E4,NK</sup>	50,0±4,0 <sup>E3,E4,NK</sup>	22,6±4,6 <sup>E3,E4,NK</sup>
E <sub>3</sub>	52,3±6,4	47,6±6,4 <sup>E4,NK</sup>	39,6±6,3 <sup>E4,NK</sup>	8,0±1,0 <sup>E4,NK</sup>
E <sub>4</sub>	88,0±1,0	12,0±1,0 <sup>NK</sup>	9,6±2,5 <sup>NK</sup>	2,3±1,5
NK	98,0±0,58	1,6±0,58	0,6±0,58	1,0±1,0

Analizirano je 300 stanica po uzorku za svaku eksperimentalnu točku. Prikazana je srednja vrijednost ± SD. E – koncentracija vodenog ekstrakta maslinova lista (E<sub>1</sub> – 46,875 mg/ml; E<sub>2</sub> – 15,625 mg/ml; E<sub>3</sub> – 1,5625 mg/ml; E<sub>4</sub> – 0,390625 mg/ml); PK – pozitivna kontrola (amfotericin B, 1 µg/ml); NK – negativna kontrola (RPMI). Statistička značajnost podataka analizirana je  $\chi^2$  testom. Razina statističke značajnosti je postavljena na  $p < 0,05$ . Kratice naznačene pored srednjih vrijednosti označavaju u odnosu na koju grupu se određena grupa razlikuje sa statističkom razlikom.

Rezultati kvantitativne analize za identifikaciju apoptotičkih i nekrotičkih stanica u uzorcima inkubiranim s vodenim ekstraktom maslinova lista dani su u Tablici 7. Pri četiri testirane koncentracije (46,875 mg/ml; 15,625 mg/ml; 1,5625 mg/ml; 0,390625 mg/ml), vodeni ekstrakt maslinova lista pokazao je statistički značajno ( $p < 0,05$ ; Pearsonov  $\chi^2$  test) smanjenje stanične vijabilnosti u usporedbi s negativnom kontrolom nakon 18 sati inkubacije. Citotoksični učinak ekstrakta bio je koncentracijski ovisan. Usporedbom testiranih skupina, utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između sve četiri ispitivane koncentracije.

Nekroza je bila predominantni tip stanične smrti jedino u uzorku s najvišom koncentracijom ekstrakta (46, 875 mg/ml), dok je u svim ostalim uzorcima prevladavala apoptoza.

#### 4.2.1.5. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja u kombinaciji s antimikotikom

Kako bi se utvrdila priroda interakcija u kombinacijama amfotericina i oleuropeina odnosno amfotericina i hidroksitirosola uspoređene su mikrodilucijski određene (u skladu s EUCAST smjernicom E.DEF 7.3) MIK vrijednosti pojedinačnih tvari i MIK vrijednosti kombinacije navedenih tvari. FIK indeks za kombinaciju oleuropein i amfotericin iznosi 1,125 što upućuje na indiferentno djelovanje kombinacije ovih dviju tvari. FIK indeks za kombinaciju hidroksitirosol i amfotericin iznosi 1,5 što također upućuje na indiferentno djelovanje kombinacije ovih dviju tvari.

#### 4.2.2. Testovi ispitivanja djelovanja na virulentne čimbenike vrste *C. albicans* u uvjetima *in vitro*

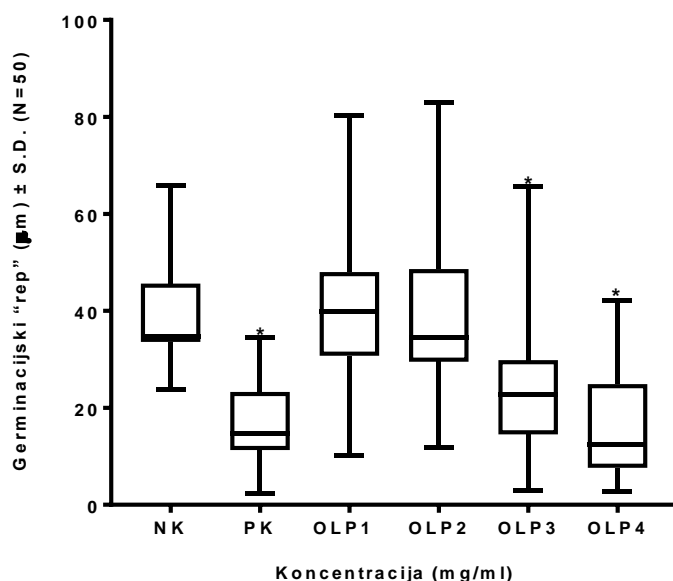
##### 4.2.2.1. Ispitivanje inhibicije germinacije

Vrsta *C. albicans* je polimorfna gljivična vrsta koja može biti u obliku blastospore ili filamentoznom obliku. Rast hifa promovira virulenciju i ima važnu ulogu u invaziji tkiva i rezistenciji na fagocitozu. Ova morfološka promjena događa se kao odgovor na okolišne čimbenike, poput dostupnosti hranjivih tvari, visoke temperature, pH i prisutnosti makrofaga nositelja. Iz navedenog razloga ispitan je inhibitorni učinak oleuropeina i hidroksitirosola u uvjetima u kojima dolazi do indukcije hifa. Za test su korištene dvije vrste tekuće hranjive podloge „siromašnog“ sastava, i to medij s N-acetil-D-glukozaminom (GlkNAc) kao jedinim izvorom ugljika i Spiderov medij koji sadrži manitol kao izvor ugljika.

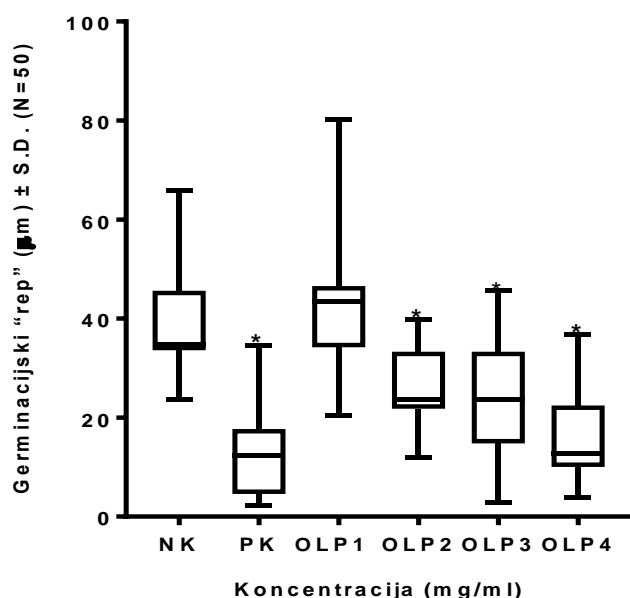
Nakon 3-satne inkubacije uzorka s oleuropeinom na 35 °C, statistički značajna ( $p < 0,05$ ) inhibicija morfološke promjene vrste *C. albicans* u filamentozni oblik primijećena je za oba testirana medija (Slike 23-25). Za GlkNAc medij, značajna razlika u usporedbi s negativnom kontrolom utvrđena je pri višim koncentracijama ispitivane tvari (5 mg/ml i 2,5 mg/ml). Inhibitorni učinak oleuropeina je bio jači u Spiderovom mediju nego u NAcDGlk mediju pri testiranim koncentracijama. Pri koncentracijama 5 mg/ml, 2,5 mg/ml i 1,25 mg/ml utvrđena je značajna razlika ( $p < 0,05$ ) inhibitornog učinka u Spiderovom mediju u usporedbi s kontrolom.

Iz dobivenih vidljivo je da je učinak hidroksitirosola na inhibiciju germinacije vrste *C. albicans* jači nego učinak oleuropeina pri testiranim koncentracijama (Slika 26-28). Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) inhibitornog djelovanja u usporedbi s kontrolom za hidroksitirosol

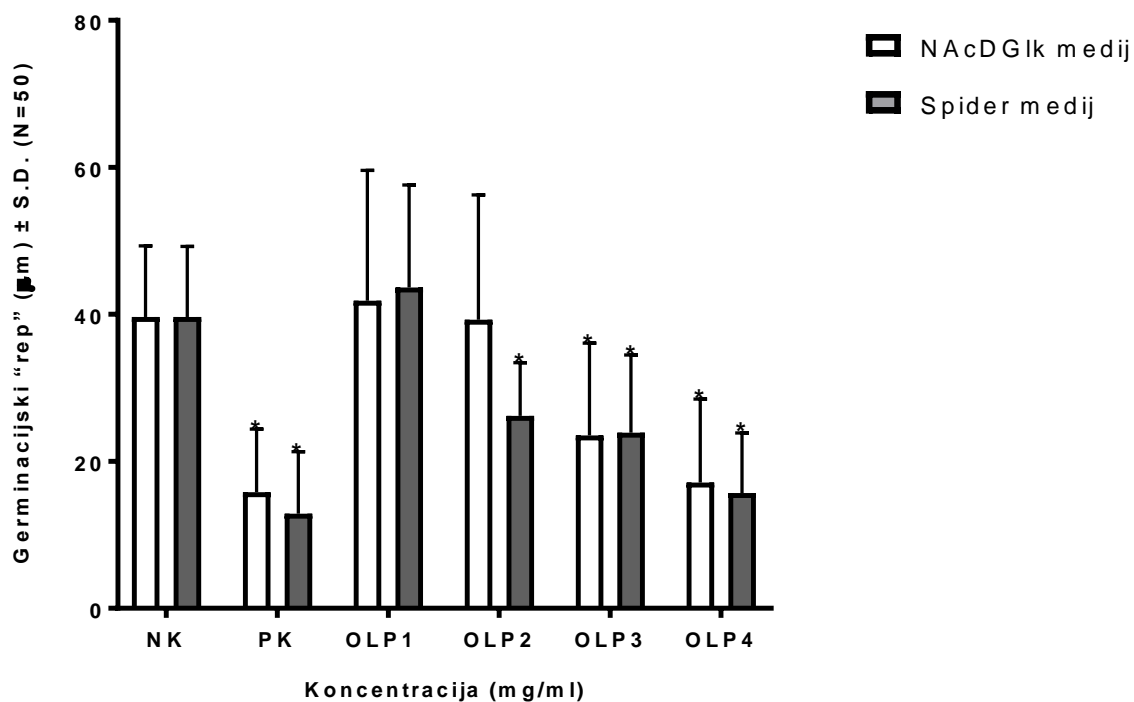
uočene su kod koncentracija 1 mg/ml i 0,5 mg/ml za NAcDGlk medij te 1 mg/ml, 0,5 mg/ml i 0,25 mg/ml za Spiderov medij.



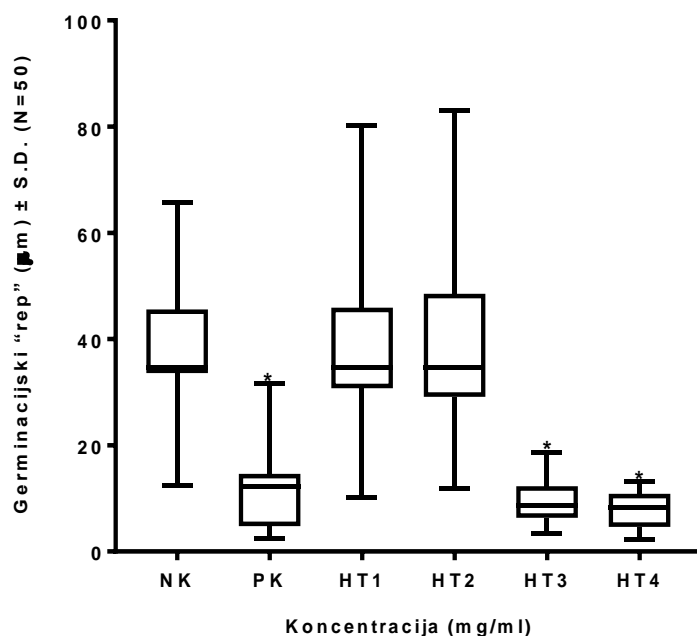
**Slika 23.** Rezultati inhibitornog učinka oleuropeina (OLP) na germinaciju vrste *C. albicans* ATCC 10231 u mediju s N-acetil-D-glukozaminom; OLP1 – 0,625 mg/ml, OLP2 – 1,25 mg/ml, OLP3 – 2,5 mg/ml, OLP4 – 5 mg/ml; NK – negativna kontrola (netretirane stanice); PK – pozitivna kontrola, amfotericin B (1 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.



**Slika 24.** Rezultati inhibitornog učinka oleuropeina (OLP) na germinaciju vrste *C. albicans* ATCC 10231 u Spiderovom mediju; OLP1 – 0,625 mg/ml, OLP2 – 1,25 mg/ml, OLP3 – 2,5 mg/ml, OLP4 – 5 mg/ml; NK – negativna kontrola (netretirane stanice); PK – pozitivna kontrola, amfotericin B (1 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

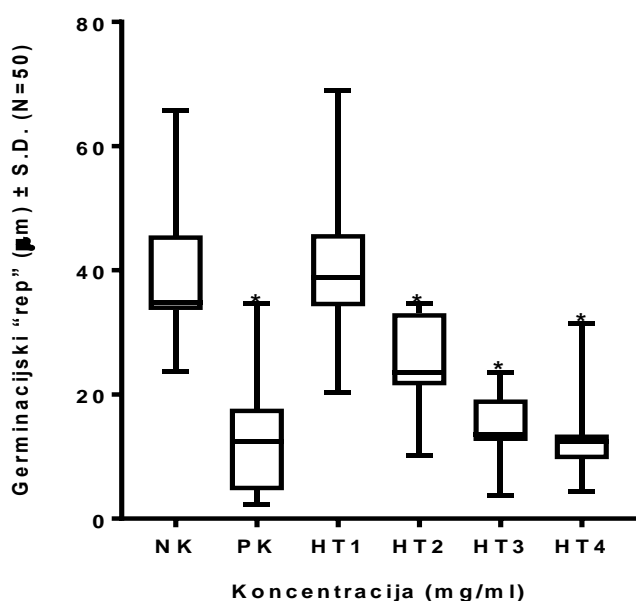


**Slika 25.** Usporedni prikaz inhibitornog učinka oleuropeina (OLP) na germinaciju vrste *C. albicans* ATCC 10231 u dva ispitivana medija; OLP1 – 0,625 mg/ml, OLP2 – 1,25 mg/ml, OLP3 – 2,5 mg/ml, OLP4 – 5 mg/ml; NK – negativna kontrola (netretirane stanice); PK – pozitivna kontrola, amfotericin B (1 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvijezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

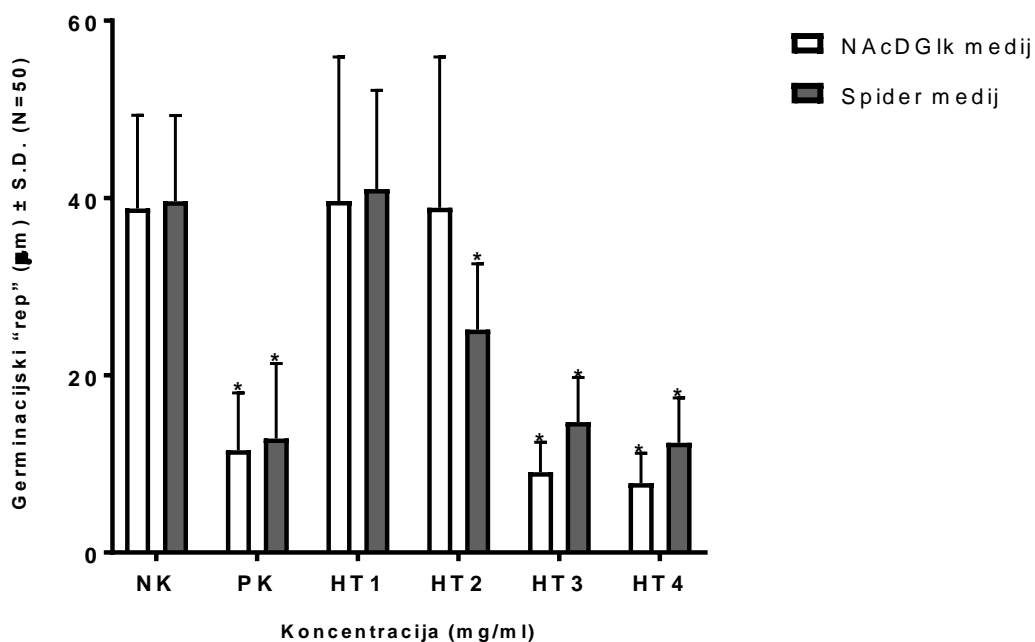


**Slika 26.** Rezultati inhibitornog učinka hidroksitirosola na germinaciju vrste *C. albicans* ATCC 10231 u mediju s N-acetil-D-glukozaminom; HT1 – 0,125 mg/ml, HT2 – 0,25 mg/ml, HT3 – 0,5 mg/ml, HT4 – 1 mg/ml; NK – negativna kontrola (netretirane stanice); PK – pozitivna kontrola, amfotericin B (1 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD.

Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.



**Slika 27.** Rezultati inhibitorynog učinka hidroksitirozola na germinaciju vrste *C. albicans* ATCC 10231 u Spiderovom mediju; HT1 – 0,125 mg/ml, HT2 – 0,25 mg/ml, HT3 – 0,5 mg/ml, HT4 – 1 mg/ml; NK – negativna kontrola (netretirane stanice); PK – pozitivna kontrola, amfotericin B (1 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.



**Slika 28.** Usporedni prikaz inhibitorynog učinka hidroksitirozola na germinaciju vrste *C. albicans* ATCC 10231 u dva ispitivana medija; HT1 – 0,125 mg/ml, HT2 – 0,25 mg/ml, HT3 – 0,5 mg/ml, HT4 – 1 mg/ml; NK – negativna kontrola (netretirane stanice); PK – pozitivna kontrola, amfotericin B (1 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

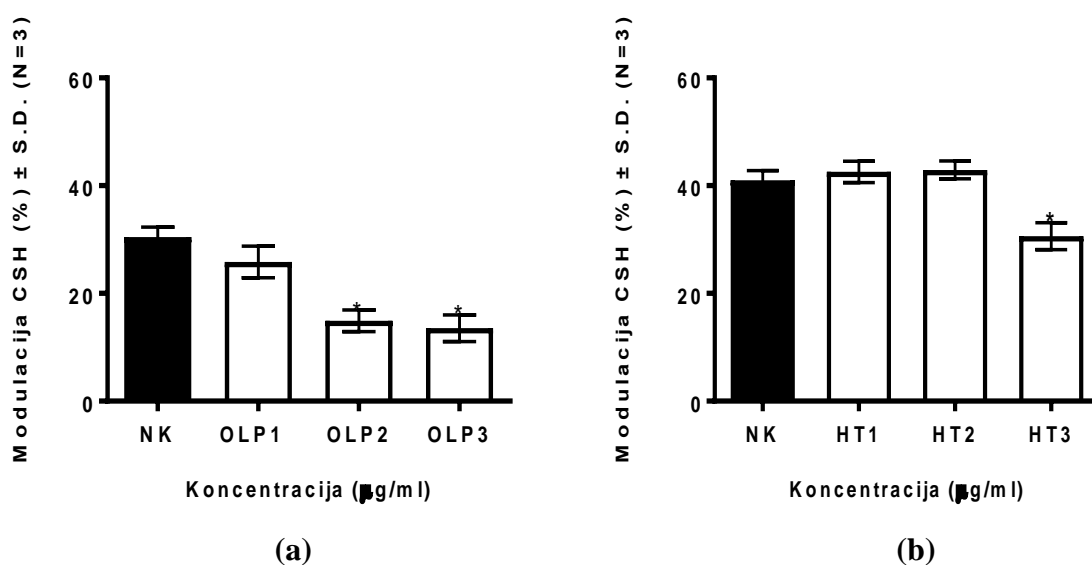
kontrola, amfotericin B (1 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne (p < 0,05) u usporedbi s negativnom kontrolom.

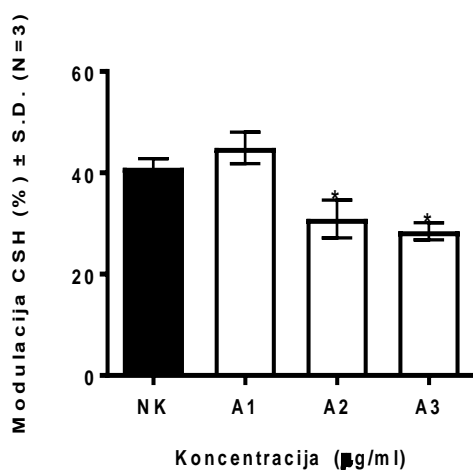
#### 4.2.2.2. Modulacija površinske stanične hidrofobnosti (CSH)

Rezultati ispitivanja učinka subinhibitornih koncentracija oleuropeina (97,6 µg/ml; 48,83 µg/ml; 24,41 µg/ml) na površinsku staničnu hidrofobnost (CSH) vrste *C. albicans* ATCC 10231 prikazani su na Slici 29. U usporedbi s negativnom kontrolom, oleuropein je uzrokovao statistički značajnu (p < 0,05) promjenu hidrofobnosti nakon 24 sata inkubacije pri 25 °C, i to pri koncentraciji 97,6 µg/ml s 34,05 ± 1,85% na 13,55 ± 2,46%, i pri koncentraciji 48,83 µg/ml s 34,05 ± 1,85% na 14,92 ± 1,99%.

Navedenim testom pokazano je i da subinhibitorne koncentracije hidroksitirozola (390,4 µg/ml, 195 µg/ml i 97,6 µg/ml) moduliraju staničnu površinsku hidrofobnost (Slika 29). Statističkom analizom prikupljenih podataka utvrđeno je da ispitivana tvar, pri najvišoj testnoj koncentraciji (390,4 µg/ml) uzrokuje statistički značajnu modulaciju stanične površinske hidrofobnosti, nakon 24 sata inkubacije, smanjenjem hidrofobnosti s 41,02 ± 1,76% na 30,63 ± 1,02%.

Dodatno je proveden test s amfotericinom B (Slika 29) te je utvrđeno da je pod utjecajem amfotericina B hidrofobnost smanjena s 41,02 ± 1,76% na 28,47 ± 1,67% pri koncentraciji 0,25 µg/ml, i s 41,02 ± 1,76% na 30,24 ± 3,72% pri koncentraciji 0,125 µg/ml.



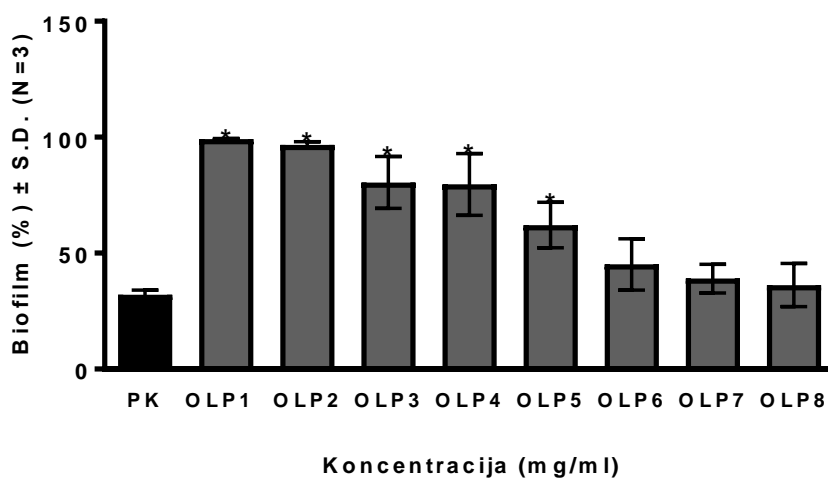


(c)

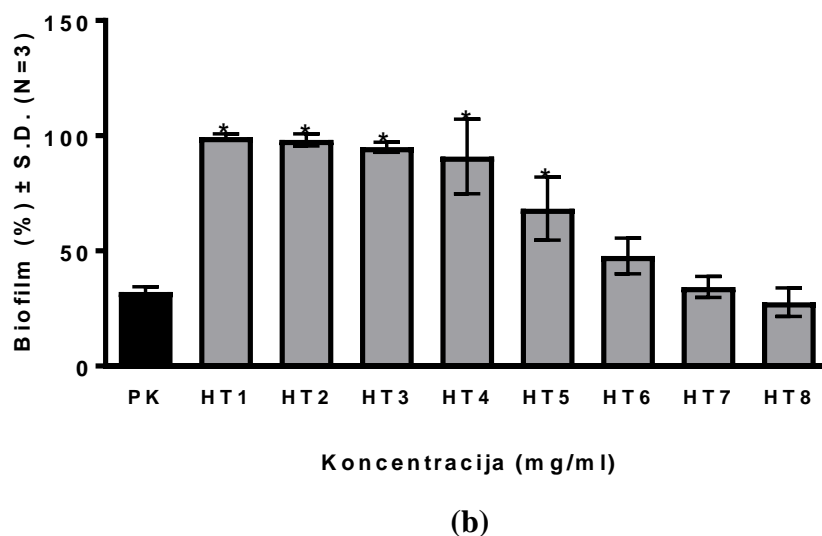
**Slika 29.** Utjecaj oleuropeina (OLP) (a), hidroksitirosola (HT) (b) i amfotericina B (A) (c) na površinsku staničnu hidrofobnost (CSH) kod vrste *C. albicans*; OLP1 – 24,41 µg/ml; OLP2 – 48,83 µg/ml; OLP3 – 97,6 µg/ml; HT1 – 97,6 µg/ml; HT2 – 195 µg/ml; HT3 – 390,4 µg/ml; A1 – 0,0625 µg/ml; A2 – 0,125 µg/ml; A3 – 0,25 µg/ml. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označeni rezultati modulacije CSH vrijednosti koja je statistički značajna ( $p < 0.05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom (NK).

#### 4.2.2.3. Ispitivanje učinka na stvaranje biofilma vrste *C. albicans*

Spektrofotometrijskim mjerenjem pri 570 nm kvantificiran je učinak oleuropeina i hidroksitirosola na stvaranje biofilma vrste *C. albicans* ATCC 10231. Rezultati ispitivanja dani su na Slici 30.



(a)



**Slika 30.** Učinak (a) oleuropeina (OLP) i (b) hidroksitirosola (HT) na stvaranje biofilma vrste *C. albicans*; OLP1, HT1 – 3,125 mg/ml; OLP2, HT2 – 6,25 mg/ml; OLP3, HT3 – 12,5 mg/ml; OLP4, HT4 – 25 mg/ml; OLP5, HT5 – 50 mg/ml; OLP6, HT6 – 75 mg/ml; OLP7, HT7 – 100 mg/ml; OLP8, HT8 – 150 mg/ml; PK – pozitivna kontrola (amfotericin B, 1 mg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti  $\pm$  SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s pozitivnom kontrolom.

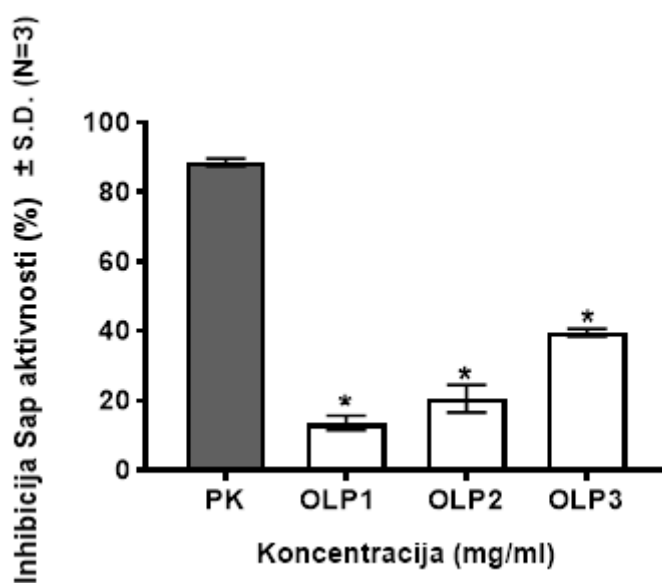
#### 4.2.2.4. Inhibicija aktivnosti gljivičnih hidrolitičkih enzima

##### 4.2.2.4.1. Inhibicija aktivnosti aspartil-proteaza (Sap)

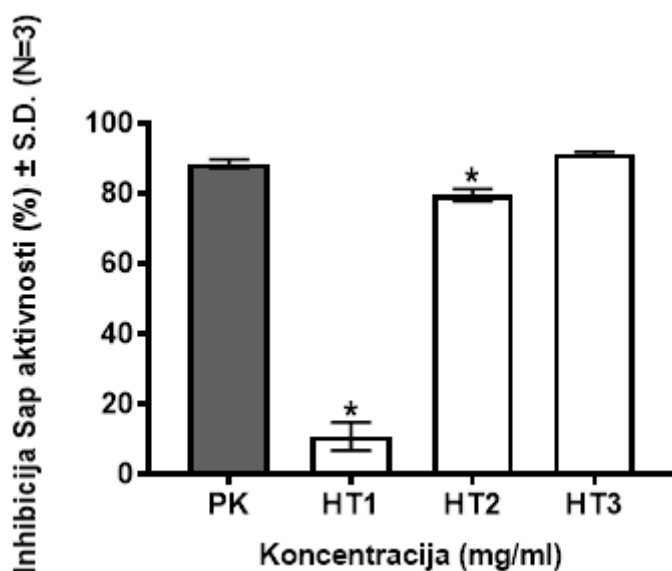
Značajnu ulogu u adherenciji i invaziji tkiva nositelja imaju kandidini izvanstanični hidrolitički enzimi. Najznačajniji hidrolitički enzimi uključeni u virulenciju vrste *C. albicans* su aspartil-proteaze (Sap). Njihova povezanost s virulencijom utvrđena je kroz njihovu ulogu u razgradnji staničnih supstrata poput proteina povezanih s imunološkom i strukturnom obranom nositelja.

Uzgoj kliničkog izolata vrste *C. albicans* u prisutnosti oleuropeina (12,5 mg/ml; 6,25 mg/ml; 3,125 mg/ml) i hidroksitirosola (3,125 mg/ml; 1,5625 mg/ml) uzrokovala je statistički značajnu ( $p < 0,05$ ) inhibiciju Sap aktivnosti u usporedbi s pozitivnom kontrolom (Slika 31 i 32). Inhibitorni učinak je bio u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji.





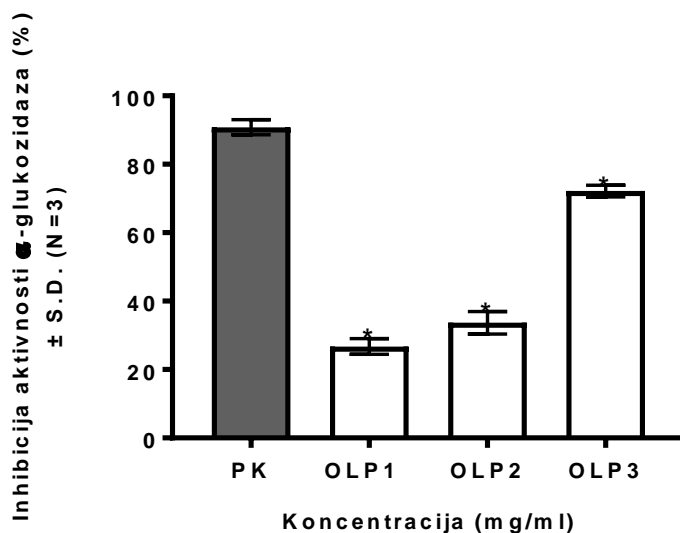
**Slika 31.** Inhibicija aktivnosti gljivične Sap proteaze tretirane različitim koncentracijama oleuropeina (OLP); OLP1 – 3,125 mg/ml; OLP2 – 6,25 mg/ml; OLP3 – 12,5 mg/ml; PK – pozitivna kontrola (pepstatin A, 100 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s pozitivnom kontrolom.



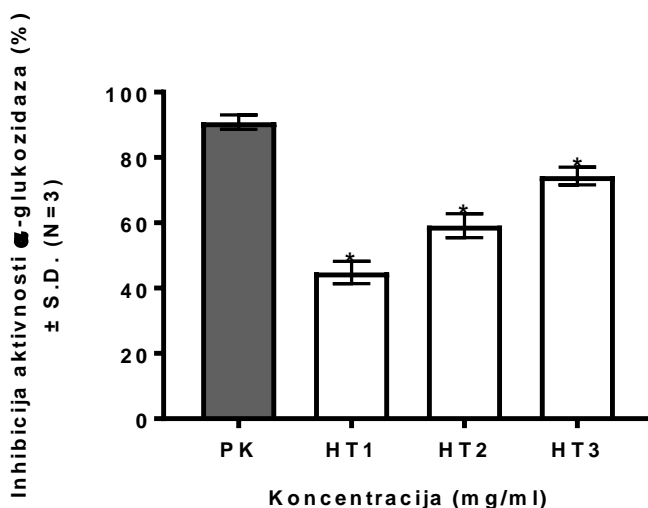
**Slika 32.** Inhibicija aktivnosti gljivične Sap proteaze tretirane različitim koncentracijama hidroksitirosola (HT); HT1 – 1,5625 mg/ml; HT2 – 3,125 mg/ml; HT3 – 6,25 mg/ml; PK – pozitivna kontrola (pepstatin A, 100 µg/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s pozitivnom kontrolom.

#### 4.2.2.4.2. Inhibicija aktivnosti $\alpha$ -glukozidaza

Spektrofotometrijskom metodom ispitani su učinci oleuropeina i hidroksitirosola na kliničkom izolatu vrste *C. albicans* s utvrđenom najvećom produkcijom izvanstaničnih  $\alpha$ -glukozidaza induciranih pod restriktivnim uvjetima korištenjem medija koji sadrži maltozu kao jedini izvor ugljika za uzgoj. Rezultati ispitivanja dani su na Slikama 33 i 34.



**Slika 33.** Inhibicija aktivnosti gljivične  $\alpha$ -glukozidaze tretirane različitim koncentracijama oleuropeina (OLP); OLP1 – 6,25 mg/ml; OLP2 – 12,5 mg/ml; OLP3 – 25 mg/ml; PK – pozitivna kontrola (akarboza, 250  $\mu$ g/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti  $\pm$  SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s kontrolom.



**Slika 34.** Inhibicija aktivnosti gljivične  $\alpha$ -glukozidaze tretirane različitim koncentracijama hidroksitirosola (HT); HT1 – 3,125 mg/ml; HT2 – 6,25 mg/ml; HT3 – 12,5 mg/ml; PK – pozitivna kontrola (akarboza, 250  $\mu$ g/ml). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti  $\pm$  SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s kontrolom.

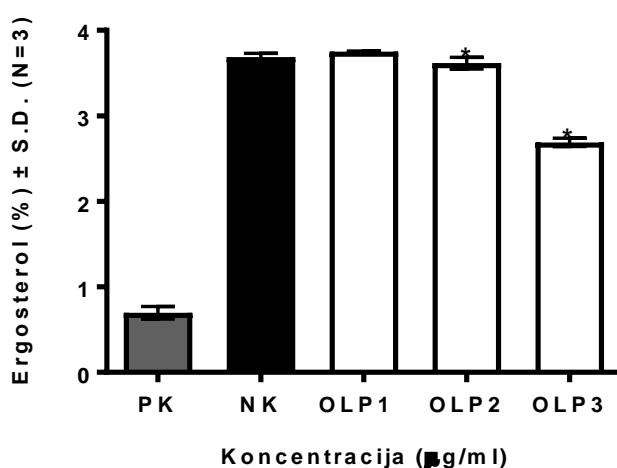
## 4.2.3. Ispitivanje mehanizama fungicidnog djelovanja oleuropeina i hidroksitirosola

### 4.2.3.1. Modulacija sadržaja membranskog ergosterola

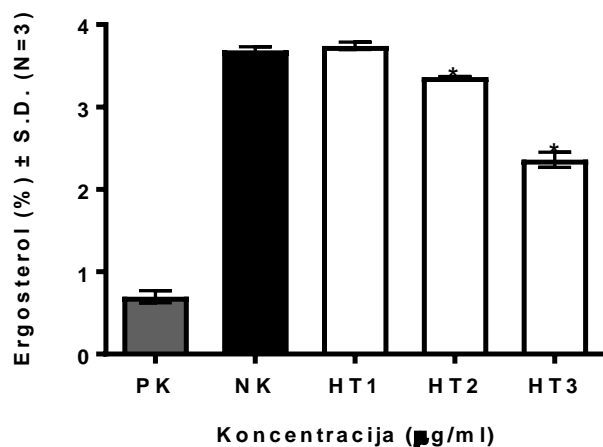
Većina terapija za liječenje gljivičnih infekcija utječe na put biosinteze ergosterola ili krajnji produkt tog puta, odnosno ergosterol. Ovaj membranski sterol je jedinstven za gljivične vrste, i neophodan je za rast i normalnu membransku funkciju gljivičnih stanica. Na primjer, primarni mehanizam kojim široko korišteni azolni antimikotici inhibiraju gljivični rast je kroz narušavanje sterolnog biosintetskog puta što posljedično dovodi do redukcije biosinteze ergosterola.

#### 4.2.3.1.1. Određivanje ergosterola spektrofotometrijskom metodom

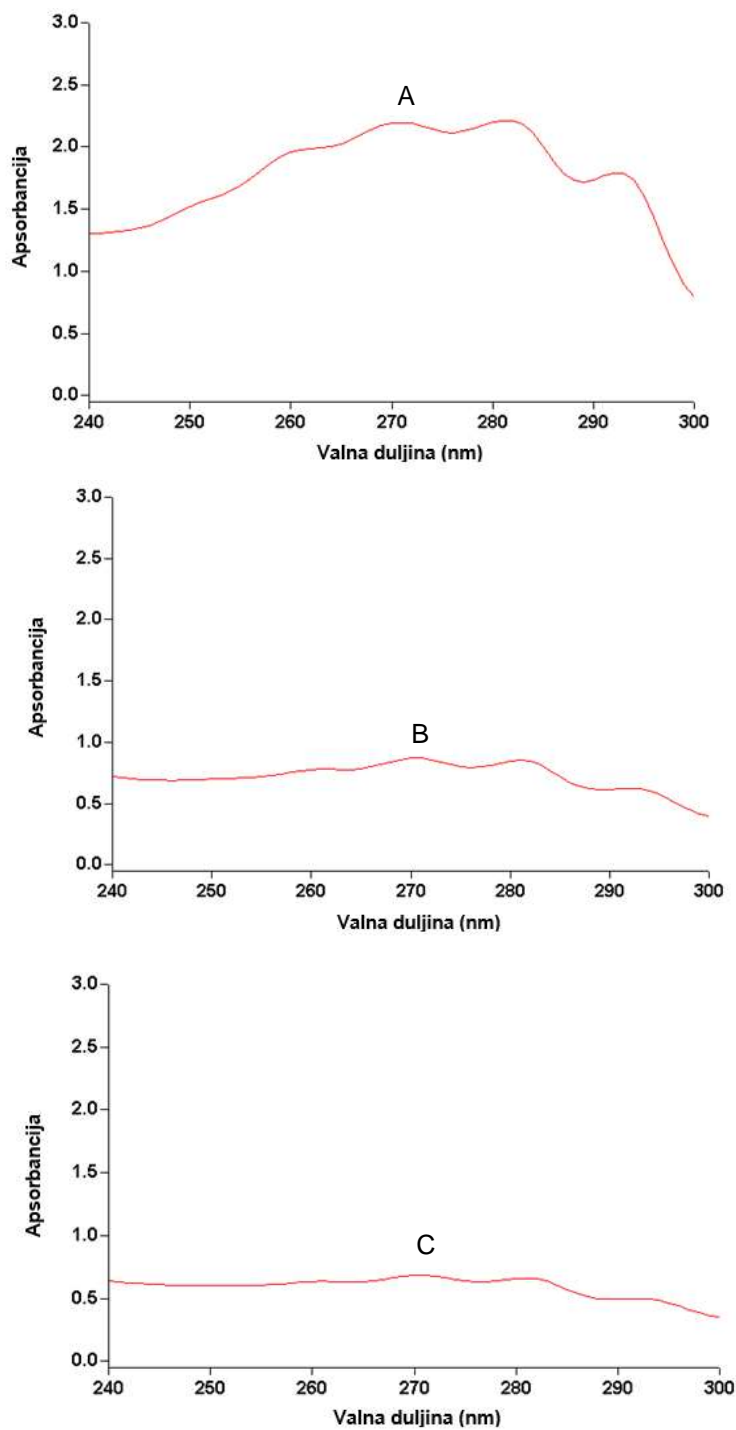
Rezultati ispitivanja djelovanja oleuropeina i hidroksitirosola na membranu vrste *C. albicans* primjenom spektrofotometrijskog testa prikazani su na Slikama 35-38. Navedenom analizom utvrđeno je da pri subinhibitornim koncentracijama ispitivani fenolni spojevi moduliraju sadržaj sterola i posljedično utječu na staničnu membranu. Nadalje, učinak na smanjenje sadržaja ergosterola u ovisnosti je o primijenjenoj koncentraciji. Tukeyev test višestruke usporedbe testiranih skupina pokazao je statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) između ispitivanih koncentracija za obje tvari, osim za najniže koncentracije (24,41  $\mu\text{g/ml}$  za oleuropein i 12,21  $\mu\text{g/ml}$  za hidroksitirosol) koje nisu bile statistički značajne u usporedbi s negativnom kontrolom.



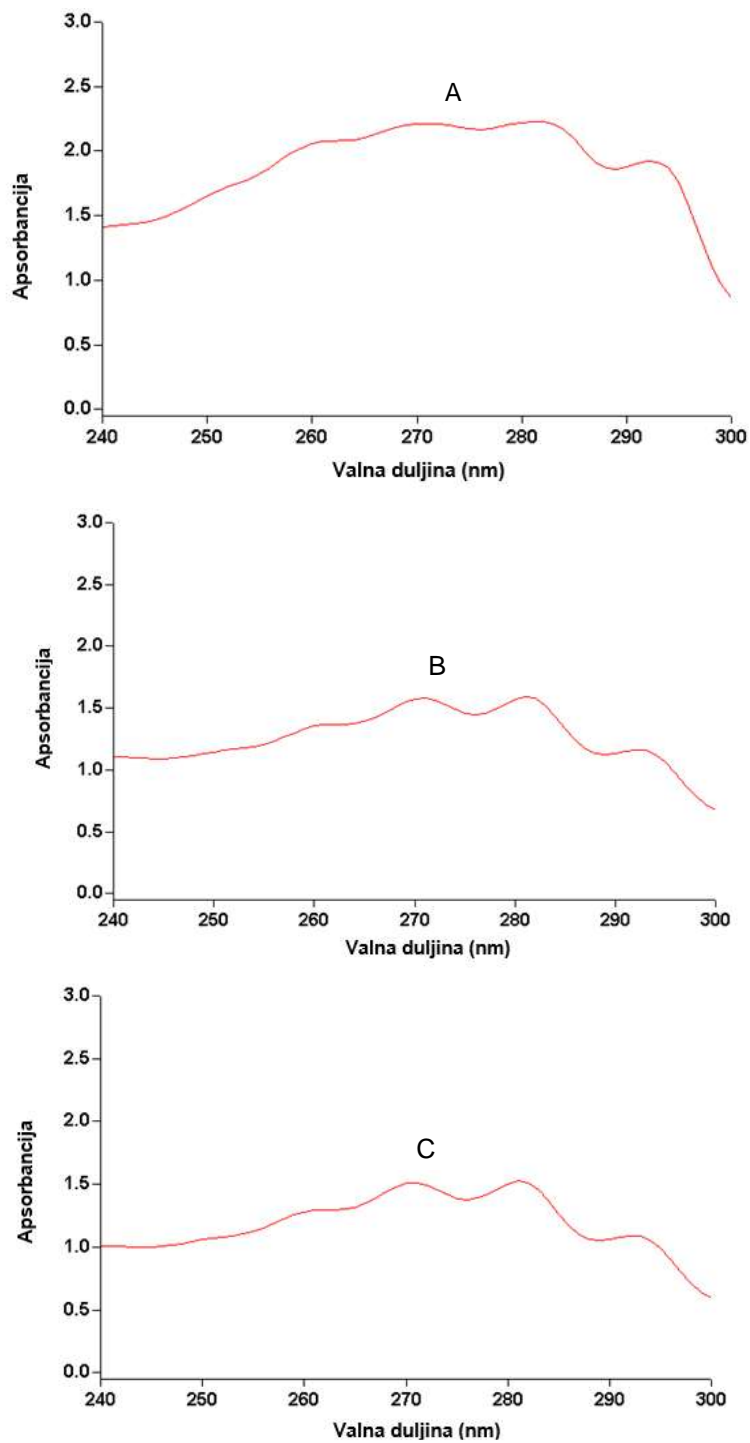
**Slika 35.** Spektrofotometrijsko određivanje modulacije sadržaja ergosterola pod utjecajem različitih koncentracija oleuropeina OLP); OLP1 – 24,41  $\mu\text{g/ml}$ ; OLP2 – 195,31  $\mu\text{g/ml}$ ; OLP3 – 1250  $\mu\text{g/ml}$ ; PK – pozitivna kontrola (amfotericin, 1  $\mu\text{g/ml}$ ); NK – netretirane stanice. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti  $\pm$  SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.



**Slika 36.** Spektrofotometrijsko određivanje modulacije sadržaja ergosterola pod utjecajem različitih koncentracija hidroksitirosola (HT); HT1 – 12,21  $\mu\text{g/ml}$ ; HT2 – 97  $\mu\text{g/ml}$ ; HT3 – 625  $\mu\text{g/ml}$ ; PK – pozitivna kontrola (amfotericin, 1  $\mu\text{g/ml}$ ); NK – netretirane stanice. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti  $\pm$  SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.



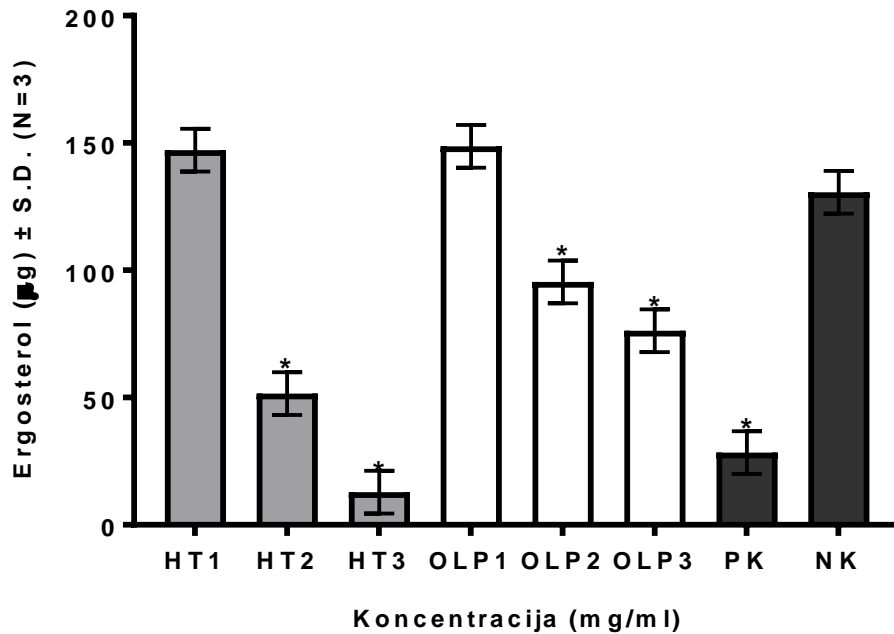
**Slika 37.** UV spektrofotometrijski sterolni profili vrste *C. albicans* pri različitim koncentracijama oleuropeina: A – 1250  $\mu\text{g/ml}$ ; B – 195,31  $\mu\text{g/ml}$ ; C – 24,41  $\mu\text{g/ml}$  snimljeni između 240 i 300 nm.



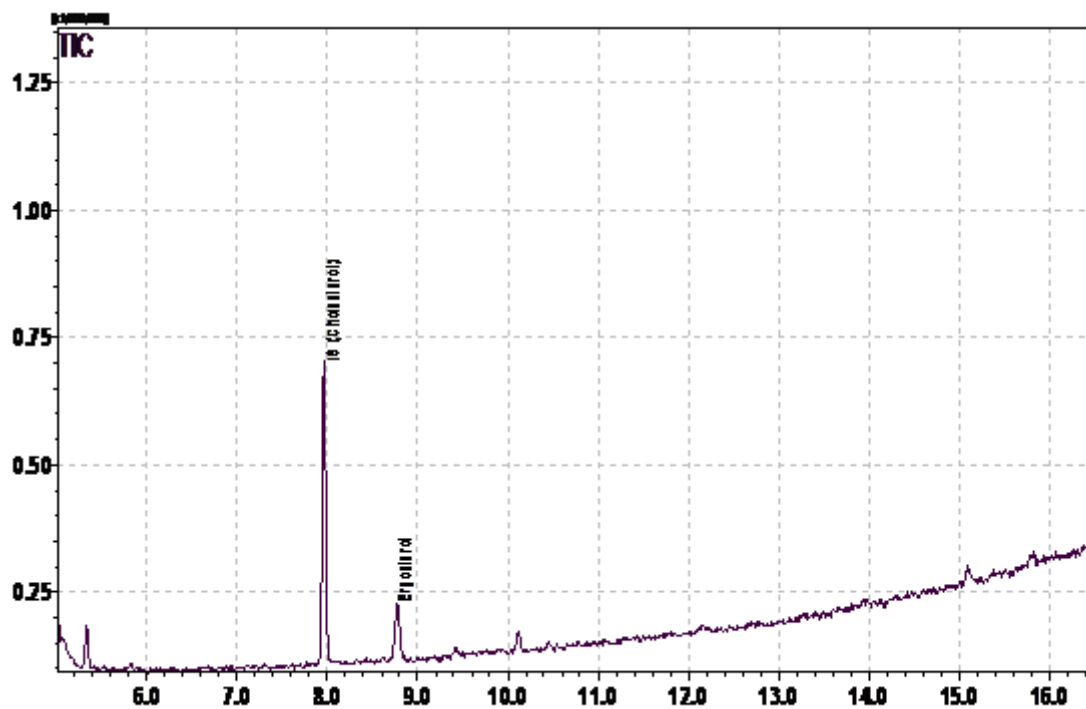
**Slika 38.** UV spektrofotometrijski sterolni profili vrste *C. albicans* pri različitim koncentracijama hidroksitirosola: A – 625 µg/ml; B – 97 µg/ml; C – 12,21 µg/ml snimljeni između 240 i 300 nm.

#### 4.2.3.1.2. Određivanje ergosterola GC/MS metodom

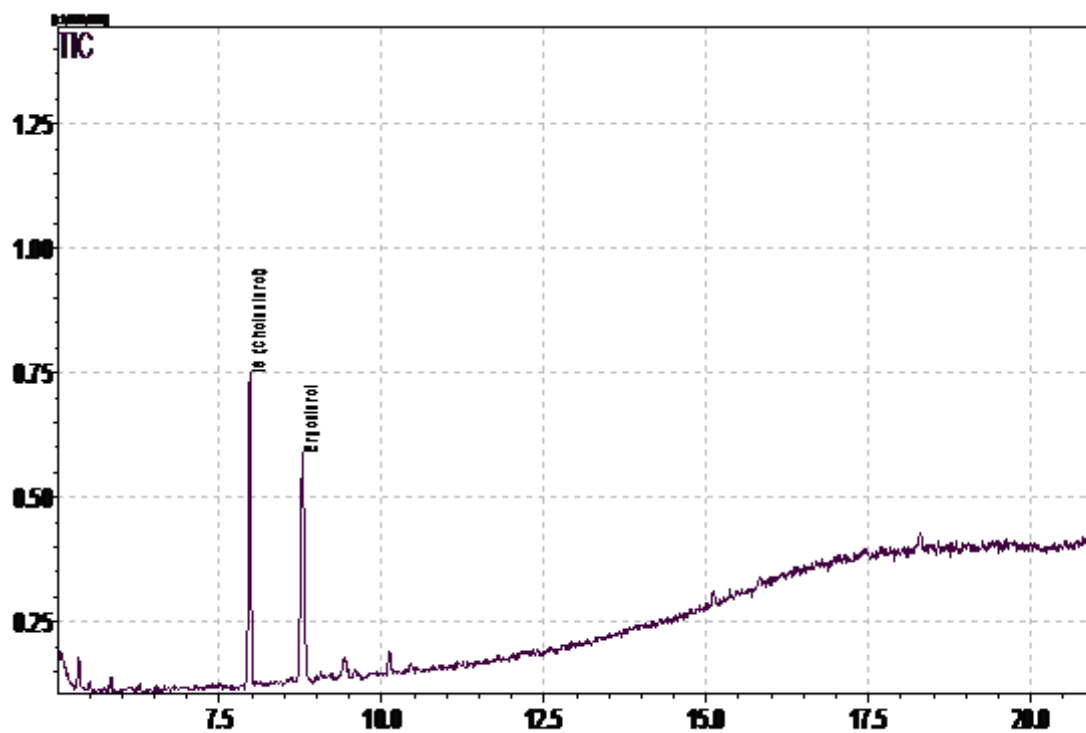
Usporedno je provedena GC-MS analiza čiji rezultati su u skladu s podacima spektrofotometrijskog određivanja učinka oleuropeina i hidroksitirosola na staničnu membranu vrste *C. albicans*. Prikaz učinka ispitivanih fenolnih tvari na smanjenje sadržaja ergosterola dan je na Slici 39.



**Slika 39.** GC-MS analiza modulacije sadržaja ergosterola pod utjecajem različitih koncentracija oleuropeina (OLP1- 24,41 µg/ml; OLP2 – 195,31 µg/ml; OLP3 – 1250 µg/ml) i hidroksitirosola (HT1 – 12,21 µg/ml; HT2 – 97 µg/ml; HT3 – 625 µg/ml); OLP – oleuropein; HT – hidroksitirosol; PK – pozitivna kontrola (amfotericin, 1 µg/ml); NK – netretirane stanice. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

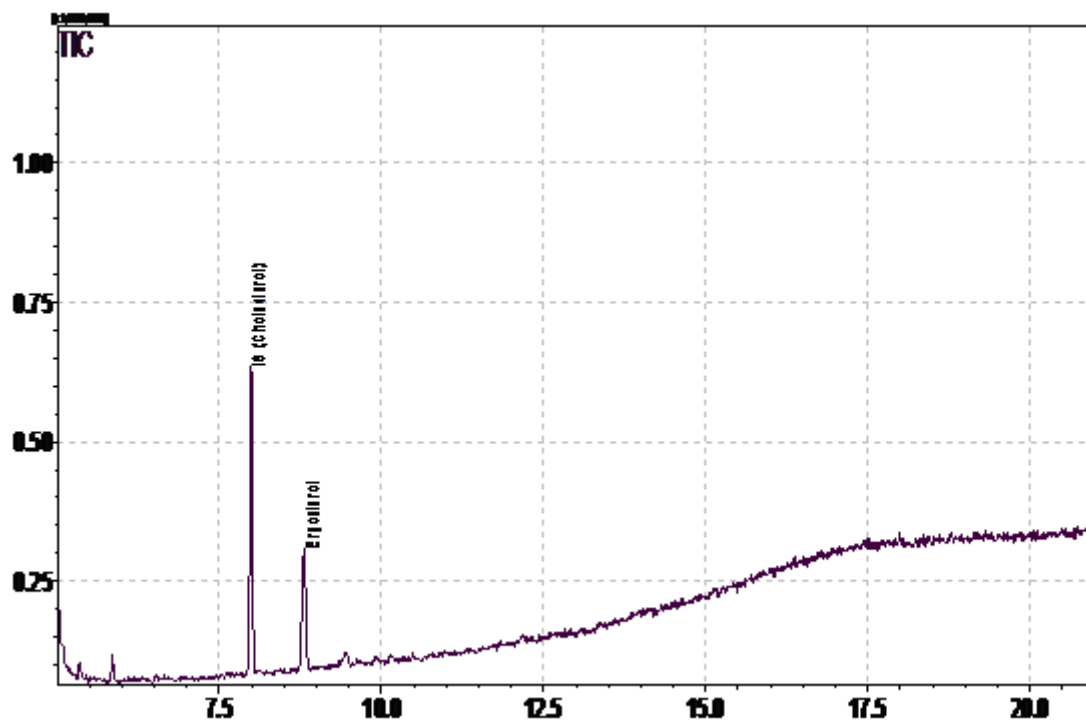


(a)

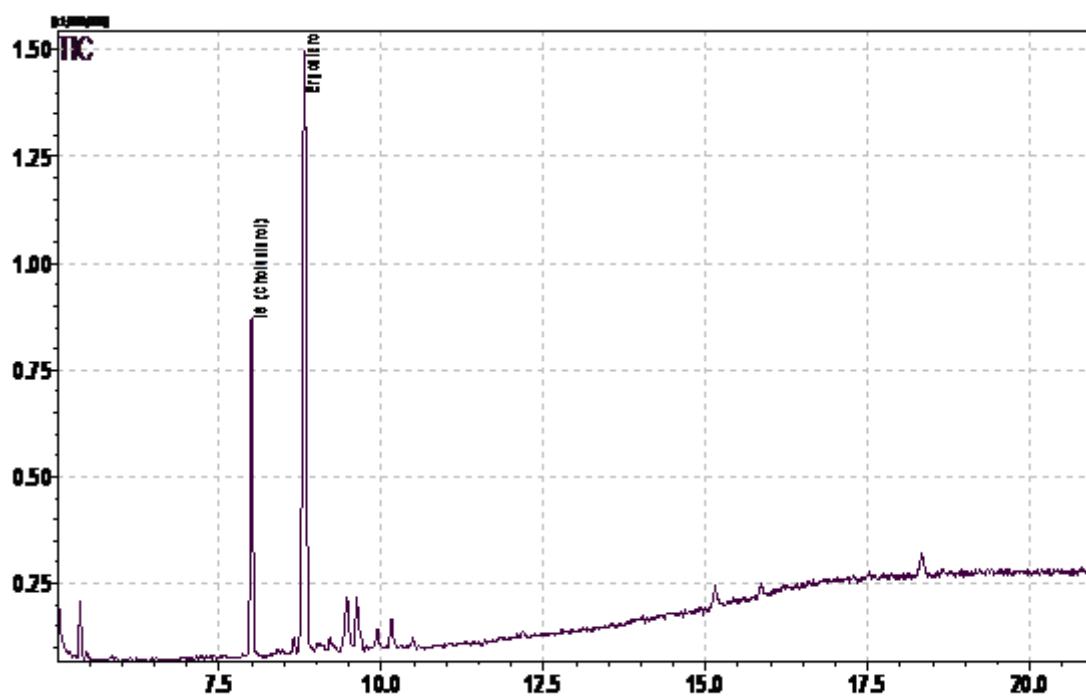


(b)





(c)

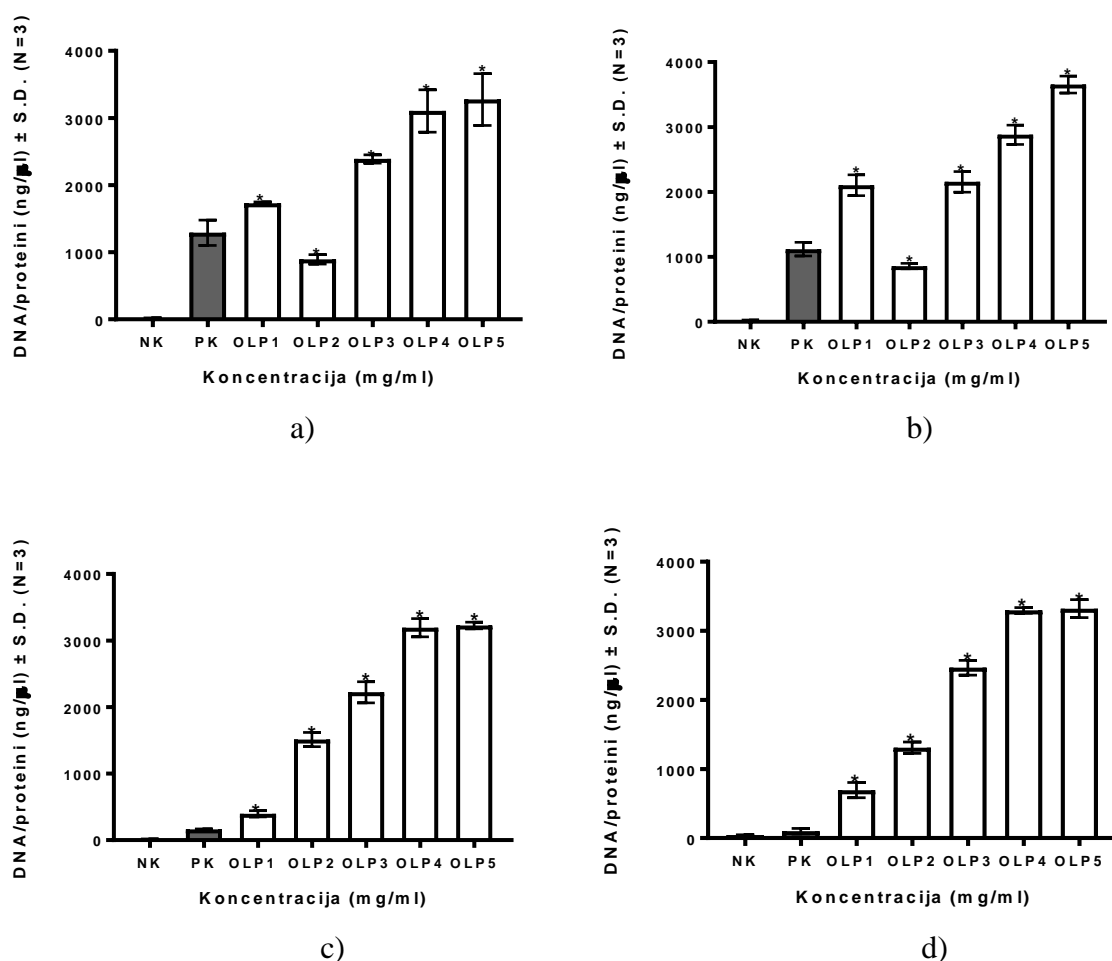


(d)

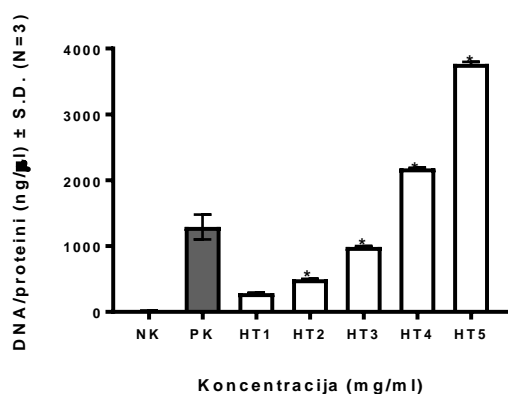
**Slika 40.** Kromatogrami GC-MS analize modulacije sadržaja ergosterola pod utjecajem (a) oleuropeina (1250  $\mu\text{g/ml}$ ) i (b) hidroksitirosola (625  $\mu\text{g/ml}$ ); (c) pozitivna kontrola – amfotericin B (1  $\mu\text{g/ml}$ ); (d) negativna kontrola – netretirane stanice.

#### 4.2.3.2. Modulacija permeabilnosti stanične membrane

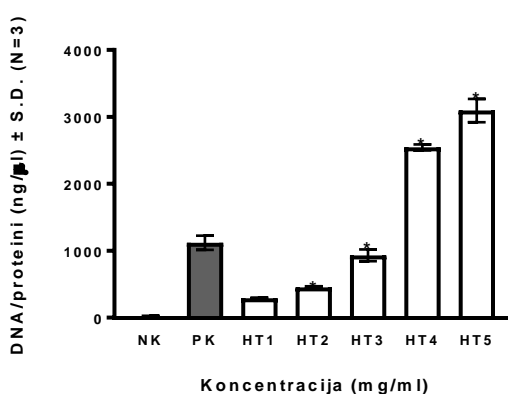
Učinak oleuropeina i hidroksitirosola na permeabilnost i integritet stanične membrane određen je spektrofotometrijskim mjerenjem otpuštanja staničnog sadržaja koji apsorbira svjetlost pri 260/280 nm (DNA, proteini) u vanstanični prostor. Utjecaj različitih koncentracija fenolnih tvari na stanice vrste *C. albicans* ispitan je u ovisnosti o vremenu inkubacije. Slike 41 i 42 prikazuju rezultate ispitivanja nakon 1, 6, 12 i 24 sata inkubacije s oleuropeinom odnosno hidroksitirosolom. Učinak na permeabilnost stanične membrane i posljedično otpuštanje staničnih sastavnica utvrđen je pri svim testiranim koncentracijama već nakon 60 minuta inkubacije tretiranih stanica.



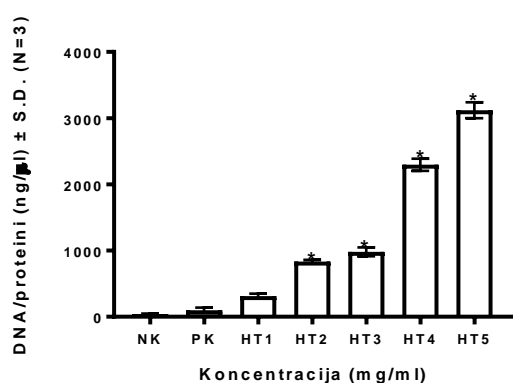
**Slika 41.** Učinak na permeabilnost stanične membrane pri različitim koncentracijama oleuropeina (OLP) izmjeren nakon a) 1 sat, b) 6 sati, c) 12 sati i d) 24 sata inkubacije; OLP1 – 1,25 mg/ml; OLP2 – 3,125 mg/ml; OLP3 – 6,25 mg/ml; OLP4 – 12,5 mg/ml; OLP5 – 50 mg/ml; PK – pozitivna kontrola (vorikonazol, 4 µg/ml); NK – negativna kontrola (netretirane stanice). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.



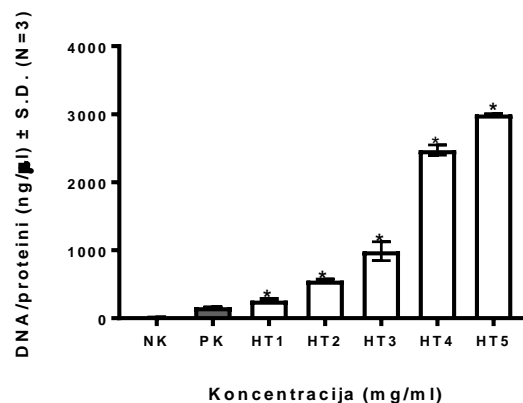
a)



b)



c)

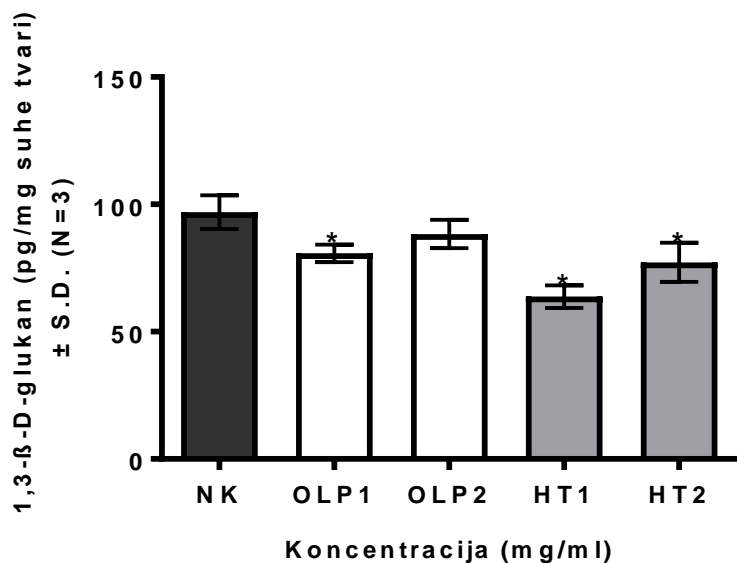


d)

**Slika 42.** Učinak na permeabilnost stanične membrane pri različitim koncentracijama hidroksitirosola (HT) izmjeren nakon a) 1 sat, b) 6 sati, c) 12 sati i d) 24 sata inkubacije; HT1 – 0,625 mg/ml; HT2 – 1,562 mg/ml; HT3 – 3,125 mg/ml; HT4 – 6,125 mg/ml; HT5 – 25 mg/ml; PK – pozitivna kontrola (vorikonazol, 4 µg/ml); NK – negativna kontrola (netretirane stanice). Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

#### 4.2.3.3. Modulacija sadržaja 1,3-β-D-glukana u staničnoj stijenci

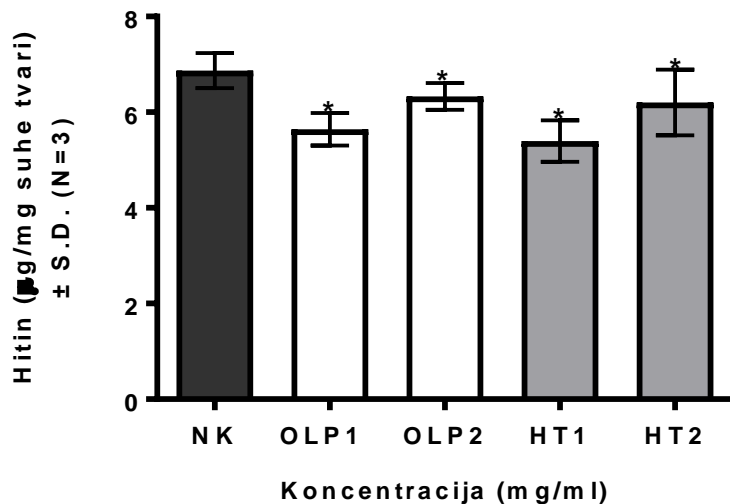
Modulacija sadržaja 1,3-β-D-glukana stanične stijenke gljivične vrste *C. albicans* pod utjecajem oleuropeina i hidroksitirosola ispitana je mjerenjem intenziteta fluorescencije pri ekscitaciji od 485/20 nm i emisiji od 528/20 nm. Dobiveni rezultati izraženi su u pg (kurdlanu)/100 mg suhe tvari prikazani su na Slici 43.



**Slika 43.** Modulacija sadržaja 1,3-β-D-glukana pod utjecajem različitih koncentracija oleuropeina (OLP1– 3,9 mg/ml; OLP2 – 0,39 mg/ml;) i hidroksitirosola (HT1 – 3,9 mg/ml; HT2 – 0,39 mg/ml); OLP – oleuropein; HT – hidroksitirosol; NK – netretirane stanice. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD: Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

#### 4.2.3.4. Modulacija sadržaja hitina u staničnoj stijenci

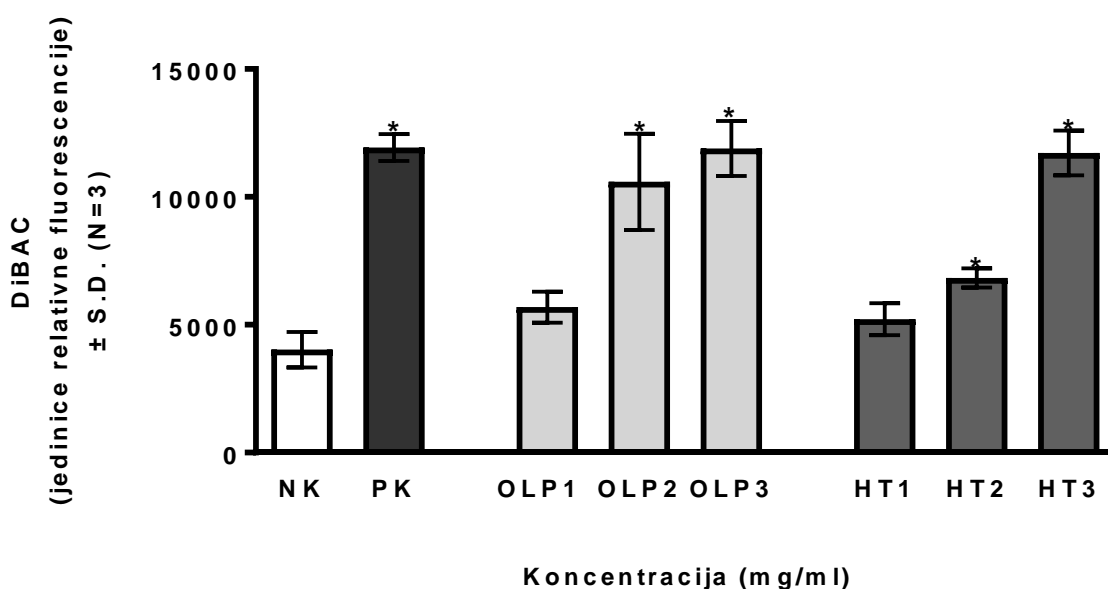
Modulacija sadržaja hitina stanične stijenke gljivične vrste *C. albicans* pod utjecajem oleuropeina i hidroksitirosola ispitana je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri 630 nm. Dobiveni rezultati izraženi su u  $\mu\text{g}$  (kurdlana)/100 mg suhe tvari prikazani su na Slici 44.



**Slika 44.** Modulacija sadržaja hitina pod utjecajem različitih koncentracija oleuropeina (OLP1– 3,9 mg/ml; OLP2 – 0,39 mg/ml;) i hidroksitirosola (HT1 – 3,9 mg/ml; HT2 – 0,39 mg/ml); OLP – oleuropein; HT – hidroksitirosol; NK – netretirane stanice. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti  $\pm$  SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

#### 4.2.3.5. Depolarizacija mitohondrijskog membranskog potencijala

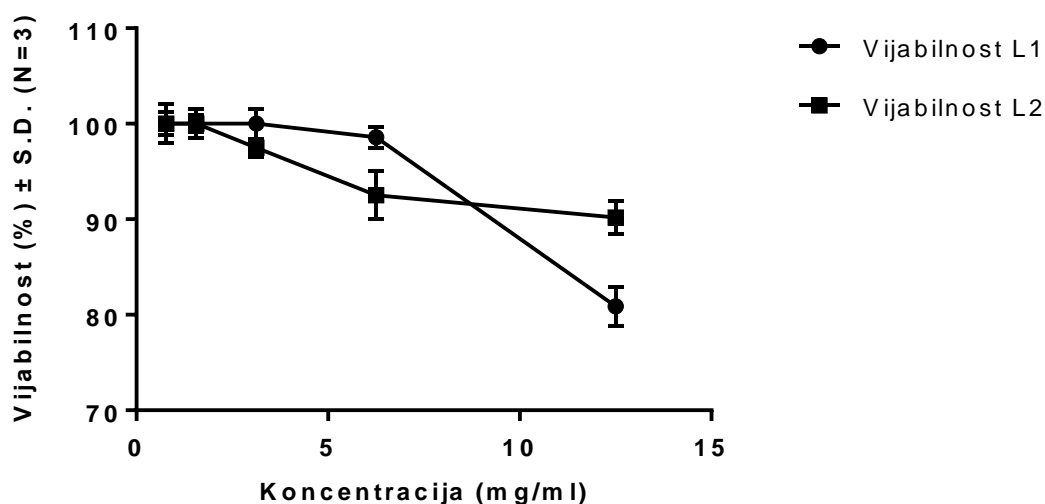
Za daljnju analizu učinka oleuropeina i hidroksitirosola na staničnu membranu vrste *C. albicans* provedeno je bojanje stanica s DiBAC<sub>4</sub> koji prolazi kroz depolarizirane stanične mebrane i veže se za stanične proteine s posljedičnim povećanjem fluorescencije. Tretiranje stanica s bojom DiBAC<sub>4</sub> pokazalo je da u usporedbi s negativnom kontrolom, postoji statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje jedinica fluorescencije u staničnoj suspenziji inkubiranoj 1 sat s oleuropeinom odnosno staničnoj suspenziji inkubiranoj 1 sat s hidroksitirosolom pri ispitivanim koncentracijama. Nadalje, utvrđeno je da je učinak ispitivanih spojeva na depolarizaciju mitohondrijskog membranskog potencijala u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji (Slika 45).



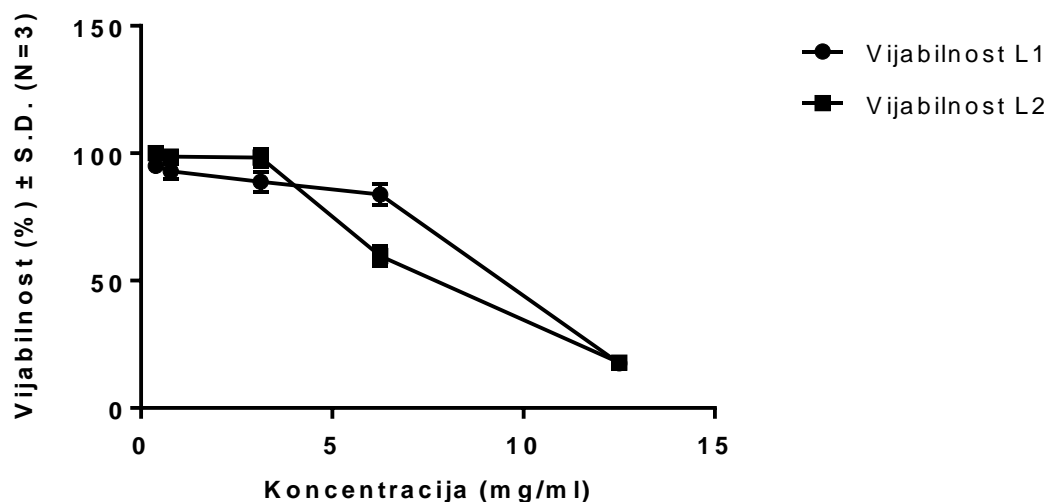
**Slika 45.** Učinak različitih koncentracija oleuropeina i hidroksitirosola na depolarizaciju stanične membrane vrste *C. albicans* ATCC 10231; OLP – oleuropein (OLP1- 6,25 mg/ml; OLP2 – 12,5 mg/ml; OLP3 – 125 mg/ml) i HT – hidroksitirosol (HT1 – 3,125 mg/ml; HT2 – 6,25 mg/ml; HT3 – 62,5 mg/ml); PK – pozitivna kontrola (etanol); NK – netretirane stanice. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

### 4.3. Ispitivanje antimikrobnog učinka na vrste roda *Lactobacillus* u uvjetima *in vitro*

Za ispitivanje učinka oleuropeina i hidroksitirosola na staničnu vijabilnost bakterijskih vrsta roda *Lactobacillus* spp. uzetih iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu korištena je metoda mikrodilucije u skladu sa EUCAST smjericama E.DEF 7.3. Inhibitorne koncentracije koje uzrokuju 50 % (IC<sub>50</sub>) i 80 % (IC<sub>80</sub>) smanjenja staničnog rasta ekstrapolirane su iz ovisnosti dobivenih vrijednosti apsorbancije i koncentracije ispitivanih tvari (Slike 46 i 47; Tablica 8). Za oleuropein utvrđene vrijednosti IC<sub>50</sub> i IC<sub>80</sub> za soj *L. acidophilus* MFBF 12590 iznosile su 14,567 mg/ml i 32,923 mg/ml, a za soj *Lactobacillus* sp. MFBF 11091 iznosile su 22,730 mg/ml i 56,197 mg/ml. Za hidroksitirosol vrijednosti IC<sub>50</sub> i IC<sub>80</sub> za soj *L. acidophilus* MFBF 12590 iznosile su 3,899 mg/ml i 8,775 mg/ml, a za soj *Lactobacillus* sp. MFBF 11091 iznosile su 3,891 mg/ml i 8,114 mg/ml.



**Slika 46.** Vijabilnost vrsta *Lactobacillus* spp. (L1 – *L. acidophilus* MFBF 12590; L2 – *Lactobacillus* sp. MFBF 11091) pod utjecajem oleuropeina u ovisnosti o koncentraciji ispitivane tvari. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD.



**Slika 47.** Vijabilnost vrsta *Lactobacillus* spp. (L1 – *L. acidophilus* MFBF 12590; L2 – *Lactobacillus* Sp. MFBF 11091 pod utjecajem hidroksitirosola u ovisnosti o koncentraciji ispitivane tvari. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti ± SD.

**Tablica 8.** Rezultati ispitivanja učinka oleuropeina i hidroksitirosola na staničnu vijabilnost vrsta roda *Lactobacillus*

Vrsta	Oleuropein		Hidroksitirosol	
	IC50 (mg/ml)	IC80 (mg/ml)	IC50 (mg/ml)	IC80 (mg/ml)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> MFBF 12590	32,923	51, 278	8,775	13,650
<i>Lactobacillus</i> sp. MFBF 11091	57,326	91,381	8,114	12,337

IC<sub>50</sub> – inhibitorna koncentracija koja uzrokuje 50% smanjenja staničnog rasta

IC<sub>80</sub> – inhibitorna koncentracija koja uzrokuje 80% smanjenja staničnog rasta



#### 4.4. Ispitivanje antigenotoksičnog učinka kometnim testom

##### **Primarna oštećenja DNA u limfocitima periferne krvi čovjeka izmjerena primjenom kometnog testa**

Rezultati mjerenja razina primarnih oštećenja DNA u limfocitima periferne krvi čovjeka provedenih primjenom kometnog testa prikazani su u Tablicama 9-12 i na Slikama 48-51, dok su rezultati pripadajuće statističke obrade podataka prikazani u Tablicama ST1-ST5.

##### **Hidroksitirozol**

##### **Tretman u trajanju od 120 minuta – ispitivanje genotoksičnog potencijala spoja**

Iz podataka prikazanih u Tablici 9 vidljivo je da su nakon 120-minutnog tretmana limfocita periferne krvi hidroksitirozolom u uvjetima *in vitro* u odnosu na negativnu kontrolu statistički značajno različite bile vrijednosti dužine repa kometa u uzorcima tretiranim s dvije više koncentracije 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  (2,7  $\mu\text{g/ml}$  i 5,4  $\mu\text{g/ml}$  oleuropeina odnosno 0,75  $\mu\text{g/ml}$  i 1,5  $\mu\text{g/ml}$  hidroksitirozola) ispitivanog spoja. Istovremeno su vrijednosti intenziteta repa i repnog momenta izmjerene u uzorcima tretiranim hidroksitirozolom pri svim koncentracijama bile niže od onih u negativnoj kontroli, ali bez statističke značajnosti (Tablica ST1).

Nepostojanje statističke značajnosti za navedene parametre te činjenica da je pozitivan rezultat dobiven samo u uzorku tretiranom s dvije više koncentracije hidroksitirozola upućuje na zaključak da pri tim koncentracijama ispitivani spoj posjeduje vrlo niski potencijal za stvaranje lomova u DNA i to vjerojatno putem nastajanja kratkih fragmenata koji tijekom elektroforeze putuju na veće udaljenosti od glavnine DNA smještene u nukleoidu.

Primjenom testa analize varijance uz *post-hoc* Scheffe-ov test ispitane su i statističke značajnosti između uzoraka tretiranih s različitim koncentracijama hidroksitirozola te je utvrđeno da obje više koncentracije (5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ ) imaju statistički značajno više vrijednosti za dužinu repa kometa od 1  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$  oleuropeina odnosno 0,15  $\mu\text{g/ml}$  hidroksitirozola), ali nijedna od razlika za parametre, intenzitet repa i repni moment, između promatranih uzoraka nije bila statistički značajna (Tablica ST1).

Očekivano, u oba uzorka pozitivne kontrole izmjerene su visoke vrijednosti svih parametara kometnog testa, statistički značajno više i od negativne kontrole i od svih uzoraka tretiranih hidroksitirozolom, što je u skladu s mehanizmom djelovanja vodik peroksida i bleomicina na DNA (Tablica 9, Tablica ST1).

**Tablica 9.** Rezultati kometnog testa na limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s hidroksitirosolom koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,15  $\mu\text{g/ml}$ ), 5  $\mu\text{M}$  (0,75  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od 120 minuta. Usporedno su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

Uzorak	Hidroksitirosol – tretman 120'		
	Dužina repa ( $\mu\text{m}$ )	Intenzitet repa (% DNA)	Repni moment
Negativna kontrola	23,15 $\pm$ 0,36 (4,47)	2,08 $\pm$ 0,20 (2,46)	0,22 $\pm$ 0,02 (0,25)
	23,33	0,98	0,12
	14,17-35,00	0,00-10,05	0,00-0,97
1 $\mu\text{M}$	20,38 $\pm$ 0,34 (4,11)	1,41 $\pm$ 0,19 (2,30)	0,12 $\pm$ 0,02 (0,20)
	19,58	0,16	0,01
	12,08-42,50	0,00-9,92	0,00-0,94
5 $\mu\text{M}$	18,43 $\pm$ 0,30 (3,71)	2,04 $\pm$ 0,23 (2,76)	0,17 $\pm$ 0,02 (0,24)
	17,71	0,40	0,04
	12,08-39,58	0,00-10,44	0,00-1,04
10 $\mu\text{M}$	18,36 $\pm$ 0,33 (4,09)	1,28 $\pm$ 0,19 (2,27)	0,10 $\pm$ 0,01 (0,18)
	17,08	0,13	0,01
	12,92-41,67	0,00-15,62	0,00-0,98
Pozitivna kontrola $\text{H}_2\text{O}_2$	33,81 $\pm$ 1,02 (12,44)	14,77 $\pm$ 1,16 (14,27)	2,14 $\pm$ 0,20 (2,47)
	30,00	12,34	1,18
	12,08-71,25	0,00-48,84	0,00-11,20
Pozitivna kontrola Bleomicin	31,19 $\pm$ 0,85(10,44)	27,91 $\pm$ 0,90 (11,08)	4,25 $\pm$ 0,19 (2,38)
	29,58	29,42	3,68
	11,67-68,75	2,66-47,09	0,27-12,85

Mjerenje je provedeno na ukupno 150 kometa u triplikatu (3x150) po svakom uzorku.

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SE (SD) u prvom retku; medijan u drugom retku i raspon izmjerenih vrijednosti (min.-maks.) u trećem retku.

Kao pozitivne kontrole korišteni su bleomicin u koncentraciji 10  $\mu\text{g/ml}$  (inkubacija 120 min) te 100  $\mu\text{M}$  vodik peroksid (inkubacija 10 minuta na ledu).

**Tablica ST1.** Rezultati statističke obrade podataka kometnog testa na limfocitima periferne krvi koji su u uvjetima *in vitro* tretirani s hidroksitirozolom koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,15  $\mu\text{g/ml}$ ), 5  $\mu\text{M}$  (0,75  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od 120 minuta. Usporedno su analizirani i podaci za razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

<b>HIDROKSITIROZOL</b>		<b>Dužina repa</b>				
<b>Uzorak</b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Bleomicin</b>	
Negativna kontrola	n.z.	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	
1 $\mu\text{M}$		P=0,0322	P=0,0195	P<0,0001	P<0,0001	
5 $\mu\text{M}$			n.z.	P<0,0001	P<0,0001	
10 $\mu\text{M}$				P<0,0001	P<0,0001	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					n.z.	
		<b>Intenzitet repa</b>				
<b>Uzorak</b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Bleomicin</b>	
Negativna kontrola	n.z.	n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001	
1 $\mu\text{M}$		n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001	
5 $\mu\text{M}$			n.z.	P<0,0001	P<0,0001	
10 $\mu\text{M}$				P<0,0001	P<0,0001	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					P<0,0001	
		<b>Repni moment</b>				
<b>Uzorak</b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Bleomicin</b>	
Negativna kontrola	n.z.	n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001	
1 $\mu\text{M}$		n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001	
5 $\mu\text{M}$			n.z.	P<0,0001	P<0,0001	
10 $\mu\text{M}$				P<0,0001	P<0,0001	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					P<0,0001	

Analiza podataka provedena je pomoću testa analize varijance uz *post-hoc* Scheffe test.

Statistička značajnost procjenjivana je na razini  $p<0,05$ .

n.z. – nije statistički značajno.

### **Tretman u trajanju od 150 minuta – ispitivanje protektivnog potencijala spoja**

Tablica 10 prikazuje rezultate kometnog testa na limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s hidroksitirozolom u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su bili izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li predtretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedno su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

Iz podataka prikazanih u Tablici 9 vidljivo je da su nakon 150-minutnog tretmana limfocita periferne krvi hidroksitirozolom u uvjetima *in vitro* u odnosu na negativnu kontrolu statistički značajno različite bile vrijednosti dužine repa kometa u uzorcima tretiranim sa sve tri koncentracije ispitivanog spoja. Premda povišene, vrijednosti intenziteta repa i repnog momenta izmjerene u uzorcima tretiranim hidroksitirozolom pri svim koncentracijama nisu odstupale sa statističkom značajnosti u odnosu na negativnu kontrolu (Tablica ST2).

Nepostojanje statističke značajnosti za navedene parametre te činjenica da je pozitivan rezultat dobiven samo za dužinu repa kometa upućuje na zaključak da pri tim koncentracijama i nakon 150 minutnog tretmana ispitivani spoj posjeduje vrlo niski potencijal za stvaranje lomova u DNA.

Očekivano, u uzorku pozitivne kontrole izmjerene su visoke vrijednosti svih parametara kometnog testa, statistički značajno više i od negativne kontrole i od svih uzoraka tretiranih hidroksitirozolom (Tablica 10, Tablica ST2).

Sve tri ispitivane koncentracije u kombinaciji s vodik peroksidom pokazale su niže vrijednosti promatranih parametara kometnog testa od uzorka koji je izlagan samo vodikovom peroksidu, što upućuje na protektivni učinak hidroksitirozola (Tablica 10). Statističke značajnosti utvrđenih razlika ispitane su primjenom testa analize varijance uz *post-hoc* Scheffe-ov test i prikazane u Tablici ST2.

**Tablica 10.** Rezultati kometnog testa na limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s hidroksitirosolom koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,15  $\mu\text{g/ml}$ ), 5  $\mu\text{M}$  (0,75  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li pred-tretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedo su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

Uzorak	Hidroksitirosol – protektivni učinci		
	Dužina repa ( $\mu\text{m}$ )	Intenzitet repa (% DNA)	Repni moment
Negativna kontrola	16,35±0,22 (2,70)	1,35±0,20 (2,50)	0,11±0,02 (0,20)
	15,83	0,22	0,01
	11,25-25,38	0,00-18,10	0,00-1,47
1 $\mu\text{M}$	21,46±0,33 (4,00)	1,80±0,24 (2,92)	0,15±0,02 (0,24)
	20,83	0,19	0,02
	13,75-33,33	0,00-12,75	0,00-0,92
1 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$	27,99±0,64 (7,79)	14,11±0,86 (10,55)	1,81±0,13 (1,53)
	27,50	12,39	1,38
	12,92-52,08	0,00-39,35	0,00-8,27
5 $\mu\text{M}$	19,96±0,36 (4,39)	1,85±0,22 (2,64)	0,17±0,02 (0,24)
	19,17	0,34	0,03
	13,75-33,75	0,00-10,92	0,00-0,90
5 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$	27,38±0,65 (7,96)	12,19±0,82 (10,07)	1,47±0,12 (1,47)
	25,83	9,93	1,03
	14,17-46,25	0,01-42,76	0,00-6,71
10 $\mu\text{M}$	20,92±0,31 (3,76)	1,87±0,19(2,32)	0,19±0,02 (0,21)
	20,00	0,83	0,10
	12,92-33,33	0,00-10,85	0,00-0,96
10 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$	19,24±0,45 (5,45)	3,43±0,40 (4,94)	0,35±0,04 (0,53)
	17,29	0,71	0,08
	10,42-35,00	0,00-21,53	0,00-2,62
Pozitivna kontrola	37,93±0,67 (8,19)	28,71±1,06 (12,93)	4,57±0,20 (2,50)
	38,13	28,92	4,27
	20,00-57,92	1,56-48,62	0,21-9,53

Mjerenje je provedeno na ukupno 150 kometa u triplikatu (3x150) po svakom uzorku.

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SE (SD) u prvom retku; medijan u drugom retku i raspon izmjerenih vrijednosti (min.-maks.) u trećem retku.

Kao pozitivna kontrola korišten je 5  $\mu\text{M}$  vodik peroksid (inkubacija 30 minuta na 37 °C).

Tablica ST2. Rezultati statističke obrade podataka kometnog testa na limfocitima periferne krvi koji su u uvjetima *in vitro* tretirani s hidroksitirozolom koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,15  $\mu\text{g/ml}$ ), 5  $\mu\text{M}$  (0,75  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li predtretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedno su analizirani i podaci za razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

ANOVA Scheffe Test		Hidroksitirozol				
		Dužina repa				
Uzorak		Negativna kontrola	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}_2$
Hidroksitirozol + $\text{H}_2\text{O}_2$	Negativna kontrola		P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
	1 $\mu\text{M}$	P<0,0001		P=0,0062	n.z.	P<0,0001
	5 $\mu\text{M}$	P<0,0001	n.z.		n.z.	P<0,0001
	10 $\mu\text{M}$	P=0,0002	P<0,0001	P<0,0001		P<0,0001
	$\text{H}_2\text{O}_2$	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	
		Intenzitet repa				
Uzorak		Negativna kontrola	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}_2$
Hidroksitirozol + $\text{H}_2\text{O}_2$	Negativna kontrola		n.z.	n.z.	n.z.	P<0,0001
	1 $\mu\text{M}$	P<0,0001		n.z.	n.z.	P<0,0001
	5 $\mu\text{M}$	P<0,0001	n.z.		n.z.	P<0,0001
	10 $\mu\text{M}$	P=0,0059	P<0,0001	P<0,0001		P<0,0001
	$\text{H}_2\text{O}_2$	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	
		Repni moment				
Uzorak		Negativna kontrola	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}_2$
Hidroksitirozol + $\text{H}_2\text{O}_2$	Negativna kontrola		n.z.	n.z.	n.z.	P<0,0001
	1 $\mu\text{M}$	P<0,0001		n.z.	n.z.	P<0,0001
	5 $\mu\text{M}$	P<0,0001	n.z.		n.z.	P<0,0001
	10 $\mu\text{M}$	n.z.	P<0,0001	P<0,0001		P<0,0001
	$\text{H}_2\text{O}_2$	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	

Analiza podataka provedena je pomoću testa analize varijance uz *post-hoc* Scheffe test. Statistička značajnost procjenjivana je na razini  $p<0,05$ .  
n.z. – nije statistički značajno.

## **Oleuropein**

### **Tretman u trajanju od 120 minuta – ispitivanje genotoksičnog potencijala spoja**

Iz podataka prikazanih u Tablici 11 vidljivo je da su nakon 120-minutnog tretmana limfocita periferne krvi oleuropeinom u uvjetima *in vitro* vrijednosti dužine repa kometa u svim uzorcima bile niže nego u odnosu na negativnu kontrolu, što je bilo i statistički značajno za uzorke tretirane s 1  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$ ) i 5  $\mu\text{M}$  (2,7  $\mu\text{g/ml}$ ) ispitivanog spoja (Tablica ST3). Vrijednosti intenziteta repa i repnog momenta izmjerene u uzorcima tretiranim oleuropeinom pri svim koncentracijama bile su također niže od onih u negativnoj kontroli, ali bez statističke značajnosti (Tablica 11, Tablica ST3).

Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da ispitivani spoj pri testiranim koncentracijama nema potencijal za stvaranje lomova u DNA.

Primjenom testa analize varijance uz *post-hoc* Scheffe-ov test ispitane su i statističke značajnosti između uzoraka tretiranih s različitim koncentracijama oleuropeina. Između dvije više koncentracije, 5  $\mu\text{M}$  (2,7  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (5,4  $\mu\text{g/ml}$ ), utvrđena je statistički značajna razlika za dužinu repa kometa. Međutim, nijedna od razlika za parametre intenzitet repa i repni moment između promatranih uzoraka kod svih koncentracija nije bila statistički značajna (Tablica ST3).

Očekivano, u oba uzorka pozitivne kontrole izmjerene su visoke vrijednosti svih parametara kometnog testa, statistički značajno više i od negativne kontrole i od svih uzoraka tretiranih hidroksitirozolom, što je u skladu s mehanizmom djelovanja vodik peroksida i bleomicina na DNA (Tablica 11, Tablica ST3).

**Tablica 11.** Rezultati kometnog testa na limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s oleuropeinom koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$ ), 5  $\mu\text{M}$  (2,7  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (5,4  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od 120 minuta. Usporedno su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

Uzorak	Oleuropein – tretman 120'		
	Dužina repa ( $\mu\text{m}$ )	Intenzitet repa (% DNA)	Repni moment
Negativna kontrola	23,15 $\pm$ 0,36 (4,47)	2,08 $\pm$ 0,20 (2,46)	0,22 $\pm$ 0,02 (0,25)
	23,33	0,98	0,12
	14,17-35,00	0,00-10,05	0,00-0,97
1 $\mu\text{M}$	19,82 $\pm$ 0,32 (3,88)	1,48 $\pm$ 0,20 (2,44)	0,13 $\pm$ 0,02 (0,21)
	18,75	0,22	0,02
	13,33-34,58	0,00-11,10	0,00-0,96
5 $\mu\text{M}$	17,99 $\pm$ 0,24 (2,90)	1,22 $\pm$ 0,18(2,18)	0,10 $\pm$ 0,01 (0,18)
	16,88	0,07	0,01
	13,33-26,25	0,00-11,31	0,00-0,93
10 $\mu\text{M}$	21,22 $\pm$ 0,49 (5,95)	1,67 $\pm$ 0,22 (2,68)	0,14 $\pm$ 0,02 (0,25)
	19,58	0,23	0,02
	15,00-57,08	0,00-12,09	0,00-1,45
Pozitivna kontrola $\text{H}_2\text{O}_2$	33,81 $\pm$ 1,02 (12,44)	14,77 $\pm$ 1,16 (14,27)	2,14 $\pm$ 0,20 (2,47)
	30,00	12,34	1,18
	12,08-71,25	0,00-48,84	0,00-11,20
Pozitivna kontrola Bleomicin	31,19 $\pm$ 0,85(10,44)	27,91 $\pm$ 0,90 (11,08)	4,25 $\pm$ 0,19 (2,38)
	29,58	29,42	3,68
	11,67-68,75	2,66-47,09	0,27-12,85

Mjerenje je provedeno na ukupno 150 kometa u triplikatu (3x150) po svakom uzorku.

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SE (SD) u prvom retku; medijan u drugom retku i raspon izmjerenih vrijednosti (min.-maks.) u trećem retku.

Kao pozitivne kontrole korišteni su bleomicin u koncentraciji 10  $\mu\text{g/ml}$  (inkubacija 120 min) te 100  $\mu\text{M}$  vodik peroksid (inkubacija 10 minuta na ledu).



**Tablica ST3.** Rezultati statističke obrade podataka kometnog testa na limfocitima periferne krvi koji su u uvjetima *in vitro* tretirani s oleuropeinom koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$ ), 5  $\mu\text{M}$  (2,7  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (5,4  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od 120 minuta. Usporedo su analizirani i podaci za razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

<b>OLEUROPEIN</b>					
<b>Dužina repa</b>					
<b>Uzorak</b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Bleomicin</b>
Negativna kontrola	P=0,0148	P<0,0001	n.z.	P<0,0001	P<0,0001
1 $\mu\text{M}$		n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001
5 $\mu\text{M}$			P=0,0004	P<0,0001	P<0,0001
10 $\mu\text{M}$				P<0,0001	P<0,0001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					n.z.
<b>Intenzitet repa</b>					
<b>Uzorak</b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Bleomicin</b>
Negativna kontrola	n.z.	n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001
1 $\mu\text{M}$		n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001
5 $\mu\text{M}$			n.z.	P<0,0001	P<0,0001
10 $\mu\text{M}$				P<0,0001	P<0,0001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					P<0,0001
<b>Rejni moment</b>					
<b>Uzorak</b>	<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Bleomicin</b>
Negativna kontrola	n.z.	n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001
1 $\mu\text{M}$		n.z.	n.z.	P<0,0001	P<0,0001
5 $\mu\text{M}$			n.z.	P<0,0001	P<0,0001
10 $\mu\text{M}$				P<0,0001	P<0,0001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					P<0,0001

Analiza podataka provedena je pomoću testa analize varijance uz *post-hoc* Scheffe test.

Statistička značajnost procjenjivana je na razini  $p<0,05$ .

n.z. – nije statistički značajno.

### **Tretman u trajanju od 150 minuta – ispitivanje protektivnog potencijala spoja**

Tablica 12 prikazuje rezultate kometnog testa na limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s oleuropeinom u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su bili izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li predtretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedno su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

Iz podataka prikazanih u Tablici 12 vidljivo je da su nakon 150-minutnog tretmana limfocita periferne krvi oleuropeinom u uvjetima *in vitro* u odnosu na negativnu kontrolu statistički značajno različite bile vrijednosti dužine repa kometa u uzorcima tretiranim sa sve tri koncentracije ispitivanog spoja. Premda povišene, vrijednosti intenziteta repa i repnog momenta izmjerene u uzorcima tretiranim oleuropeinom pri svim koncentracijama nisu odstupale sa statističkom značajnosti u odnosu na negativnu kontrolu (Tablica ST4).

Nepostojanje statističke značajnosti za navedene parametre te činjenica da je pozitivan rezultat dobiven samo za dužinu repa kometa upućuje na zaključak da pri tim koncentracijama i nakon 150 minutnog tretmana ispitivani spoj posjeduje vrlo niski potencijal za stvaranje lomova u DNA.

Očekivano, u uzorku pozitivne kontrole izmjerene su visoke vrijednosti svih parametara kometnog testa, statistički značajno više i od negativne kontrole i od svih uzoraka tretiranih oleuropeinom (Tablica 12, Tablica ST4).

Sve tri ispitivane koncentracije u kombinaciji s vodik peroksidom pokazale su niže vrijednosti promatranih parametara kometnog testa od uzorka koji je izlagan samo vodikovom peroksidu (Tablica 12), što upućuje na protektivni učinak oleuropeina. Statističke značajnosti utvrđenih razlika ispitane su primjenom testa analize varijance uz *post-hoc* Scheffe-ov test i prikazane u Tablici ST4.

**Tablica 12.** Rezultati kometnog testa na limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s oleuropeinom koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$ ), 5  $\mu\text{M}$  (2,7  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (5,4  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li predtretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedno su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

Uzorak	Oleuropein – protektivni učinci		
	Dužina repa ( $\mu\text{m}$ )	Intenzitet repa (% DNA)	Repni moment
Negativna kontrola	16,35±0,22 (2,70)	1,35±0,20 (2,50)	0,11±0,02 (0,20)
	15,83	0,22	0,01
	11,25-25,38	0,00-18,10	0,00-1,47
1 $\mu\text{M}$	17,91±0,33 (4,02)	1,52±0,20 (2,50)	0,12±0,02 (0,20)
	16,67	0,23	0,01
	11,25-34,58	0,00-10,93	0,00-0,88
1 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$	40,19±0,52 (6,40)	27,54±0,82 (10,08)	4,46±0,17 (2,02)
	40,83	27,71	4,30
	24,17-54,58	2,44-48,15	0,29-9,30
5 $\mu\text{M}$	19,43±0,35 (4,28)	1,51±0,21 (2,53)	0,13±0,02 (0,23)
	17,92	0,22	0,02
	13,75-39,58	0,00-11,02	0,00-1,25
5 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$	32,54±0,86 (10,49)	24,35±1,15 (14,09)	3,58±0,21 (2,52)
	32,08	23,57	3,34
	11,67-62,08	0,21-49,31	0,02-10,52
10 $\mu\text{M}$	23,22±0,37 (4,51)	1,72±0,20 (2,45)	0,16±0,02 (0,23)
	22,92	0,36	0,04
	14,58-38,33	0,00-10,34	0,00-1,04
10 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$	35,61±0,86 (10,49)	21,24±1,07 (13,06)	3,32±0,19 (2,37)
	37,50	20,86	3,05
	12,08-57,08	0,00-46,84	0,00-8,72
Pozitivna kontrola $\text{H}_2\text{O}_2$	37,93±0,67 (8,19)	28,71±1,06 (12,93)	4,57±0,20 (2,50)
	38,13	28,92	4,27
	20,00-57,92	1,56-48,62	0,21-9,53

Mjerenje je provedeno na ukupno 150 kometa u triplikatu (3x150) po svakom uzorku.

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  SE (SD) u prvom retku; medijan u drugom retku i raspon izmjerenih vrijednosti (min.-maks.) u trećem retku.

Kao pozitivna kontrola korišten je 5  $\mu\text{M}$  vodik peroksid (inkubacija 30 minuta na 37 °C).

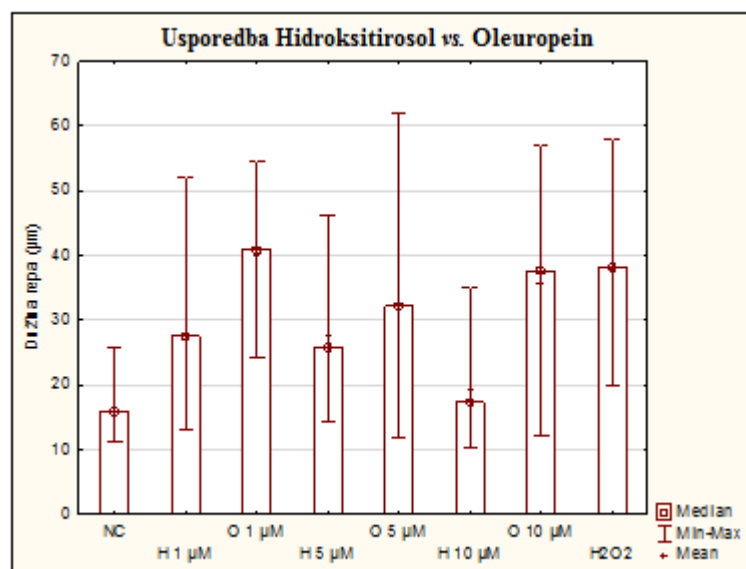
**Tablica ST4.** Rezultati statističke obrade podataka kometnog testa na limfocitima periferne krvi koji su u uvjetima *in vitro* tretirani s oleuropeinom koncentracije 1  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$ ), 5  $\mu\text{M}$  (2,7  $\mu\text{g/ml}$ ) i 10  $\mu\text{M}$  (5,4  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li predtretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedno su analizirani i podaci za razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

ANOVA Scheffe Test		Oleuropein				
		Dužina repa				
Uzorak		Negativna kontrola	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}_2$
Oleuropein + $\text{H}_2\text{O}_2$	Negativna kontrola		P=0,0181	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
	1 $\mu\text{M}$	P<0,0001		P=0,0142	P<0,0001	P<0,0001
	5 $\mu\text{M}$	P<0,0001	P<0,0001		P<0,0001	P<0,0001
	10 $\mu\text{M}$	P<0,0001	P<0,0001	P=0,0459		P<0,0001
	$\text{H}_2\text{O}_2$	P<0,0001	n.z.	P<0,0001	n.z.	
<b>Intenzitet repa</b>						
Uzorak		Negativna kontrola	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}_2$
Oleuropein + $\text{H}_2\text{O}_2$	Negativna kontrola		n.z.	n.z.	n.z.	P<0,0001
	1 $\mu\text{M}$	P<0,0001		n.z.	n.z.	P<0,0001
	5 $\mu\text{M}$	P<0,0001	P=0,0141		n.z.	P<0,0001
	10 $\mu\text{M}$	P<0,0001	P<0,0001	n.z.		P<0,0001
	$\text{H}_2\text{O}_2$	P<0,0001	n.z.	P=0,0267	P<0,0001	
<b>Repni moment</b>						
Uzorak		Negativna kontrola	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}_2$
Oleuropein + $\text{H}_2\text{O}_2$	Negativna kontrola		n.z.	n.z.	n.z.	P<0,0001
	1 $\mu\text{M}$	P<0,0001		n.z.	n.z.	P<0,0001
	5 $\mu\text{M}$	P<0,0001	P=0,0005		n.z.	P<0,0001
	10 $\mu\text{M}$	P<0,0001	P<0,0001	n.z.		P<0,0001
	$\text{H}_2\text{O}_2$	P<0,0001	n.z.	P=0,0013	P<0,0001	

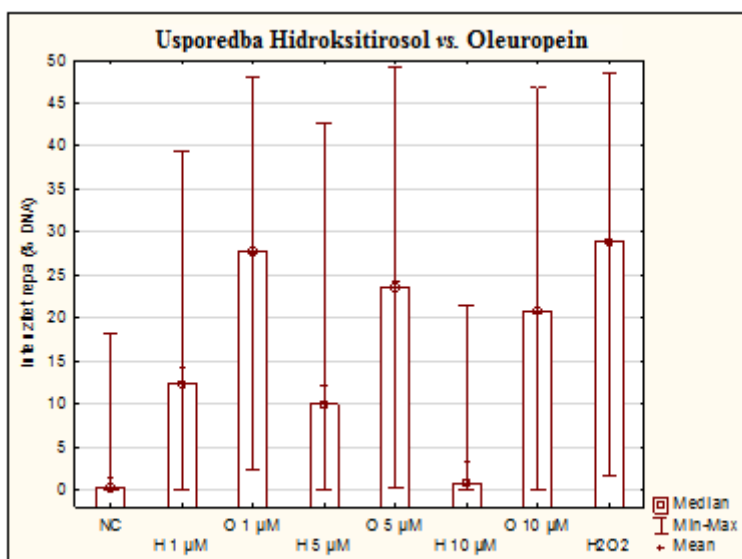
Analiza podataka provedena je pomoću testa analize varijance uz *post-hoc* Scheffe test. Statistička značajnost procjenjivana je na razini  $p<0,05$ .  
n.z. – nije statistički značajno.

Na slikama 48-50 prikazane su usporedbe primarnih razina oštećenja limfocitne DNA izmjerenih primjenom kometnog testa u uzorcima tretiranim s istim koncentracijama hidroksitirozola i oleuropeina u uvjetima *in vitro* u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta, tretirani limfociti su bili izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C. Razine primarnih oštećenja DNA usporedno su mjerene i u negativnoj i pozitivnoj kontroli.

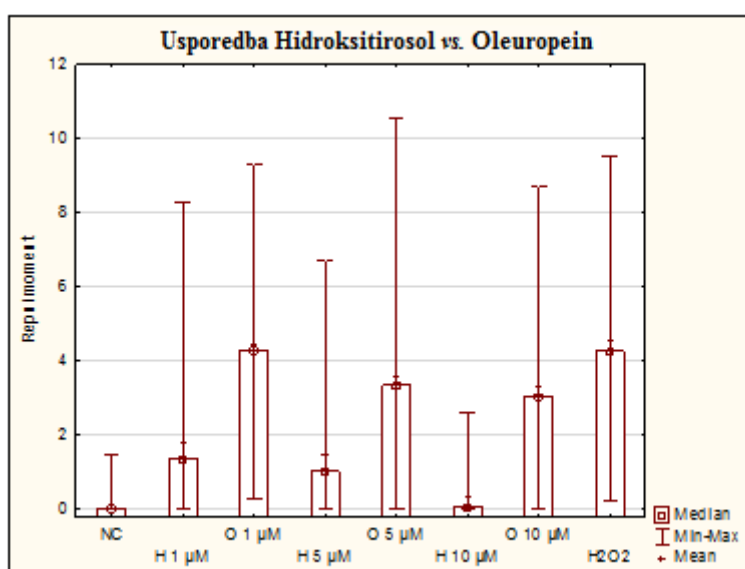
Iz prikazanih je podataka vidljivo da je pri svim testiranim koncentracijama hidroksitirozol pokazao bolji protektivni učinak, što je potvrđeno i nakon provedene statističke obrade podataka, čiji su rezultati prikazani u Tablici ST5.



**Slika 48.** Prikaz rezultata za dužine repa kometa u limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s hidroksitirozolom i oleuropeinom u koncentracijama 1, 5 i 10  $\mu\text{M}$  u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li predtretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedno su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.



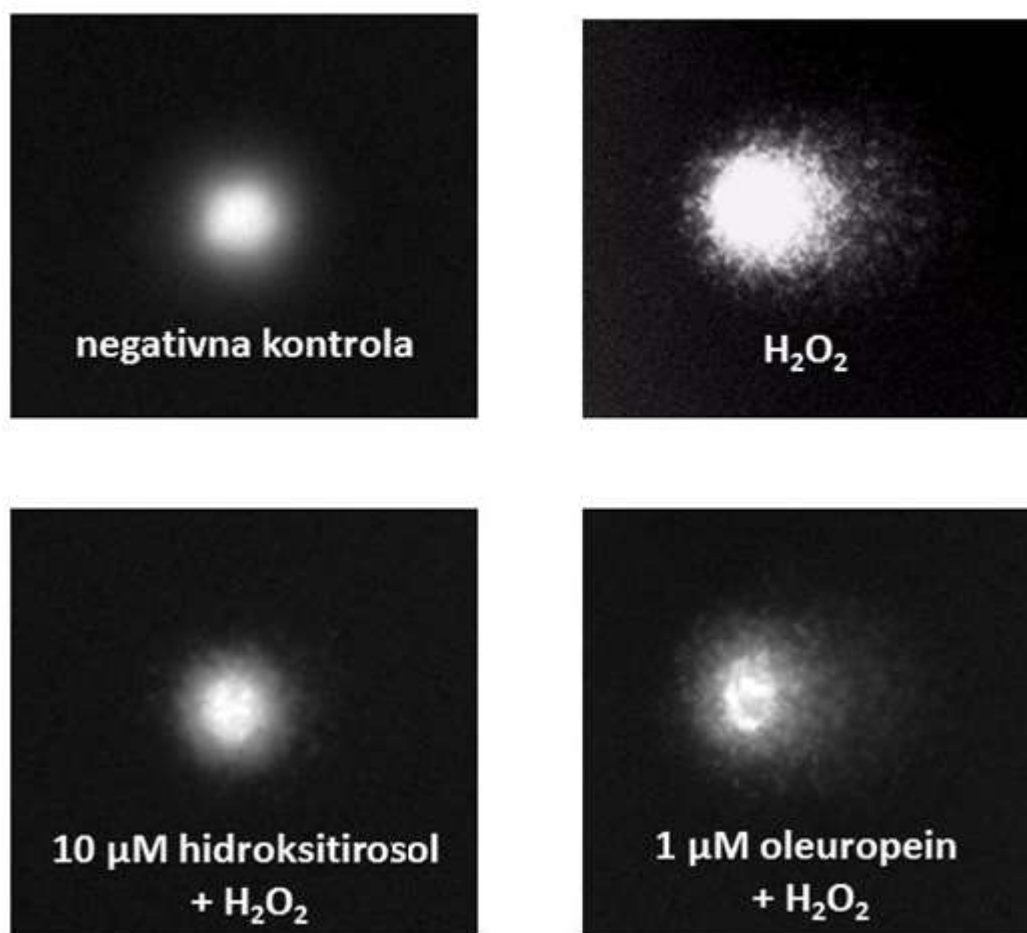
**Slika 49.** Prikaz rezultata za intenzitete repa kometa u limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s hidroksitirosolom i oleuropeinom u koncentracijama 1, 5 i 10  $\mu\text{M}$  u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li predtretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedo su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.



**Slika 50.** Prikaz rezultata za repne momente repa kometa u limfocitima periferne krvi tretiranim u uvjetima *in vitro* s hidroksitirosolom i oleuropeinom u koncentracijama 1, 5 i 10  $\mu\text{M}$  u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li predtretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Usporedo su mjerene razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

Tablica ST5. Rezultati statističke obrade podataka kometnog testa na limfocitima periferne krvi koji su u uvjetima *in vitro* tretirani s hidroksitirozolom (H) i oleuropeinom (O) u trajanju od ukupno 150 minuta. Nakon 120 minuta tretirani limfociti su izloženi djelovanju 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  na 37 °C kako bi se utvrdilo utječe li pred-tretman na ukupnu razinu primarnih oštećenja DNA. Pri istim koncentracijama uspoređivane su razlike u protektivnom potencijalu ispitivanih spojeva. Usporedo su analizirani i podaci za razine primarnih oštećenja DNA u uzorcima negativne i pozitivne kontrole.

<b>ANOVA Scheffe test</b>	<b>Dužina repa</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>H 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H 10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>
Negativna kontrola	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P=0,0098	P<0,0001	P<0,0001
1 $\mu\text{M}$		P<0,0001	n.z.	P=0,0103	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
5 $\mu\text{M}$			P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P=0,0005	n.z.
10 $\mu\text{M}$				P=0,0007	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
$\text{H}_2\text{O}_2$					P<0,0001	n.z.	P<0,0001
	<b>Intenzitet repa</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>H 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H 10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>
Negativna kontrola	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P=0,0384	P<0,0001	P<0,0001
1 $\mu\text{M}$		P<0,0001	n.z.	P<0,0001	P<0,0001	P=0,0009	P<0,0001
5 $\mu\text{M}$			P<0,0001	n.z.	P<0,0001	P=0,0004	n.z.
10 $\mu\text{M}$				P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
$\text{H}_2\text{O}_2$					P<0,0001	n.z.	n.z.
	<b>Repni moment</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>H 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>H 10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>O 1 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>
Negativna kontrola	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	n.z.	P<0,0001	P<0,0001
1 $\mu\text{M}$		P<0,0001	n.z.	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
5 $\mu\text{M}$			P<0,0001	P=0,0019	P<0,0001	P<0,0001	n.z.
10 $\mu\text{M}$				P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
$\text{H}_2\text{O}_2$					P<0,0001	n.z.	P=0,0052



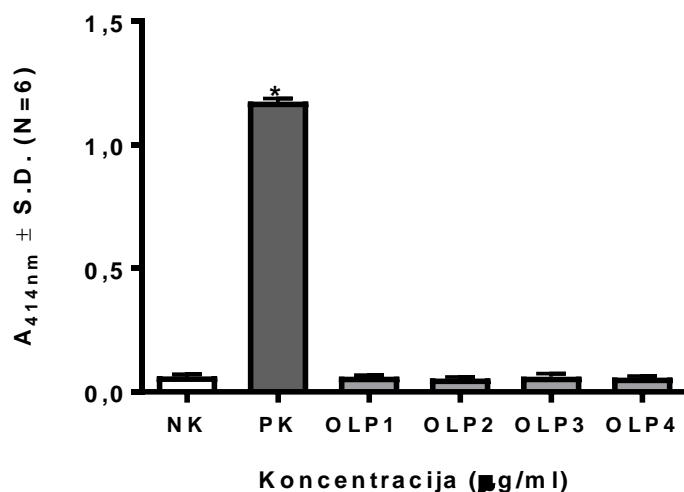
**Slika 51.** Obrisi denaturiranih nukleoida koji se vide pod fluorescencijskim mikroskopom nakon bojenja etidijevim bromidom u mikrogelovima agaroze pri mjerenju kometa pomoću sustava za analizu slike Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd., UK). (a) negativna kontrola; (b) pozitivna kontrola ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); (c) limfociti pred-tretirani kroz 120 min s  $10 \mu\text{M}$  hidroksitirozolom, a potom 30 min tretirani s  $5 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (d) limfociti pred-tretirani kroz 120 min s  $1 \mu\text{M}$  oleuropeinom, a potom 30 min tretirani s  $5 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Snimljeno pri povećanju mikroskopa  $200\times$ .

Na Slici 51 vidi se da 30 min izlaganje limfocita  $5 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  narušava integritet genoma limfocita, pri čemu nastaje veći broj lomova DNA i stvaraju se fragmenti različite dužine koji putuju kroz električno polje stvarajući obris kometa. U kontrolnom uzorku gdje je sačuvan integritet genoma, ne nastaju fragmenti i obris nukleoida je gotovo sasvim pravilan okrugao. Predtretman hidroksitirozolom uspješno „štiti“ DNA limfocita od stvaranja većeg broja lomova i nastanka fragmenata, za razliku od tretmana oleuropeinom.

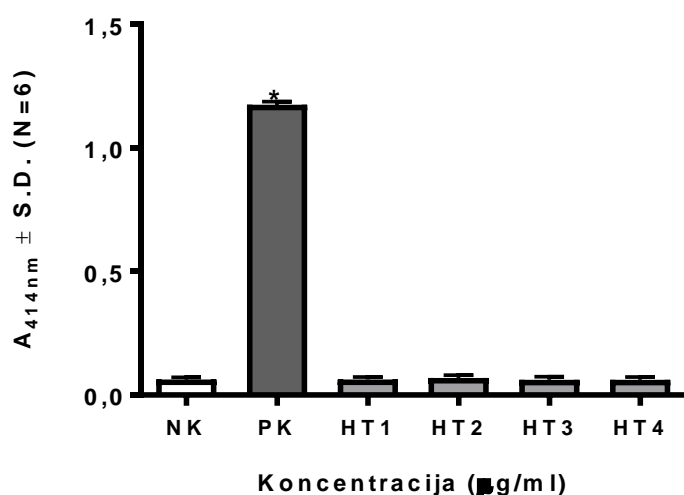


#### 4.5. Ispitivanje hemolitičkih učinaka

Rezultati određivanja hemolitičkog učinka pod utjecajem različitih koncentracija oleuropeina i hidroksitirosola na humanim eritrocitima dani su na Slikama 52 i 53. U provedenom testu citotoksičnosti, oleuropein i hidroksitirosol nisu pokazali hemolitičku aktivnost na humanim eritrocitima *ex situ* pri testiranim koncentracijama u usporedbi s negativnom kontrolom.



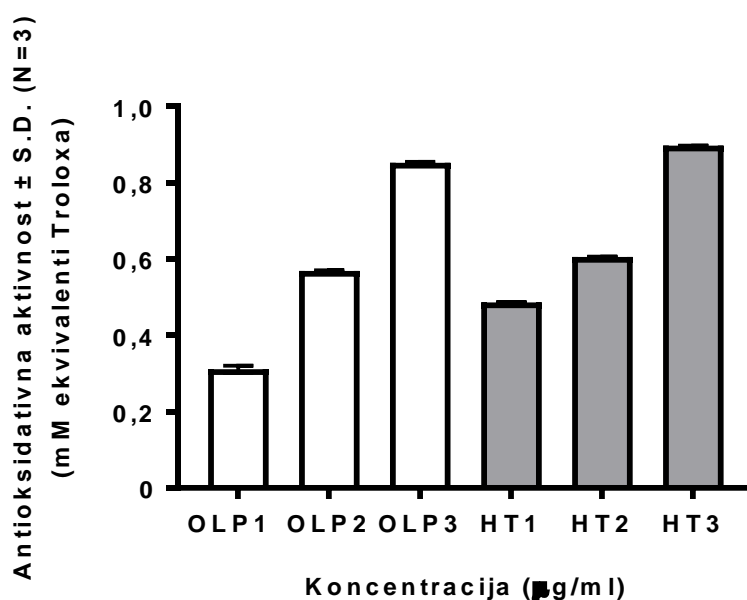
**Slika 52.** Ovisnost apsorbancije (414 nm) o koncentraciji oleuropeina (OLP) nakon 3 sata inkubacije tretiranih humanih eritrocita; OLP1 – 3 µM (1,6 µg/ml), OLP2 – 10 µM (5,4 µg/ml), OLP3 – 30 µM (16,2 µg/ml), OLP4 – 60 µM (32,4 µg/ml); NK – negativna kontrola (netretirane stanice); PK – 10%-tna otopina Triton X-100. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.



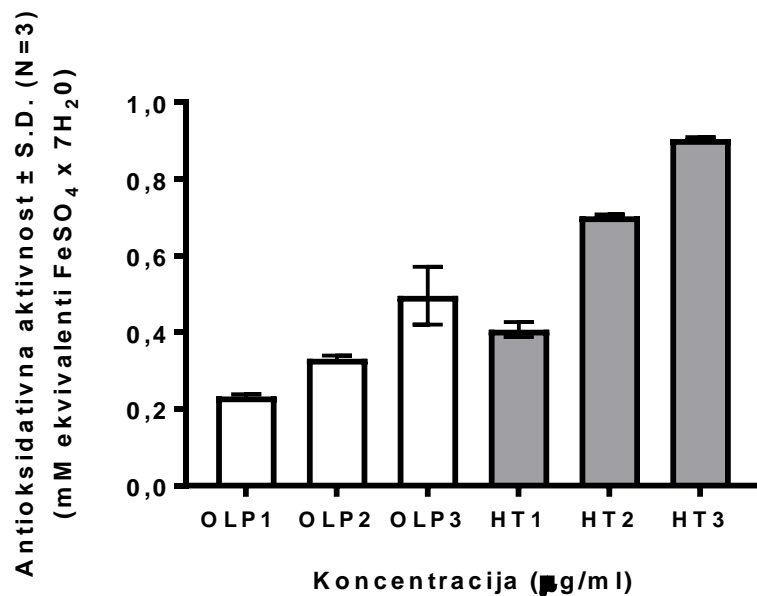
**Slika 53.** Ovisnost apsorbancije (414 nm) o koncentraciji hidroksitirosola (HT) nakon 3 sata inkubacije tretiranih humanih eritrocita; HT1 – 3µM (0,46 µg/ml) , HT2 – 10 µM (1,5 µg/ml), HT3 – 30 µM (4,6 µg/ml), HT4 – 60 µM (9,2 µg/ml); NK – negativna kontrola (netretirane stanice); PK – 10%-tna otopina Triton X-100. Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SD. Zvezdicom (\*) su označene vrijednosti koje su statistički značajne ( $p < 0,05$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom.

#### 4.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

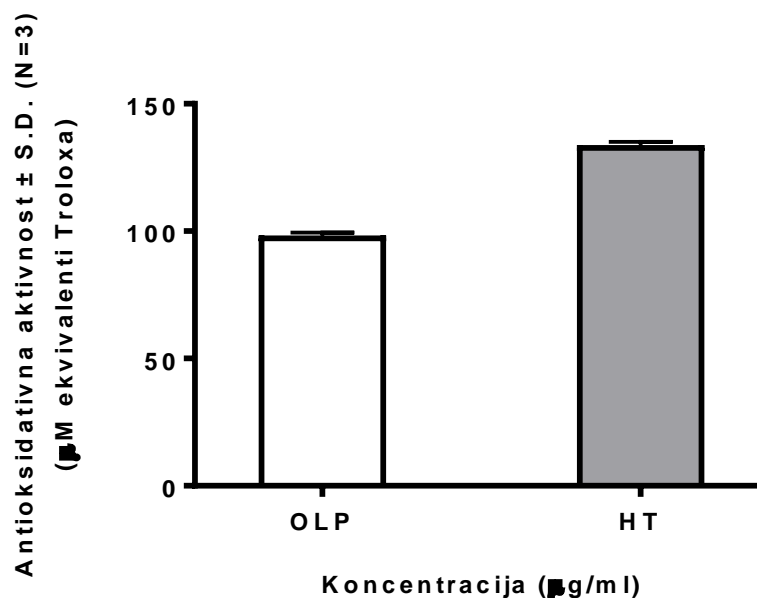
Rezultati na Slici 54-56 prikazuju antioksidativnu aktivnost oleuropeina (OLP) i hidroksitirosola (HT) određenu s tri metode: ABTS metodom (oleuropein:  $0,311 \pm 0,009$  mM ekvivalenti Troloxa/  $\mu\text{M}$  OLP, hidroksitirosol:  $0,486 \pm 0,001$  mM ekvivalenti Troloxa/  $\mu\text{M}$  HT; kalibracijski pravac standarda Troloxa  $y = 0,1905x + 0,0129$ ;  $R^2 = 0,9819$ ), FRAP metodom (oleuropein:  $0,233 \pm 0,005$  mM  $\text{Fe}^{2+}$ /  $\mu\text{M}$  OLP, hidroksitirosol:  $0,407 \pm 0,019$  mM  $\text{Fe}^{2+}$ /  $\mu\text{M}$  HT; kalibracijski pravac standarda  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   $y = 0,8867x + 0,0488$ ;  $R^2 = 0,9887$ ) i CUPRAC metodom (oleuropein:  $0,098 \pm 0,001$  mM ekvivalenti Troloxa/  $\mu\text{M}$  OLP; hidroksitirosol:  $0,134 \pm 0,002$  mM ekvivalenti Troloxa/  $\mu\text{M}$  HT; kalibracijski pravac standarda Troloxa  $y = 0,0019x + 0,0015$ ;  $R^2 = 0,9961$ ).



**Slika 54.** Antioksidativna aktivnost fenolnih spojeva oleuropeina i hidroksitirosola određena ABTS metodom; Rezultati prikazuju srednje vrijednost  $\pm$  SD. OLP – oleuropein (OLP1 – 1  $\mu\text{M}$  (0,54  $\mu\text{g/ml}$ ); OLP2 – 2  $\mu\text{M}$  (1,08  $\mu\text{g/ml}$ ); OLP3 – 3  $\mu\text{M}$  (1,62  $\mu\text{g/ml}$ )) i HT – hidroksitirosol (HT1 – 1  $\mu\text{M}$  (0,15  $\mu\text{g/ml}$ ); HT2 – 2  $\mu\text{M}$  (0,31  $\mu\text{g/ml}$ ); HT3 – 3  $\mu\text{M}$  (0,46  $\mu\text{g/ml}$ )).



**Slika 55.** Antioxidativna aktivnost fenolnih spojeva oleuropeina i hidroksitirosola određena FRAP metodom; Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SD. OLP – oleuropein (OLP1 – 1 µM (0,54 µg/ml); OLP2 – 2 µM (1,08 µg/ml); OLP3 – 3 µM (1,62 µg/ml)) i HT – hidroksitirosol (HT1 – 1 µM (0,15 µg/ml); HT2 – 2 µM (0,31 µg/ml); HT3 – 3 µM (0,46 µg/ml)).



**Slika 56.** Antioxidativna aktivnost fenolnih spojeva oleuropeina i hidroksitirosola određena CUPRAC metodom; Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± SD. OLP – oleuropein (OLP - 1 µM (0,54 µg/ml)) i HT – hidroksitirosol (HT – 1 µM (0,15 µg/ml)).

## **5. RASPRAVA**

Ograničeni broj antimikotika, njihove nuspojave i toksičnost, kao i pojava rezistentnih mikrobnih sojeva potaknula je istraživanje novih potencijalnih terapeutika koji mogu predstavljati sigurniju alternativu liječenja ili poboljšati djelotvornost dostupnih protugljivičnih lijekova. Istraživanje mogućeg antifungalnog učinka molekula iz prirodnih izvora, poput fenolnih spojeva koji su poznati po brojnim biološkim učincima, nudi jedan od mogućih pristupa (Negri i sur., 2014). U ovom radu dan je pregled testova provedenih u uvjetima *in vitro* kojima se ispitaio učinak sekundarnih metabolita masline (*Olea europaea* L.), oleuropeina i hidroksitirosola, na vijabilnost i virulentne čimbenike medicinski značajne gljivične vrste *C. albicans*. Dodatno su napravljeni testovi kojima bi se dalo moguće objašnjenje mehanizama putem kojeg navedene molekule djeluju na ovu gljivičnu vrstu. Osim učinka ovih fenolnih spojeva, provedeno je ispitivanje djelovanja vodenog ekstrakta maslinova lista na vijabilnost vrste *C. albicans* subkultivacijskom metodom (Tablica 4), koji je pokazao višu vrijednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK=25 mg/ml) (Zorić i sur., 2016) u usporedbi s oleuropeinom (MIK=12,5 mg/ml) (Zorić i sur., 2016) i hidroksitirosolom (MIK=6,25 mg/ml) (Zorić i sur., 2013). Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da je antimikrobni učinak ovih tvari slabiji u odnosu na amfotericin B (MIK=1 µg/ml). MIK vodenog ekstrakta maslinova lista se ne može odrediti mikrodilucijskom metodom prema EUCAST smjernicama budući da biljni ekstrakti sadrže sastavnice koje mogu interferirati sa spektrofotometrijskim određivanjem antimikrobnog učinka. HPLC analizom utvrđeno je da je najzastupljeniji spoj u ekstraktu bio oleuropein (9,281±0,185 g tirosola/100 g suhog ekstrakta) (Zorić i sur., 2016) (Tablica 3 i Slika 19), što je u skladu s drugim ranije objavljenim istraživanjima (Khatab i sur., 2015; Pereira i sur., 2007). Rezultati ispitivanja antimikrobnog učinka za prirodne ekstrakte mogu varirati uslijed razlika u količini i vrsti prisutnih fenolnih spojeva. Odabir otapala za ekstrakt, vrsta kultivara, agronomski i klimatski čimbenici mogu utjecati na sastav lista i posljedično na antimikrobnu aktivnost ekstrakta. Također, drugi spojevi koji su u sastavu ekstrakta mogu djelovati na učinak fenolnih spojeva što se posljedično odražava na njihovo antifungalno djelovanje. Navedene razlike u sastavima ekstrakata otežavaju usporedbu između različitih ispitivanja antimikrobnog učinka provedenih za ekstrakt maslinova lista (Khatab i sur., 2015). Iz dobivenih rezultata također je utvrđeno da ispitivane tvari induciraju apoptotičke mehanizme kod vrste *C. albicans* što doprinosi njihovoj antifungalnoj aktivnosti (Zore i sur., 2011). Fluorescencijskom mikroskopijom utvrđene su karakteristične morfološke promjene apoptoze (kondenzacija kromatina i skupljanje stanica) pod utjecajem oleuropeina, hidroksitirosola i ekstrakta maslinova lista (Tablice 5 – 7) (Zorić i sur., 2013; Zorić i sur. 2016).

Dosadašnja istraživanja antifungalne aktivnosti fenolnih spojeva uglavnom su se temeljila na ispitivanju učinka koji ovi spojevi imaju na inhibiciju staničnog rasta. Ograničeni su podaci o djelovanju koji pojedini fenoli, uključujući oleuropein i hidroksitirozol, imaju na virulentne čimbenike vrste roda *Candida*.

Patogenost gljivica poput vrste *C. albicans* ovisi o više faktora i nastaje kao posljedica narušene ravnoteže između gljivičnih čimbenika virulencije i mehanizama imunološkog odgovora nositelja. Prema nekadašnjem konceptu, gljivice su pasivno sudjelovale u procesu patogeneze prilikom nastanka gljivične infekcije. Imunokompromitirani nositelj se smatrao jedinim mehanizmom odgovornim za nastanak infekcije. Danas je navedeni koncept izmijenjen i utvrđeno je da mikroorganizmi aktivno sudjeluju u patofiziologiji bolesti posredstvom invazivnih mehanizama zvanih virulentni čimbenici (Tamura i sur., 2007). Virulentni čimbenik je mikrobnna komponenta koja uzrokuje štetu nositelju (Casadevall i Pirofski, 1999). Oštećenje nositelja može nastati djelovanjem mikroorganizma na tkivo ili kao posljedica odgovora imunološkog sustava, odnosno pod utjecajem oba navedena faktora (Casadevall, 2007). Istraživanje virulentnih čimbenika je od velikog značaja u mikrobnjoj patogenezi budući da oni često izazivaju protektivni odgovor imunološkog sustava nositelja. Prednosti istraživanja faktora virulentnosti su (Clatworthy i sur., 2007):

- (1) veći broj mogućih „meta“ za razvoj novih antifungalnih lijekova,
- (2) očuvanje endogene mikrobiote, što je od velike važnosti osobito u slučajevima komenzala poput vrste *C. albicans*, i
- (3) slabiji selektivni pritisak za razvoj rezistencije na antimikotike.

Potvrda uloge virulentnih čimbenika u razvoju kandidoze dana je i nedavnim ispitivanjima provedenim na vrsti *C. auris* koja ima sličnu kinetiku rasta kao i vrsta *C. albicans*, ali kod koje je ekspresija značajnih virulentnih čimbenika slabija u odnosu na vrstu *C. albicans* zbog čega je navedena vrsta ujedno i manje virulentna (Larkin i sur., 2017).

Ovakav pristup istraživanju omogućava razvoj kombinacije terapeutika koji mogu djelovati na nekoliko virulentnih čimbenika, što posljedično može uključivati niz prednosti poput šireg spektra djelovanja, poboljšane sigurnosti i podnošljivosti kao i smanjene antifungalne rezistencije.

Osim porasta rezistencije, postoje i drugi faktori koji ograničavaju primjenu dostupnih antimikotika, kao što su neodgovarajući spektar aktivnosti, slaba bioraspoloživost, niski indeks tolerancije, interakcije s drugim lijekovima, neodgovarajući farmakokinetički profil, i značajni toksični učinci (Pfaller i sur., 2010; Lewis i Graybill, 2008). S obzirom da veći dio

tvori izoliranih iz prirodnih izvora pokazuje relativno visoke MIK vrijednosti, dodatna mogućnost u slučajevima varijabilnih MIK vrijednosti takvih tvari je ispitivanje sinergističkog djelovanja fenolnih spojeva i standardnih antimikotika. Iz navedenog razloga je ispitan učinak kombinacije oleuropeina odnosno hidroksitirosola i amfotericina B na vrstu *C. albicans*. Rezultati istraživanja nisu pokazali sinergističke učinke već su obje ispitivane tvari u kombinaciji s amfotericinom imale indiferentno djelovanje.

Vrste roda *Candida* su važni patogeni zbog svoje raznolikosti i sposobnosti da prežive na različitim anatomskim područjima (Calderone i Fonzi, 2001). Vrsta *C. albicans* kao komenzalni organizam nastanjuje usnu šupljinu, gastrointestinalni sustav, rodnicu i kožu zdravih osoba (Huffnagle i Noverr, 2013). Predisponirajući čimbenici koji doprinose prelasku bezopasnog komenzala u oportunističkog patogena, uzrokujući infekciju ili kandidozu, uključuju, ali nisu ograničeni na imunosupresiju, produženo liječenje s antibioticima širokog spektra i kronične bolesti (Polke i sur., 2015). Od svih vrsta roda *Candida*, *C. albicans* je uzročnik u većini slučajeva kandidoza (Horn i sur., 2009). Vrsta *C. albicans* može postojati u više morfoloških i razvojnih oblika, i to u obliku blastospore, pseudohifalnog i hifalnog obliku. Morfološka promjena u germinirani oblik je važna za mnoge procese vezane uz virulenciju, uključujući invaziju epitelnih stanica nositelja, diseminaciju, adheziju i stvaranje biofilma (Thompson i sur., 2011). Rani dokaz važne uloge filamentacije u virulenciji vrste *C. albicans* prikupljen je u ispitivanjima na genetički definiranim mutantnim sojevima koji nisu mogli germinirati i koji su imali smanjenu virulenciju na mišjem modelu diseminirane kandidoze. Nedavno je važnost morfološke promjene u virulenciji dodatno potvrđena primjenom sojeva stvorenih genetičkim inženjeringom koji imaju tetraciklin-regulatorni promotorski sustav. Utvrđeno je da izlaganje blastosporom obliku kvasca uzrokuje specifični imunološki odgovor nositelja, dok izlaganje filamentoznom obliku uzrokuje nespecifični imunološki odgovor i čak doprinosi patogenosti (Cheng i sur., 2012; Netea i sur., 2008). Na primjer, epitelne stanice sluznice mogu razlikovati blastosporne od filamentoznih oblika, i pojačani upalni odgovor je povezan s filamentacijom vrste *C. albicans*, što doprinosi patologiji oralnih kandidoza i kandidoza rodnice. Kod sistemskih infekcija, filamentozni oblik je važan u izbjegavanju fagocita i nastanka akutnu faze koja vodi do upalnog stanja organizma nositelja (Lorenz i Fink, 2001; MacCallum i sur., 2009). Iz navedenog proizlazi mogućnost da bi primjena tvari koja pokazuje učinak inhibicije germinacije mogla doprinijeti i nositelju modulirajući odgovor imunološkog sustava. Navedena morfološka promjena u micelarni oblik događa se kao odgovor na različite okolišne signale, poput povišene temperature ili pH, manjka hranjivih tvari i prisutnosti makrofaga nositelja (Pierce i Lopez-

Ribot, 2013). Neki uzgojni mediji „siromašnog“ sastava kao na primjer medij s N-acetil-D-glukozaminom (GlkNAc) kao jedinim izvorom ugljika ili Spiderov medij koji sadrži manitol kao izvor ugljika također induciraju stvaranje filamentoznih oblika. Navedeni vanjski čimbenici pokreću različite stanične signalne puteve koji mogu utjecati na indukciju ili represiju nastanka hifa. Svaki od navedenih puteva aktivira različite transkripcijske faktore koji induciraju ekspresiju specifičnih gena koji stimuliraju vrstu *C. albicans* na stvaranje hifa. cAMP put ima ključnu ulogu u gljivičnoj morfogenezi (Sudbery, 2011). U prilog navedenom ide činjenica da *cyr1Δ* mutanti kojima nedostaje adenilil-ciklaza i *efg1Δ* mutanti kojima nedostaje ključni transkripcijski faktor nisu imali sposobnost indukcije hifalnih-specifičnih gena niti morfološke promjene u germinirani oblik (Stoldt i sur., 1997; Rocha i sur., 2001; Marcus i sur., 2004). Točan mehanizam putem kojih promjena u transkripciji dovodi do hifalne morfogeneze nije u potpunosti poznat (Naseem i sur., 2015). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da oleuropein i hidrokstirosol inhibiraju morfogenezu gljivične vrste *C. albicans* u subinhibitornim (sub-MIK) koncentracijama (Slike 23 – 28.). Ispitivanje učinka ovih molekula na germinaciju je provedeno primjenom hranjivih medija (GlkNAc medij i Spiderov medij) za koje je utvrđeno da induciraju nastanak hifa kod ove vrste. Šećer GlkNAc je značajna stanična signalna molekula prisutna kod mnogih organizama. Navedena molekula je komponenta gljivične stanične stijenke te izvanstaničnog matriksa glikoaminoglikana kod stanica sisavaca (Moussian, 2008). Alvarez i Konopka (2007) su identificirali prvi eukariotski GlkNAc transporter Ngt1 potreban za prijenos ovog šećera u stanicu. Smatra se da je mehanizam kojim GlkNAc inducira morfološku promjenu posredovan navedenim transporterom (Alvarez i Konopka, 2007) te signalnim putem koji aktivira transkripcijski faktor Cph1 (Biswas i sur., 2003; Singh i sur., 2001). GlkNAc transporter Ngt1 je važan za indukciju odgovora u vrste *C. albicans*, što upućuje na zaključak da navedeni šećer mora ući u stanice kako bi se pokrenuo odgovor (Alvarez i Konopka, 2007). Dva su puta najmanje inducirana s GlkNAc (Gunasekera i sur., 2010; Naseem i sur., 2015):

- cAMP-ovisni put koji inducira hifalni odgovor stanice i morfološku promjenu, te
- cAMP-neovisni put koji inducira gene potrebne za katabolizam GlkNAc.

Međutim, metabolizam GlkNAc nije potreban za indukciju signala, što je potvrđeno ispitivanjem na *hxx1Δ* mutantu koji je imao sposobnost indukcije hifa iako mu nedostaje gen za protein HXX1 koji je odgovoran za fosforilaciju GlkNAc i njegov ulazak u metabolički put (Naseem i sur., 2011). Potvrdu navedenog dali su Naseem i sur. (2015) nedavnim ispitivanjem utjecaja metabolizma GlkNAc na vrstu *C. albicans*. U navedenom ispitivanju



analizirani su *hck1Δdac1Δnag1Δ* mutanti kojima nedostaju važni proteini u metabolizmu ovog šećera te su autori zaključili iz dobivenih rezultata da GlkNAc djeluje sinergistički s ambijentalnim pH u indukciji hifalnih gena i da se hifalna morfologija može regulirati neovisno od ekspresije hifalnih gena. Dodatno je provedeno ispitivanje inhibitornog učinka oleuropeina i hidrokstirosola na hifalnu morfogenezu kod vrste *C. albicans* induciranu u uvjetima staničnog gladovanja u Spider mediju. Obje molekule pri testiranim koncentracijama inhibiraju stanični odgovor induciran staničnim gladovanjem na ovom mediju što posljedično sprječava morfogenezu vrste *C. albicans*. Stvaranje hifa na Spider mediju zahtijeva odgovor staničnog signalnog puta cAMP-PKA (PKA, protein kinaza A). Hipergeminacija stanica na Spiderovom mediju inducirana je stimulacijom od strane PKA. Stimulacija PKA puta također uzrokuje fosforilaciju transkripcijskog faktora Efg1 koji navedenom aktivacijom inducira ekspresiju gena potrebnih za hifalnu morfogenezu.

Virulencija kod vrste *C. albicans* uključuje prepoznavanje nositelja što omogućuje patogenom mikroorganizmu da se veže na stanice nositelja i proteine (Cullen i Sprague, 2012). Prvi korak u gljivičnoj kolonizaciji na ljudska tkiva i infekciji je adherencija na površine nositelja koju kontrolira i pokreće nekoliko staničnih signalnih kaskada. Inicijalno vezanje gljivičnih stanica posredovano je nespecifičnim faktorima poput hidrofobnosti i elektrostatskih sila, te promovirano specifičnim adhezinima prisutnim na površini gljivičnih stanica koji prepoznaju ligande poput proteina, fibrinogena i fibronektina (Li i sur., 2003). Važnu ulogu u interakciji između patogena i nositelja ima stanična stijenka. Stanična stijenka vrste *C. albicans* je organizirana u nekoliko slojeva sastavljenih od polisaharida koji sadrže tri vrste ugljikohidrata: D-glukozu, N-acetil-D-glukozamin i D-manozu. Zajedno s hitinom, glukani čine čvrstu strukturu stanične stijenke (Klis i sur., 2001). Svaka gljivična vrsta ima jedinstvene umrežene polimere glukana i proteina. Proteini stanične stijenke su glikozilirani i imaju negativno nabijene fosfatne skupine u polisaharidnim bočnim lancima koji utječu na elektrostatski naboj te na staničnu površinsku hidrofobnost, koja se dovodi u svezu i s adherencijom vrste *C. albicans* na biomaterijale (Tronchin i sur., 2007). Iako je u nekim studijama stanična površinska hidrofobnost navedena kao čimbenik koji ima utjecaj na adherenciju na epitelne stanice i povezan je s gljivičnom patogenošću (Ishida i sur., 2006; Hazen, 1991), rađene su i druge studije koje daju manju važnost ovom faktoru u procesu adherencije. Neki antifungalni lijekovi poput amfotericina B, nistatina, ketokonazola, flukonazola i 5-fluorocitozina smanjuju adherenciju na epitelne stanice, ali ne interferiraju s površinskom staničnom hidrofobnosti gljivica (Ellepola i Samaranayake, 1998). Rezultati ispitivanja djelovanja oleuropeina i hidrokstirosola na ovaj čimbenik pokazuju da ove tvari

moduliraju staničnu površinsku hidrofobnost u subinhibitornim (sub-MIK) koncentracijama što se može dovesti u svezu s njihovim utjecajem na strukturne promjene u gljivičnoj staničnoj stijenci (Slika 29) (Zorić i sur., 2016; Zorić i sur., 2013).

Vrsta *C. albicans* može adherirati na različite biomaterijale, poput katetera, proteza i drugih medicinskih implantata pri čemu se stvara biofilm. Planktonske stanice vrste *Candida* blastosporne morfologije započinju adheziju, nakon čega slijedi prijelaz u germinirani oblik posredstvom kojeg se odvija invazija tkiva i stvaranje biofilma (Fazly i sur., 2013). Čimbenici koji utječu na stvaranje biofilma uključuju vrstu površine odnosno mikrotopografiju i hidrofobnost materijala. Povećanje hrapavosti površine i hidrofobnosti materijala su u pozitivnoj korelaciji s nastankom *Candida* biofilma. Još 1994. god. Hawser i Douglas su napravili ispitivanje rasta *Candida* biofilma na različitim materijalima od kojih su načinjeni kateteri kako bi utvrdili koji materijali podržavaju rast biofilma. U usporedbi s polivinilkloridom, najpodložniji rastu biofilma vrste *C. albicans* su bili lateks i elastomer silikona, dok je smanjen rast biofilma primijećen za poliuretan i 100 % silikon. Takve vrste infekcija je teško liječiti i predstavljaju opasnost za bolesnika zbog visoke rezistencije koju pokazuju na dostupne antimikotike te se često medicinski implantati moraju kirurški zamijeniti (Finkel i Mitchell, 2011; Hawser i Douglas, 1994). Dijagnoza i liječenje biofilm-povezanih infekcija je zahtjevno i zbog moguće prisutnosti više različitih mikroorganizama unutar biofilma. Polimikrobne biofilme mogu činiti endogena mikrobiota kao i bolnički patogeni. Također, utvrđeni su biofilmovi u kojima su zajedno prisutni eukariotski i prokariotski mikroorganizami, poput sistemskih infekcija gdje su utvrđene zajednice vrsta *C. albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* i *Staphylococcus aureus* (Harritt i Noverr, 2011; Klotz i sur., 2007). Dodatno, mješovite zajednice biofilmova utvrđene su kod infekcija rodnice (*Candida* i *Gardnerella vaginalis*) i kožnih infekcija (*Candida*, *Curvularia*, *Malessezia*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Engodontium* i *Trichophyton*) (Harritt i Noverr, 2011). Kod plućnih infekcija postoje primjeri i mješovitih biofilmova gdje bakterija vrste *Pseudomonas aeruginosa* djeluje antagonistički na vrstu *C. albicans* (Morales i sur., 2010).

Ispitivanje pri sub-MIK koncentracijama oleuropeina i hidroksitirosola nije pokazalo inhibitorni učinak na stvaranje biofilma vrste *C. albicans* (Slika 30). Djelovanje ispitivanih molekula na ovaj virulentni čimbenik provedeno je na vrsti *C. albicans* s obzirom da ova vrsta pokazuje veću patogenost i da je stvaranje biofilma značajno učestalija pojava kod kliničkih izolata vrste *C. albicans* u usporedbi s vrstama *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. dubliniensis* (Villar-Vidal i sur., 2011; Hawser i Douglas, 1994). Mehanizam velike otpornosti biofilma na

djelovanje tvari s antifungalnim učinkom uključujući i dostupne antimikotike koji se propisuju u liječenju ovih infekcija nije u potpunosti razjašnjen međutim, poznati su neki čimbenici rezistencije. Rezistencija na protugljivične lijekove uključuje neke od sljedećih mehanizama (Taff i sur., 2013):

- mutacija značajnih gena npr. gena ERG 11 koji kodira za protein Erg11p (lanosterol 14- $\alpha$ -demetilaza) značajan u biosintezi ergosterola,
- povećana ekspresija gena za efluks pumpe: CDR1 i CDR2 (ABC membranski transportni proteini) te MDR1 (MFS transportni proteini),
- rast biofilma koji otežava prodiranje antifungalnih lijekova,
- indukcija staničnog stres odgovora,
- povećana ekspresija gena kroz izokromosomske formacije (Selmecki i sur., 2008).

Kemoterapeutici, uključujući i antimikotike, imaju učinak usmjeren na staničnu vijabilnost. Ovi lijekovi mogu imati fungicidno djelovanje pri čemu se uništavaju stanice i/ili fungistatsko djelovanje pri čemu se inhibira stanični rast. Takav način djelovanja uzrokuje pojavu sojeva rezistentnih na antimikotike (Clatworthy i sur., 2007). Rezistencija se prvenstveno pojavila na azolnu skupinu antimikotika uslijed njihovog fungistatskog djelovanja zbog čega je teško uništiti sve stanice patogenog mikroorganizma osobito kod imunokompromitiranih pacijenata (Kuhn i Ghannoum, 2004). Nadalje, mehanizam djelovanja većine antifungalnih lijekova je usmjeren, direktno ili indirektno, na staničnu stijenkku i staničnu membranu, osobito gljivični membranski sterol, odnosno ergosterol i njegovu biosintezu. Od dostupnih terapeutika koji se koriste u liječenju ovih vrsta infekcija, jedino ehinokandini (anidulafungin, kaspofungin i mikafungin) imaju novi način djelovanja koji se očituje u inhibiciji sinteze gljivičnog  $\beta$ -1,3-D-glukana.  $\beta$ -1,3-D-glukan je značajna strukturna komponenta gljivične stanične stijenke koja nije prisutna u stanicama čovjeka. Ehinokandini su prva grupa lijekova sa specifičnim djelovanjem na gljivice zbog čega imaju veću sigurnost primjene (Odds i sur, 2003). Međutim, utvrđena je i pojava rezistencije na ovu grupu lijekova, uslijed mutacije FKS1 gena koji kodira enzim glukan sintazu. Osim pojave rezistencije, ehinokandini također imaju ograničenu primjenu budući da su dostupni samo u intravenskim formulacijama zbog čega se koriste uglavnom u liječenjima najozbiljnijih invazivnih oblika kandidoza (Hernandez i sur., 2004; Wiederhold i sur., 2008). Identifikacija potencijalnih patogen-specifičnih „meta“ prilikom istraživanja novih terapeutika otežana je budući da su gljivične stanice eukariotske zbog čega tvari s antifungalnim učinkom često imaju visoku toksičnost prema ljudskim stanicama. Većina takvih tvari je toksična za ljudske stanice uslijed sličnih mehanizama

sinteze DNA, RNA i proteina što dodatno otežava liječenje gljivičnih infekcija. Stoga, ograničavajući čimbenik primjene antimikotika koji djeluje na zajedničku „meta“ koju imaju patogen i nositelj je uz visoku toksičnost i nedostatna selektivnost (Odds i sur., 2003). Mnogi antimikotici poput polienskog amfotericina B i azola djeluju kao inhibitori biosinteze ergosterola. Ergosterol je glavna sterolna komponenta gljivične stanične membrane i ima ulogu u održavanju staničnog integriteta i funkcije (Arthington-Skaggs i sur., 1999). Amfotericin B ima specifično djelovanje u usporedbi s drugim antimikoticima budući da ne inhibira enzime uključene u biosintezu ergosterola, već se veže na ergosterol čime narušava membransku funkciju uzrokujući otpuštanje staničnog sadržaja (Odds i sur., 2003). Osim amfotericina B, široku primjenu u kliničkoj praksi imaju azoli koji inhibiraju 14 $\alpha$ -demetilaciju lanosterola u putu biosinteze ergosterola (Vanden i sur., 1995).

Ispitivanjima je utvrđeno da fenolne strukture slične oleuropeinu djeluju antimikrobno putem oštećenja stanične membrane. Iako nije u potpunosti razjašnjen mehanizam antimikrobnog učinka oleuropeina, neki autori smatraju da je navedeni učinak posljedica prisutnosti ortodifenolnog sustava (katehola) u molekuli oleuropeina (Omar, 2010; Bisignano i sur., 1999). U ovom radu napravljeno je ispitivanje učinka oleuropeina i hidroksitirosola na modulaciju ergosterola kod vrste *C. albicans* metodom koja se temelji na specifičnoj spektralnoj apsorpciji ekstrahiranih sterola u intervalu od 240 do 300 nm, što je indikativno za ergosterol i 24(28)dehidroergosterol koji je kasni međuprodukt u biosintetskom putu ergosterola. Obje tvari pokazuju učinak na smanjenje sadržaja ergosterola u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji (Slika 35 – 39). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da ove tvari imaju mehanizam djelovanja putem oštećenja stanične membrane što posljedično dovodi do uništenja membranskog integriteta (Zorić i sur., 2016. U rasponu koncentracija 1,25 – 50 mg/ml za oleuropein i 0,625 – 25 mg/ml za hidroksitirosol ispitano je i otpuštanje staničnog sadržaja (DNA i proteina) uslijed narušene funkcije stanične membrane pod utjecajem ove dvije tvari. Dakle, učinak na staničnu permeabilnost određivan je posredno ispitivanjem otpuštanja staničnog sadržaja. Stanične komponente koje apsorbiraju svjetlo pri 260 nm predstavljaju jednu vrstu komponenti koje se otpuštaju. Prvenstveno su to nukleotidi, od kojih molekule koje sadrže uracil pokazuju najjaču apsorpciju (Khan i sur., 2013). Dobiveni rezultati pokazali su koncentracijski-ovisno otpuštanje citoplazmatskog sadržaja (Slike 41 i 42). Tretiranjem vrste *C. albicans* s oleuropeinom i hidroksitirosolom utvrđeno je višestruko djelovanje ovih tvari, uključujući oštećenja stanične stijenke, stanične membrane, kao i djelovanje na citoplazmatski sadržaj.

Dodatno su ispitani učinci oleuropeina i hidroksitirosola na depolarizaciju mitohondrijske membrane vrste *C. albicans* (Slika 45). Gubitak mitohondrijskog membranskog potencijala je primarna „meta“ većine vanjskih apoptotičkih signala. Ključni biokemijski korak uključen u indukciju apoptoze je aktivacija kaspaze 3 koja uvodi stanicu u apoptozu. Aktivacija ovog enzima događa se djelovanjem kaspaza 7/9 odnosno kaspaze 8. Ovi apoptotički događaji povezani su s gubitkom mitohondrijskog potencijala što je primarni mehanizam djelovanja mnogih tvari s kemoterapeutskim/ kemopreventivnim učinkom, kao i drugih vanjskih apoptotičkih signala (Hail, 2005; Mahata i sur., 2011).

Značajnu ulogu u virulenciji imaju i hidrolitički enzimi, osobito proteaze. Kod vrste *C. albicans* poznato je deset aspartatskih proteaza (Sap, engl. secreted aspartic proteinases) za koje kodiraju geni SAP1-10 (Sardi i sur., 2013). Eksperimentalne studije su pokazale da je povećano stvaranje Sap proteina važan čimbenik u interakciji između nositelja i virulentnog soja (Hoegl i sur., 1996). Također, utvrđeno je da su klinički izolati vrste *C. albicans* pacijenata s vulvovaginalnom kandidozom imali značajno veću proteolitičku aktivnost u usporedbi sa zdravim osobama (Kuriyama i sur., 2003; Cassone i sur., 1987). Istraživanja na izolatima usne šupljine i kliničkim izolatima rodnice pokazala su pozitivnu korelaciju između stvaranja Sap proteina u *in vitro* uvjetima i virulencije vrste *C. albicans* (De Bernardis i sur., 1992; Cassone i sur., 1987). Gljivične vrste koje su sadržavale uglavnom hidrofobne ostatke u staničnoj stijenci su bolje adherirale na tkiva i bile su rezistentnije na fagocitozu. Glavna razlika između hidrofobnih i hidrofilnih gljivičnih stanica ovisi više o razini glikozilacije proteina stijenke nego kemijskom sastavu stanica (Masuoka i Hazen, 2004; 1999). Dokaz u prilog važnosti ovih enzima kod adherencije dalo je ispitivanje sa specifičnim inhibitorom proteaza pepstatinom A, što je uzrokovalo blokiranje adherencije stanica vrste *C. albicans* (Zepelin i sur., 1999; Ollert i sur., 1993). Doprinos ovih enzima patogenezi vrste *C. albicans* utvrđena je ispitivanjima provedenim na SAP-deficijentnim mutantima i inhibitorima proteaza. Navedene studije pokazale su da različiti SAP geni imaju važnu ulogu kod mukoznih i sistemskih infekcija, te da su integrirani u adherenciji vrste *C. albicans*, oštećenju tkiva i izbjegavanju odgovora imunološkog sustava nositelja (Bramono i sur., 2006; Ingham i sur., 2012).

Prema Hube i Naglik (2001), funkcije Sap enzima u virulenciji vrste *C. albicans* obuhvaćaju sljedeće:

- jednostavnu ulogu u razgradnji hranjivih tvari,
- doprinos invaziji tkiva nositelja razgradnjom ili oštećenjem stanica,
- razgradnju površinskih molekula nositelja zbog pojačane adherencije,

- razgradnju stanica i molekula imunološkog sustava nositelja radi izbjegavanja ili rezistencije na antimikrobni napad.

Utvrđeno je da SAP1-6 geni imaju ulogu u adherenciji, oštećenju tkiva i promjenama vezanim uz imunološki odgovor nositelja. Lučenje ovih razgradnih enzima je virulentni čimbenik povezan s hifalnim rastom. SAP4, SAP5 i SAP6 geni induciraju se tijekom morfološke promjene iz blastospornog u invazivni hifalni oblik (Kadosh i sur., 2005; Nantel i sur., 2002; Sanglard i sur., 1997). Iako funkcija SAP7 nije u potpunosti poznata, ispitivanja rađena na proteinima Sap9 i Sap10 pokazala su da su navedeni enzimi značajni u očuvanju površinskog integriteta gljivičnih stanica (Naglik i sur., 2003). Poznato je da i druge vrste roda *Candida*, luče ove hidrolitičke enzime, poput vrsta *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. guilliermondii* (Zaugg i sur., 2001). U ovom istraživanju ispitali smo učinak obje tvari, oleuropeina i hidroksitirosola na ovaj virulentni čimbenik. Utvrđena je statistički značajna ( $p < 0,05$ ) inhibicija aktivnosti Sap proteaza u usporedbi s kontrolom pri ispitivanim koncentracijama oleuropeina i hidroksitirosola (Slike 31 i 32). Dobiveni rezultati pokazuju da bi inhibicija aktivnosti ovih izvanstaničnih enzima mogla biti povezana sa smanjenjem patogenosti (Zorić i sur., 2016).

Tvari koje imaju učinak protiv čimbenika virulencije mogu se potencijalno primjenjivati kao monoterapija, u kombinaciji sa standardnim antibioticima ili za profilaksu (Pierce i Lopez-Ribot, 2013). Liječenje standardnim antimikoticima može uništiti komenzalnu mikrobiotu organizma koja ima ulogu u kompetitivnoj inhibiciji patogenih mikroorganizama što može doprinijeti nastanku jače infekcije. Razvoj terapeutika s učinkom protiv virulentnih čimbenika potencijalno može imati djelovanje na oportunističke patogene mikroorganizme poput vrsta roda *Candida*, a da se pri tome očuva komenzalna mikrobiota i izbjegnu ozbiljnije nuspojave nastale kao posljedica disbioze mikrobiote (Clatworthy i sur., 2007). U tu svrhu provedeno je ispitivanja učinaka oleuropeina i hidroksitirosola na vijabilnost dviju probiotičkih bakterijskih vrsta roda *Lactobacillus* (Slike 46 i 47; Tablica 8), pri čemu je utvrđeno da su koncentracije ovih fenolnih tvari potrebne za 50% i 80% redukcije staničnog rasta značajno više od inhibitornih koncentracija potrebnih za smanjenje stanične vijabilnosti ispitivanih vrsta roda *Candida* spp. što podupire njihovu potencijalnu profilaktičku primjenu za rodnicu.

Budući da je jedan od glavnih nedostataka standardnih antimikotika njihova visoka toksičnost za stanice nositelja, prilikom istraživanja tvari koje pokazuju antifungalno djelovanje potrebno je ispitati njihove eventualne mutagene odnosno genotoksične učinke na ljudske stanice. Mehanizmi putem kojih neka tvar djeluje toksično ovise o više čimbenika, premda

većina toksičnih učinaka nastaje kao posljedica stvaranja slobodnih radikala. Različiti elektrofilni spojevi poput reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. reactive oxygen species) ili reaktivnih dušikovih vrsta (RNS, engl. reactive nitrogen species) mogu oksidirati biomolekule u organizmu. Elektrofilne vrste su uključene u modulaciju genske ekspresije interferencijom s transkripcijskim čimbenicima i/ili DNA što dovodi do mutacije i karcinogeneze. Oštećenja membranskih lipida, staničnih proteina, ugljikohidrata kao i nukleinskih kiselina uzrokuju štetu u funkciji stanica, tkiva i organa. Mutacije nukleinskih kiselina uslijed djelovanja elektrofilnih spojeva mogu rezultirati jednolančanim ili dvolančanim lomovima, spajanjima DNA-DNA, DNA-protein, DNA-lipid ili brojnim modifikacijama baza poput 8-hidroksi-deoksiguanozina, 5-hidroksimetiluracila, 8-hidroksideoksiadenina ili timinglikola. ROS molekule uključuju različite reducirane kisikove vrste poput superoksid anion radikala ( $\text{O}_2^-$ ), vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i vrlo reaktivnog hidroksilnog radikala ( $\text{OH}^\cdot$ ). Toksični spojevi uzrokuju oksidativni stres i kroničnu upalu što ima ulogu u staničnoj smrti, starenju i degenerativnim bolestima. Oksidativna oštećenja biomolekula (lipida i DNA) nastala uslijed djelovanja slobodnih kisikovih radikala mogu rezultirati povećanim rizikom od nastanka brojnih kroničnih bolesti poput ateroskleroze, karcinoma, kardiovaskularne bolesti, kronične upale, infarkta i drugih bolesti (Gosslau, 2016).

Fenolni spojevi iz masline imaju pozitivan učinak na lipidnu oksidaciju, DNA oksidativno oštećenje i općenito oksidativni stres u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Za ove spojeve je utvrđeno da sprječavaju nastanak novih reaktivnih oblika kisika kao i da uništavaju u organizmu nastale radikale (Cicerale i sur., 2011). Oleuropein iz maslinova lišća i maslinova ulja je poznat po svom antioksidativnom djelovanju, osobito po mogućnosti uništavanja nastalih slobodnih radikala (Slike 54 – 56). Ovaj sekoiridoidni glikozid sastavljen od hidroksitirosola, elenolne kiseline i molekule glukoze kao i oleuropeinom-bogati ekstrakti uništavaju DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) s jačim učinkom nego BHT (butilirani hidroksitoluen). Takav učinak se primarno dovodi u svezu s njegovom mogućnošću doniranja elektrona. Snažno antioksidativno djelovanje oleuropeina je uglavnom posljedica prisutnosti hidroksilne grupe (osobito 1,2-dihidroksibenzenskog dijela molekule) u kemijskoj strukturi koja može donirati vodik čime se sprječava oksidacija (Hassen i sur., 2015). Prema Briante i sur. (2003), fenolni spojevi mogu imati antioksidativnu aktivnost putem brojnih mehanizama. Najvažniji mehanizam je uništavanje slobodnih radikala kod kojih fenol može prekinuti lančanu reakciju slobodnih radikala. Prisutnost različitih supstituenata u strukturi fenola modulira njihova antioksidativna svojstva, osobito kapacitet doniranja vodika. Benavente-Garcia i sur. (2002) su utvrdili da flavonoidi iz maslinova lista mogu uništiti  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  radikal kao posljedica

prisutnosti funkcionalnih skupina u njihovoj strukturi, osobito B-prsten katehola, 3-hidroksilne skupine i 2,3-dvostruke veze konjugirane s 4-okso funkcijom. Za ostale fenolne spojeve prisutne u maslinovom listu, njihova mogućnost da djeluju na uništavanje ABTS<sup>•+</sup> radikala je uglavnom pod utjecajem broja i položaja slobodnih hidroksilnih grupa u njihovoj strukturi. I hidroksitirozol sa svojom katehinskom strukturom je iznimno snažan antioksidans, uslijed mogućnosti doniranja vodika i stvaranja stabilnog aromatskog radikala prilikom gubitka vodikova atoma za konjugaciju (Xie i sur., 2015). U *in vivo* uvjetima utvrđeno je da oleuropein povećava aktivnost enzimskih antioksidansa poput superoksid dismutaze (SOD), glutathion peroksidaze, glutathion reduktaze, katalaze te povećava razinu ne-enzimatskih antioksidansa poput glutathiona,  $\alpha$ -tokoferola,  $\beta$ -karotena i askorbinske kiseline kod zečeva s aloksan-induciranim dijabetesom (Al-Azzawie i sur., 2006), miševa hranjenih kolesterolom-bogatom hranom (Jemai i sur., 2008) i miševa izloženih akutnom arsenu (Kotyzova i sur., 2011). Za oleuropein je također utvrđeno da pojačava aktivnost kreatin fosfokinaze, kreatin fosfokinaze MB, laktat dehidrogenaze, aspartat transaminaze (AST) i alanin transaminaze (ALT), sprječava nastanak tiobarbituratna kiselina-reaktivnih vrsta (TBARS) i protein karbonila te inhibira ekspresiju sintaze dušikova oksida (Andreadou i sur., 2007). Kod ljudi, uzimanje maslinova ulja s visokim udjelom oleuropeina, je povećalo ukupnu antioksidativnu aktivnost, aktivnost katalaze kao i razine glutathiona i protein karbonila u plazmi, te smanjilo aktivnost superoksid dismutaze i glutathion peroksidaze, bez promjena u ekspresiji gena koji kodiraju za NF-E2-povezan faktor 2, katalazu, glutathion transferazu pi-1 i tioredoksin, što upućuje na zaključak da oleuropein djeluje direktnim uništavanjem ROS molekula čime se smanjuje potreba organizma za određenim antioksidativnim enzimima (Oliveras-López i sur., 2013; Perez-Herera i sur., 2013).

Prema literaturnim podacima fenolni spojevi iz maslinova ulja imaju antikarcinogena svojstva. U istraživanju koje su proveli Fabiani i sur. (2008) ispitani su učinci ekstrakta maslinova ulja, oleuropeina i hidroksitirozola na sprječavanje oksidativnog DNA oštećenja na krvnim mononuklearnim stanicama i leukemijskim HL60 stanicama primjenom kometnog testa. Hidroksitirozol i kompleksna mješavina fenola ekstrahiranih iz maslinova ulja, pri niskim koncentracijama od 1  $\mu\text{mol/l}$ , smanjila su oštećenja DNA nastala inkubacijom s oksidansom  $\text{H}_2\text{O}_2$  (40  $\mu\text{mol/l}$ ). Pri 10  $\mu\text{mol/l}$ , zaštitni učinak hidroksitirozola je bio 93% na HL60 stanicama i 89% na mononuklearnim stanicama. Oleuropein je također pokazao zaštitni učinak od  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induciranih DNA oštećenja, iako s nižom djelotvornosti (raspon zaštite, 25-75%). Autori su zaključili da maslinovo ulje može učinkovito spriječiti početni korak u kancerogenezi *in vivo*, jer se efektivne koncentracije potrebne za zaštitu od oksidativnog DNA

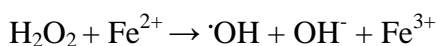


oštećenja mogu postići uzimanjem maslinova ulja kroz prehranu. Također, SMART testom (engl. somatic mutation and recombination test) za utvrđivanje somatskih mutacija i rekombinacija, na vrsti *Drosophila melanogaster*, ispitani su antigenotoksični učinci ekstrakta maslinova lista, kao i samog oleuropeina na oksidativnim oštećenjima DNA uzrokovanim s  $H_2O_2$ . Navedeno ispitivanje pokazalo je da ekstrakt maslinova lista ima inhibitorni učinak od 63,3% pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji 3,75  $\mu$ l/ml. Također, utvrđeno je da oleuropein inhibira oksidativna oštećenja uzrokovana s  $H_2O_2$  od 73,7% pri koncentraciji 555  $\mu$ M. U istoj studiji, ekstrakt maslinova lista i oleuropein su također pokazali citotoksični učinak na leukemijskim HL60 stanicama, pri koncentraciji 10  $\mu$ l/ml za ekstrakt i 170  $\mu$ M za oleuropein. Mehanizam navedenog citotoksičnog učinka je bio apoptotički s karakterističnim DNAfragmentima u obliku ljestvi („DNA ladder“) te citoplazmatskim i jezgrenim promjenama (Anter i sur., 2011). Zaštitni učinci ekstrakta maslinova lista i njegovih sastavnica poput oleuropeina mogu se objasniti mehanizmima poput blokiranja aktivacije karcinogena, povećanjem razine enzima uključenih u detoksifikaciju karcinogena (glutation S-transferaze), stimulacije točnih („error free“) DNA popravaka i sprječavanja reakcije karcinogena s DNA. U literaturi je opisano da oleuropein inducira aktivaciju kaspaza *in vitro* (Han i sur., 2009; Lee i sur., 2010). Ovaj proces smatra se neophodnim za indukciju programirane stanične smrti. Navedena obitelj cistein proteaza ima djelovanje na ključne stanične proteine, poput proteina citoskeleta, što dovodi do karakterističnih morfoloških promjena uočenih kod stanica u apoptozi.

Hidroksitirozol je pokazao protektivni učinak protiv oksidativnog DNA oštećenja induciranog peroksinitritom ( $ONOO^-$ ) na stanicama neuralnog hibridoma pri koncentracijama 0,25 – 1,0 mmol/l (Deiana i sur., 1999). Quiles i sur. (2002) su utvrdili da hidroksitirozol pokazuje protektivni učinak (25 %) na humanim stanicama raka prostate pri koncentraciji 10  $\mu$ mol/l. Iako je pokazao antioksidativno djelovanje protiv  $H_2O_2$ -induciranog oštećenja, navedeni fenol nije imao učinak na staničnu smrt induciranu superoksid anionom. Kad je oštećenje nastalo kao posljedica djelovanja  $H_2O_2$ , zaštitno djelovanje različitih fenola, osobito hidroksitirozola je odražavalo njihov antioksidativni potencijal utvrđen DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) testom. Također, ispitivan je učinak ovog fenola (50  $\mu$ M) na  $H_2O_2$ -inducirano oksidativno oštećenje (200  $\mu$ M, 20 min na 37°C) provedeno na cjelovitim krvnim stanicama atipičnim kometnim testom. Pri testiranoj koncentraciji, hidroksitirozol je pokazao zaštitni učinak protiv oksidativnog oštećenja DNA (Grasso i sur., 2006).

U testu citotoksičnosti rađenom u sklopu ovog istraživanja, oleuropein i hidroksitirosol nisu pokazali hemolitičku aktivnost na humanim eritrocitima *ex situ* u rasponu koncentracija 3 – 60  $\mu\text{M}$  (1,6 – 32,4  $\mu\text{g/ml}$  za oleuropein i 0,46 – 9,2  $\mu\text{g/ml}$  za hidroksitirosol).

Također pri koncentracijama navedenih tvari od 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  provedeno je ispitivanje protektivnog učinka oleuropeina i hidroksitirosola na humanim limfocitima periferne krvi čovjeka kometnim testom odnosno mikroelektroforezom (Slike 48 – 51; Tablice 9 – 12; Tablice ST1 – ST5). Ispitivane koncentracije oleuropeina i hidroksitirosola nisu bile toksične i navedene tvari nisu imale genotoksični učinak na limfocitima. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da oba spoja imaju zaštitni učinak protiv  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induciranog oštećenja DNA.  $\text{H}_2\text{O}_2$  stvara oštećenja DNA putem mehanizama kisikovih radikala i inducira kromosomske aberacije, mutacije gena, i jednolančane lomove u DNA molekuli. Teški metali (željezo, bakar, kromij, vanadij) predstavljaju važnu grupu toksikanata koji mogu generirati visoko toksični hidroksilni radikal preko Fenton reakcije:



Nastali hidroksilni radikali su jako reaktivni i stvaraju direktna oštećenja DNA (Aherne i sur., 2009). Količina hidroksilnog radikala nastalog u stanici ovisi o endogenom stvaranju ROS molekula, ali i o količini reduciranih metalnih iona potrebnih za Fenton reakciju (Gosslau, 2016). Dodatno je rađena kontrola u kojoj je korišten bleomicin kao mutagen budući da uzrokuje jednolančane i dvolančane lomove DNA molekula. Za *in vitro* procjenu genotoksičnosti, primjena staničnih modela daje širu sliku u usporedbi s primjenom jednostavnih biokemijskih testova. S obzirom da postoji jaka korelacija između genotoksičnosti i karcinogenosti, cilj ovog rada je bio ispitati djelovanje jakih antioksidansa oleuropeina i hidroksitirosola na oksidativno oštećenje DNA. Kometni test se često koristi u analizama genotoksičnosti. To je vrlo osjetljiva metoda za detekciju lomova u DNA molekuli kod stanica sisavaca. Ovim ispitivanjem utvrđuju se tri parametra, i to dužina repa kometa koja predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNA; intenzitet repa koji označava postotak DNA koja je migrirala u rep; i repni moment koji se definira kao umnožak dužine repa i postotka DNA u repu (Singh i sur., 1988). Kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati, provodi se analiza više parametara. Navedeni lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica nekovalentne DNA interakcije i interferencije mutagena s kritičnim enzimima poput DNA topoizomeraze i DNA polimeraze (Gosslau, 2016).

Protektivni učinci fenolnih spojeva poput oleuropeina i hidroksitirosola protiv oksidativnog DNA oštećenja induciranog s  $\text{H}_2\text{O}_2$  dovode se u svezu s njihovim antioksidativnim potencijalom i učinkom na uništavanje slobodnih radikala. U usporedbi s oleuropeinom,

hidroksitirozol je pokazao bolji protektivni učinak protiv H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induciranog oksidativnog DNA oštećenja (5 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 min na 37°C) na limfocitima periferne krvi pri ispitivanim koncentracijama (1, 5 i 10 μM). Ovaj spoj je inkorporiran u aglikon oleuropeina i oslobađa se hidrolizom iz navedenog glikozida tijekom skladištenja i prešanja maslina uslijed djelovanja staničnih esteraza ili kisele katalize. Bolji zaštitni učinak koji pokazuje hidroksitirozol u skladu je s literaturnim podacima (Foti i sur., 2001), prema kojima su orto-difenoli učinkovitiji antioksidansi u usporedbi s jednostavnim fenolima zbog stabilizacije fenoksi-radikala preko vezanja vodika.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenih istraživanja u uvjetima *in vitro*, statističke obrade rezultata te rasprave mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- U *in vitro* uvjetima oleuropein ima antifungalno djelovanje protiv oportunističke gljivične vrste *C. albicans* s minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) od 12,5 mg/ml. Razgradni produkt oleuropeina, hidroksitirosol, također pokazuje u *in vitro* uvjetima antifungalno djelovanje s nižom minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) u odnosu na oleuropein koja iznosi 6,25 mg/ml. Vodeni ekstrakt maslinova lista pokazao je učinak na staničnu vijabilnost vrste *C. albicans* iako pri većoj koncentraciji (25 mg/ml) u usporedbi s fenolnim tvarima oleuropeinom i hidroksitirosolom. HPLC analizom utvrđeno je da je najzastupljeniji spoj u ekstraktu koji je korišten u ispitivanjima bio oleuropein (9,281 ± 0,185 g tirosole/100 g suhog ekstrakta).
- Morfološke promjene u jezgri kandida nakon bojanja s fluorescentnim DNA-vezujućim bojama upućuju na zaključak da je apoptoza primarni način stanične smrti u uzorcima tretiranim sa subinhibitornim koncentracijama (sub-MIK) oleuropeina, hidroksitirosola i vodenog ekstrakta maslinova lista.
- Iz rezultata istraživanja proizlazi da ovaj iridoid i njegov razgradni produkt „ciljaju“ virulentne čimbenike neophodne za razvoj gljivične infekcije. Oleuropein i hidroksitirosol utječu na morfogenetičku promjenu i inhibiraju filamentaciju vrste *C. albicans* induciranu u uvjetima staničnog gladovanja primjenom hranjivih podloga s N-acetil-D-glukozaminom kao jedinim izvorom ugljika te Spiderovog medija koji sadrži manitol kao izvor ugljika. Test ispitivanja hidrofobnosti (CSH) pokazao je da oleuropein i hidroksitirosol pri sub-MIK koncentracijama (48,83 i 97,6 µg/ml za oleuropein i 390,4 µg/ml za hidroksitirosol) značajno smanjuju staničnu površinsku hidrofobnost vrste *C. albicans*, čimbenik koji se dovodi u svezu s adherencijom na epitelne stanice. Ispitivane tvari također inhibiraju hidrolitičke enzime pri ispitivanim koncentracijama (2 MIK, MIK i ½ MIK) koje luči vrsta *C. albicans*, α-glukozidaze i aspartil-proteaze (Sap) za koje je utvrđeno da su povezane s patogenošću gljivice *C. albicans*.
- Oleuropein i hidroksitirosol uzrokuju koncentracijski-ovisno smanjenje u ukupnom sadržaju sterola u membrani stanica vrste *C. albicans* što upućuje na zaključak da ove

tvari imaju mehanizam djelovanja putem oštećenja stanične membrane što posljedično dovodi do uništenja membranskog integriteta. Ispitivanje učinka na staničnu permeabilnost određivanog posrednim ispitivanjem otpuštanja unutarstaničnog sadržaja ukazalo je na koncentracijsko-ovisno (1,25 mg/ml – 50 mg/ml za oleuropein i 0,625 mg/ml – 25 mg/ml za hidroksitirozol) djelovanje ovih fenolnih tvari na otpuštanje citoplazmatskog sadržaja. Tretiranjem vrste *C. albicans* s oleuropeinom kao i hidroksitirozolom utvrđeno je višestruko djelovanje obje tvari, uključujući oštećenja stanične stijenke, stanične membrane, kao i djelovanja na citoplazmatski sadržaj te depolarizaciju mitohondrijske membrane.

- Ispitivanjem djelovanja ovih fenolnih tvari na staničnu vijabilnost bakterijskih vrsta roda *Lactobacillus* spp., koje su dio zdrave mikrobiote čovjeka i koje kompetitivno inhibiraju rast drugih štetnih mikroorganizama, utvrđene su značajno više koncentracije ispitivanih spojeva potrebne za 50% redukcije staničnog rasta u usporedbi s inhibitornim koncentracijama potrebnim za smanjenje stanične vijabilnosti oportunističkog patogena *C. albicans* što podupire potencijalnu profilaktičku primjenu ovih tvari za rodnicu.
- U testu citotoksičnosti oleuropein i hidroksitirozol nisu pokazali hemolitičku aktivnost na humanim eritrocitima *ex situ* pri testiranim koncentracijama u rasponu 3-60  $\mu\text{M}$  (1,6 – 32,4  $\mu\text{g/ml}$  za oleuropein i 0,46 – 9,2  $\mu\text{g/ml}$  za hidroksitirozol).
- Ispitivanjem genotoksičnog potencijala oleuropeina i hidroksitirosola na humanim limfocitima periferne krvi kometnim testom pri koncentracijama u rasponu 1-10  $\mu\text{M}$  (0,54 – 5,4  $\mu\text{g/ml}$  za oleuropein i 0,15 – 1,5  $\mu\text{g/ml}$  za hidroksitirozol) utvrđeno je da ispitivani spojevi nemaju potencijal za stvaranje lomova u DNA. Pri navedenim koncentracijama u kombinaciji s vodik peroksidom ove tvari pokazale su niže vrijednosti promatranih parametara kometnog testa (dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment) u usporedbi s uzorkom koji je izlagan samo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , što upućuje na protektivni učinak oleuropeina i hidroksitirosola protiv  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induciranog oštećenja DNA. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je pri svim testiranim koncentracijama hidroksitirozol pokazao bolji protektivni učinak u usporedbi s oleuropeinom.

- Određivanje antioksidativne aktivnosti oleuropeina i hidroksitirosola ABTS metodom koja se zasniva na redukciji generiranog  $\text{ABTS}\cdot^+$  radikala nakon dodatka antioksidansa pokazalo je da navedene tvari imaju jako antioksidativno djelovanje, i to oleuropein:  $0,311 \pm 0,009$  mM ekvivalenata Troloxa/  $\mu\text{M}$  OLP, a hidroksitirosol:  $0,486 \pm 0,001$  mM ekvivalenata Troloxa/  $\mu\text{M}$  HT. Mjerenje aktivnosti navedenih antioksidansa na redukciju metalnih iona provedeno je FRAP metodom pri čemu je oleuropein pokazao učinak:  $0,233 \pm 0,005$  mM  $\text{Fe}^{2+}$ /  $\mu\text{M}$  OLP, a hidroksitirosol:  $0,407 \pm 0,019$  mM  $\text{Fe}^{2+}$ /  $\mu\text{M}$  HT te CUPRAC metodom s kojom je utvrđena aktivnost  $0,098 \pm 0,001$  mM ekvivalenata Troloxa/  $\mu\text{M}$  OLP za oleuropein i  $0,134 \pm 0,002$  mM ekvivalenata Troloxa/  $\mu\text{M}$  HT za hidroksitirosol.
- Rezultati modulacije u *in vitro* uvjetima pod utjecajem oleuropeina i hidroksitirosola na vrsti *C. albicans* proširili su spoznaje o antifungalnom učinku navedenih biljnih tvari usmjerenom na staničnu vijabilnost i virulentne čimbenike ove medicinski značajne gljivične vrste, kao i spoznaje o mehanizmu njihovog fungicidnog učinka. Osim direktnog djelovanja na oportunističku gljivičnu vrstu, utvrđeno je da oleuropein i hidroksitirosol imaju i druge biološke učinke, prvenstveno antioksidativno i antigenotoksično djelovanje, što bi u uvjetima *in vivo* moglo doprinijeti bržem povratku nositelja u stanje homeostaze.

## **7. LITERATURA**



- Aherne SA, O'Brien NM. Protection by the flavonoids myricetin, quercetin and rutin, against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutr Cancer*, 1999, 34(2), 160-166.
- Al-Azzawie HF, Alhamdani MS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci*, 2006, 78, 1371-1377.
- Alagna F, Mariotti R, Panara F, Caporali S, Urbani S, Veneziani G, Esposito S, Taticchi A, Rosati A, Rao R, Perrotta G, Servili M, Baldoni L. Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biol*, 2012, 12, 162-181.
- Alvarez FJ, Konopka JB. Identification of an N-acetylglucosamine transporter that mediates hyphal induction in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 2007, 18, 965-975.
- Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock RE, Martínez JL. The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to  $\beta$ -lactams. *Virulence*, 2011, 2(2), 144-146.
- Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos DT. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(3), 549-558.
- Andreadou I, Papaefthimiou M, Zira A, Constantinou M, Sigala F, Skaltsounis AL, Tsantili-Kakoulidou A, Iliodromitis EK, Kremastinos DT, Mikros E. Metabonomic identification of novel biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity and protective effect of the natural antioxidant oleuropein. *NMR Biomed*, 2009, 22(6), 585-592.
- Anonimno. The Candida Diet. [Online]. Dostupno na: <https://www.thecandidadiet.com/olive-oil> [23.02.2017].
- Anonimno. Microbiology in Pictures. [Online]. Dostupno na: <http://www.microbiologyinpictures.com> [23.02.2017].
- Anter J, Fernández-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Demyda-Peyras S, Moreno-Millán M, Alonso-Moraga A, Muñoz-serrano A, Luque de Castro MD. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutat Res*, 2011, 723(2), 165-170.
- Anwar-Khan P, Malik A, Subhan Khan H. Profile of candidiasis in HIV infected patients. *Iran J Microbiol*, 2012, 4(4), 204-209.
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J Agric Food Chem*, 1986, 34(5), 823-826.
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 1989, 28(1), 67-69.

- Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. Novel total antioxidant index for dietary polyphenols and vitamin C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*, 2004, 52, 7970-7981.
- Arthington-Skaggs BA; Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(10), 3332-3337.
- Ashman RB, Bolitho EM, Papadimitriou JM. Patterns of resistance to *Candida albicans* in inbred mouse strain. *Immunol Cell Biol*, 1993, 71, 221-225.
- Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(8), 1900-1905.
- Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*, 1999, 48(7), 671-679.
- Bal AM. The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35(1), 13-18.
- Barelle CJ, Bohula EA, Kron SJ, Wessels D, Soll DR, Schäfer A, Brown AJ, Gow NA. Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 2003, 2(3), 398-410.
- Belloch C, Querol A, García MD, Barrio E. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50, 405-416.
- Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*, 2000, 68, 457-462.
- Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M. Radioprotective effects *in vivo* of phenolics extracted from *Olea europaea* L. against X-ray-induced chromosomal damage. Comparative study versus several flavonoids and sulphur-containing compounds. *J Med Food*, 2002, 5, 125-135.
- Bennani-Kabchi N, Fdh IH, Cherrah Y. Effects of *Olea europaea* var *oleaster* leaves in hypocholesterolemic insulin resistant rats. *Therapie*, 1999, 54, 717-723.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 1996, 239(1), 70-76.
- Bester D, Esterhuyse AJ, Truter EJ, van Rooyen J. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutr Res Rev*, 2010, 23(2), 334-348.
- Bianco AD, Muzzalupo I, Piperno A, Romeo G, Uccella N. Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruits. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(9), 3531-3534.

- Bianco A, Uccella N. Biophenolic components of olives. *Food Res Int*, 2000, 33, 475-485.
- Bianco A, Jensen SR, Olesen J, Passacantilli P, Ramunno A. Acid rearrangement of secoiridoids related to oleuropein and secologanin. *Eur J Org Chem*, 2003, 2003(22), 4349-4354.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A: On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51, 971-974.
- Biswas S, Roy M, Datta A. N-acetylglucosamine-inducible CaGAP1 encodes a general amino acid permease which co-ordinates external nitrogen source response and morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology*, 2003, 149(9), 2597-2608.
- Bliska JB, Casadevall A. Intracellular pathogenic bacteria and fungi – a case of convergent evolution? *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7, 165-171.
- Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, 2007, 190, 181-186.
- Bondaryk M, Kurzatkowski W, Staniszevska M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postepy Dermatol Alergol*, 2013, 30(5), 293-301.
- Borg-von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Wurzner R, Sanglard D, Telenti A, Monod M. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains, 1999, *J Invest Dermatol*, 113, 747-751.
- Bouaziz M, Fki I, Jemai H, Sayadi S. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chem*, 2008, 108(1), 253-262.
- Bramono K, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Jpn J Infect Dis*, 2006, 59, 73-76.
- Brennan B, Leyden JJ. Overview of topical therapy for common superficial fungal infections and the role of new topical agents. *J Am Acad Dermatol*, 1997, 36(2), 3-8.
- Briante R, Febbraio F, Nucci R. Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the mediterranean diet. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(24), 6975-6981.
- Brinkman V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, 303(5663), 1532-1535.

- Brown AJP, Odds FC, Gow NAR. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10, 307-313.
- Brunke S, Mogavero S, Kasper L, Hube B. Virulence factors in fungal pathogens of man. *Curr Opin Microbiol*, 2016, 32, 89-95.
- Cai J, Roberts IN, Collins MD. Phylogenetic relationship among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(2), 542-549.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 2001, 9(7), 327-335.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(2), 291-321.
- Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, Merino P, Campos-Herrero I, Marco F, Gomez G. de la Pedrosa E, Yagüe G, Guna R, Rubio C, Miranda C, Pazos C, Velasco D, FUNGEMYCA Study Group. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(12), 5590-5596.
- Capozzi F, Piperno A, Uccella N. Oleuropein site selective hydrolysis by technomimetic nuclear magnetic resonance experiments. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5), 1623-1629.
- Casadevall A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol Rev*, 2007, 21, 130-132.
- Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun*, 1999, 67(8), 3703-3713.
- Casadevall A, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2003, 1(1), 17-24.
- Casadevall A, Pirofski L. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe*, 2012, 11, 447-456.
- Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis*, 1987, 156(5), 777-783.
- Cassone A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11, 884-891.

- Caturla N, Perez-Fons L, Estepa A, Micol V. Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem Phys Lipids*, 2005, 137, 2-17.
- Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(1), 130-138.
- Chai LY, Netea MG, Vonk AG, Kullberg NJ. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Med Mycol*, 2009, 47, 227-236.
- Cheng SC, Joosten LAB, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun*, 2012, 80(4), 1304-1313.
- Chinou I. Assessment Report on *Olea europaea* L., folium. [Online]. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-HMPC\\_assessment\\_report/2012/04/WC500125459.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-HMPC_assessment_report/2012/04/WC500125459.pdf) [23.02.2017.]
- Cho J, Lee DG. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochimie*, 2011, 93(10), 1873-1879.
- Cicerale S, Lucas LJ, Keast RS. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(2), 129-135.
- Clancy CJ, Barchiesi F, Falconi D, Francesco L, Morris AJ, Snyderman DR, Yu VL, Scalise G, Nguyen MH. Clinical manifestations and molecular epidemiology of late recurrent candidemia, and implications for management. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000, 19, 585-592.
- Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(9), 541-548.
- Cole GT, Seshan KR, Phaneuf M, Lynn KT. Chlamyospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Can J Microbiol*, 1991, 37(8), 637-646.
- Colombo AL, Guimarães. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2003, 36(5), 599-607.
- Costa E, Silva S, Tavarina F, Pintado M. Antimicrobial and antibiofilm activity of chitosan on the oral pathogen *Candida albicans*. *Pathogens*, 2014, 3, 908-919.
- Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessi MA, Spencer JP. Hydroxytyrosol inhibits the proliferative of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(7), 897-903.

- Crues WV, Alsberg CL. The bitter glucoside of the olive. *J Amer Chem Soc*, 1934, 56, 2115-2117.
- Cullen PJ, Sprague GF. The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics*, 2012, 190, 23-49.
- Damtoft S, Franzyk H, Jensen SR. Biosynthesis of secoiridoid glucosides in *Oleaceae*. *Phytochemistry*, 1993, 34, 1291-1299.
- Damtoft S, Franzyk H, Jensen SR. Biosynthesis of secoiridoids in *Syringa* and *Fraxinus*. Secoiridoid precursors. *Phytochemistry*, 1995, 40, 773-784.
- De Bernardis F, Boccanera M, Rainaldi L, Guerra CE, Quinti I, Cassone A. The secretion of aspartyl proteinase, a virulence enzyme, by isolates of *Candida albicans* from the oral cavity of HIV-infected subjects. *Eur J Epidemiol*, 1992, 8(3), 362-367.
- De Hoog GS, Smith MT, Blastobotrys von Klopotek. In: Kurtzman CP, Fell JW eds. The Yeasts, A taxonomic study. 4th ed. Amsterdam: Elsevier B.V., pp. 443-448.
- Deiana M, Aruoma OI, Spencer JP, Kaur H, Halliwell B, Aeschbach R, Dessi MA, Corongiu FP. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Rad Biol Med*, 1999, 26, 762-769.
- de Nicoló S, Tarani L, Ceccanti M, Maldini M, Natella F, Vania A, Chaldakov GN, Fiore M. Effects of olive polyphenols administration on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the mouse brain. *Nutrition*, 2013, 29(4), 681-687.
- Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*, 2003, 362(9390), 1142-1151.
- Dostal J, Hamal P, Pavličková L, Souček M, Ruml T, Pichova I, Hrušková-Heidingsfeldova O. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(2), 712-716.
- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, 2003, 11(1), 30-36.
- Dühring S, Germerodt S, Skerka C, Zipfel PF, Dandekar T, Schuster S. Host-pathogen interactions between the human innate immune system and *Candida albicans* – understanding and modeling defense and evasion strategies. *Front Microbiol*, 2015, 6, 625.
- Dupont B. Overview of lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49(1), 31-36.
- El SN, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Rev*, 2009, 67(11), 632-638.

Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *Candida albicans*. *J Oral Pathol Med*, 1998, 27(5), 213-219.

European Pharmacopoeia 8.0. Olive leaf. 01/2009:1878.

European Pharmacopoeia 8.0. Olive leaf dry extract. 04/2009:2313.

European Medicines Agency – Committee on Herbal Medicinal Products. (2011). Assessment Report on *Olea europaea* L., folium. [Online]. Dostupno na: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal\\_med\\_000141.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal_med_000141.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d). [15. 02. 2017.].

Ene IV, Brunke S, Brown AJP, Hube B. Metabolism in Fungal Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(12), a019695.

Erdős M, Maródi L, Johnston RB. Host defense mechanisms against fungi. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW eds. *Fetal and Neonatal Physiology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, Inc., 2017, pp. 1171-1174e2.

Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan DJ. *In vitro* antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. *Mycopathologia*, 2001, 150, 101-115.

EUCAST E.DEF 7.3. (2015). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. [Online]. Dostupno na: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Files/EUCAST\\_E\\_Def\\_7\\_3\\_Yeast\\_testing\\_definitive.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_Yeast_testing_definitive.pdf). [15. 02. 2017.].

Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr*, 2008, 138(8), 1411-1416.

Fabiani R, Fuccelli R, Pieravanti F, De Bartolomeo A, Morozzi G. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(7), 887-896.

Faux JA, Aqbarakwe AE, Misbah SA, Chapel HM. A comparison of specific IgG antibody levels to the cell wall mannan of *Candida albicans* in normal individuals and in patients with primary antibody deficiency. *J Immunol Methods*, 1992, 153(1-2), 167-172.

Fazly A, Jain C, Dehner AC, Issi L, Lilly EA, Ali A, Cao H, Fidel PL, Rao RP, Kaufman PD. Chemical screening identifies filastatin, a small molecule inhibitor of *Candida albicans* adhesion, morphogenesis, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(33), 13594-13599.

- Fehri B, Alache JM, Mrad S, Korbi S, Lamaison JL. *Olea europaea* L.: stimulant, anti-ulcer and anti-inflammatory effects. *Boll Chim Pharm*, 1996, 135(1), 42-49.
- Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem*, 2012, 130(4), 797-813.
- Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9, 109-118.
- Fleming HP, Walter WM, Etechells JL. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis. *Appl Microbiol*, 1973, 26(5), 777-782.
- Fortwendel JR, Juvvadi PR, Pinchai N, Perfect BZ, Alspaugh JA, Perfect JR, Steinbach WJ. Differential effects of inhibiting chitin and 1,3- $\beta$ -D-glucan synthesis in RAS and calcineurin mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, 476-482.
- Franzyk H, Jensen SR, Olsen CE. Iridoid glucosides from *Myxopyrum smilacifolium*. *J Nat Prod*, 64, 632-633.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 2007, 176(2), 231-241.
- Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*, 2007, 44(12), 1336-1341.
- Gariboldi P, Jommi G, Verotta L. Two new secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 1986, 25, 865-869.
- Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today*, 2009, 14(3/4), 214-222.
- Ghannoum MA, Elewski B. Successful treatment of fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis by a combination of fluconazole and terbinafine. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, 6(6), 921-923.
- Ghannoum MA, Kuhn DM. Voriconazole – better chances for patients with invasive mycoses. *Eur J Med Res*, 2002, 7(5), 242-256.
- Grange JM, Davey RW. Detection of antituberculous activity in plant extracts. *J Appl Bacteriol*, 1990, 68(6), 587-591.



- Gómez-Alonso S, Mancebo-Campos V, Salvador MD, Fregapane G. Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chem*, 2007, 100, 36-42.
- Gong D, Geng C, Jiang L, Cao J, Yoshimura H, Zhong L. Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytother Res*, 2008, 23 (5), 646-650.
- Gonzales M, Zarzuelo A, Gamez MJ, Utrilla MP, Jimenez J, Osuna I. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med*, 1992, 58, 513-515.
- González-Correa JA, Navas MD, Muñoz-Marin J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17), 7872-7876.
- Gossiau A. Assessment of food toxicology. *Food Science and Human Wellness*, 2016, 5(3), 103-115.
- Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, Gerotheranassis IP. Phytochemicals in olive-leaf extract and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53, 600-608.
- Goulas V, Pantelis C, Gerotheranassis I, George AM. Classification, biotransformation and antioxidant activity of olive fruit biophenols: A review. *Curr Bioact Compd*, 2012, 8(3), 232-239.
- Grasso S, Siracusa L, Spatafora C, Tringali C. Hydroxytyrosol lipophilic analogues: enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorg Chem*, 2007, 35(2), 137-152.
- Grop K, Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol*, 2009, 47(2-3), 465-475.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12(3), 454-500.
- Gunasekera A, Alvarez FJ, Douglas LM, Wang HX, Rosebrock AP, Konopka JB. Identification of GIG1, a GlcNAc-induced gene in *Candida albicans* needed for normal sensitivity to the chitin synthase inhibitor nikkomycin Z. *Eukaryot Cell*, 2010, 9, 1476-1483.
- Gutierrez-Rosales F, Romero MP, Casanovas M, Motilva MJ, Minguez-Mosquera MI. Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea*

- europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 12924-12933.
- Hail N. Mitochondria: a novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis*, 2005, 10(4), 687-705.
- Hall A, Poole L, Renton B, Wozniak A, Fisher M, Neal T, Halloran CM, Cox T, Hampshire PA. Prediction of invasive candidal infection in critically ill patients with severe acute pancreatitis. *Crit Care*, 2013, 17, R49.
- Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334, 769-778.
- Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*, 2009, 59(1), 45-53.
- Hansen K, Adersen A, Christensen SB, Jensen SR, Nyman U, Smitt UV. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ALE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine*, 1996, 2, 319-325.
- Harcus D, Nantel A, Marcil A, Rigby T, Whiteway M. Transcription Profiling of cyclic AMP signaling in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(10), 4490-4499.
- Harriot MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol*, 2011, 19, 557-563.
- Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect*, 2009, 11(8-9), 753-761.
- Hashmi MA, Khan A, Hanif M, Farooq U, Perveen S. Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015, 29.
- Hassen I, Casabianca H, Hosni K. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: exceeding the expectation-a mini-review. *J Funct Foods*, 2015, 18, 926-940.
- Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida albicans* on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun*, 1994, 62, 915-921.
- Hazen KC, Cutler JE. Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1979, 24(3), 661-666.
- Hazen KC, Brawner DL. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissue. *Infect Immun*, 1991, 59(3), 907-912.
- Hazen KC. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: an *in vitro* comparison. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 38(5), 37-41.

- Hernandez S, López-Ribot JL, Najvar LK, McCarthy DI, Bocanegra R, Graybill JR. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(4), 1382-1383.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castebury LA; Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, 2007, 111(5), 509-547.
- Höfling JF, Mardegan RC, Anibal PC, Furletti VF, Foglio MA. Evaluation of antifungal activity of medicinal plants extracts against oral *Candida albicans* and proteinases. *Mycopathologia*, 2011, 172(2), 117-124.
- Hogan DA, Kolter R. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*, 2002, 296(5576), 2229-2232.
- Hoegl L, Ollert M, Korting HC. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. *J Mol Med*, 1996, 74, 135-142.
- Hovi L, Saarinen-Pihkala UM, Vettenranta K, Saxen H. Invasive fungal infections in pediatric bone marrow transplant recipients: single center experience of 10 years. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 26, 999-1004.
- Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA; Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(12), 1695-1703.
- Hostetter MK. RGD-mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3, 344-348.
- Hrvatska enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža. Gljive. [Online]. Dostupno na: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=22411> [23.02.2017.].

- Hrvatska enciklopedija Leksikografskog zavoda Miroslav Krleža. Maslina. [Online]. Dostupno na: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=39294> [23.02.2017.].
- Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, 2001, 147(8), 1997-2005.
- Huffnagle GB, Noverr MC. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol*, 2013, 21, 334-341.
- Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1995, 63(5), 1993-1998.
- Ingham CJ, Boonstra S, Levels S, de Lange M, Meis JF, Scheneberger PM. Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide. *PLoS ONE*, 2012, 7, e33818.
- IOOC – International Olive Oil Council COI/T.20/Doc.29. (2009). Determination of biophenols in olive oils by HPLC. [Online]. Dostupno na <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/224-testing-methods>. [15. 02. 2016.].
- Ishida K, de Mello JC, Cortez DA, Filho BP, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58(5), 942-949.
- Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, Aslett M, Barrell JF, Butler G, Citiulo F, Coleman DC, de Groot PW, Goodwin TJ, Quail MA; McQuillan J, Munro CA, Pain A, Poulter RT, Rajandream MA, Renauld H, Spiering MJ, Tivey A, Gow NA, Barrell B, Sullivan DJ, Berriman M. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res*, 2009, 19(12), 2231-2244.
- James SA, Collins MD, Roberts IN. Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Yeast*, 1994, 10, 871-881.
- James SA, Collins MD, Roberts IN. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46, 189-194.
- James SA, Cai J, Roberts IN, Collins MD. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47, 453-460.

- Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*, 2006, 35, 484-491.
- Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivate-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 176, 88-98.
- Jensen SR, Franzyk H, Wallander E. Chemotaxonomy of the *Oleaceae*: Iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*, 2002, 60(3), 213-231.
- Kadosh D, Johnson AD. Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(6), 2903-2912.
- Kailis SG. Olives. In: Murray TB, Murphy DJ eds. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 2nd ed. London: Elsevier Ltd., 2017, 3, 236-245.
- Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(1), 120-128.
- Karabag-Coban F, Hazman O, Bozkurt MF, Ince S. Antioxidant status and anti-inflammatory effects of oleuropein in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *European J Med Plants*, 2017, 18(2), 1-10.
- Kawaguchi Y, Honda H, Taniguchi-Morimura J, Iwasaki S. The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature*, 1989, 341(6238), 164-166.
- Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Einsele H. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett*, 1997, 400(1), 80-82.
- Khan Y, Panchal S, Vyas N, Butani A, Kumar V. *Olea europaea*: A phyto-pharmacological review. *Pharmacogn Rev*, 2007, 1(1), 114-118.
- Khan MSA, Ahmad I, Cameotra SS. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. *AMB Express*, 2013, 3, 54.
- Khatab OKH, El-Nasr AA, Haggag M, Samir W. Biological activity of extracts from olive and basil leaves against pathogenic microbial isolates. *Egypt J Med Microbiol*, 2015, 24(2), 1-9.

- Khot PD, Suci PA, Miller RL, Nelson RD, Tyler BJ. 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(11), 3708-3716.
- Kisand K, Lilic D, Casanova JL, Peterson P, Meager A, Willcox N. Mucocutaneous candidiasis and autoimmunity against cytokines in APECED and thymoma patients: clinical and pathogenic implications. *Eur J Immunol*, 2011, 41, 1517-1527.
- Klis FM, de Groot P, Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol*, 2001, 39(1), 1-8.
- Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbial Infect Dis*, 2007, 59(4), 401-406.
- Kobayashi S, Kazumitsu U, Komano T. The effects of metal ions on the DNA damage induced by hydrogen peroxide. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(1), 69-76.
- Koh AY, Köhler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N, Pier GB. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog*, 2008, 4(2), e35.
- Kosalec I, Pepeljnjak S, Matica B, Jarža-Davila N. Virulentni čimbenici gljivice vrste *Candida albicans*. *Farmaceutski glasnik*, 2005, 61(6), 381-396.
- Kosalec I, Puel O, Delaforge M, Kopjar N, Antolović R, Jelić D, Matica B, Galtier P, Pepeljnjak S. Isolation and cytotoxicity of low-molecular-weight metabolites of *Candida albicans*. *Front Biosci*, 2008, 1(13), 6893-6904.
- Kosmidis C, Denning DW. Opportunistic and Systemic Fungi. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM. eds. *Infectious Diseases*. 4th ed. London: Elsevier Ltd., 2017, 2, 1681-1709.
- Kotyzová D, Hodková A, Eybl V. The effect of olive oil phenolics – Hydroxytyrosol and oleuropein on antioxidant defence status in acute arsenic exposed rats. *Toxicol Lett*, 2011, 205, S222.
- Kruppa M, Krom BP, Chauhan N, Bambach AV, Cihlar RL, Calderone RA. The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 2004, 3(4), 1062-1065.
- Kuhn DM, Ghannoum MA. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr Opin Investig Drugs*, 2004, 5(2), 186-197.

- Kuhn DM, Mikherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, Warnock DW, Soil DR, Ghannoum MA. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(6), 1074-1081.
- Kuriyama T, Williams DW, Lewis MA. *In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol*, 2003, 18(6), 405-407.
- Kurtzman CP. Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparison of deoxyribonucleic acid. *Antonie Leeuwenhoek*, 1984, 50, 209-217.
- Kurtzman CP. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and yeast-like taxa. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T eds. *The Yeasts, A taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier B.V., 2010, 13, 293-307.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaromyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*, 1991, 7, 61-72.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek*, 1998, 73, 331-371.
- Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E. Phylogenetic relationship among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene phylogenetic analysis and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res*, 2008, 8, 939-954.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. Systematics of methanol assimilating yeasts and neighboring taxa from multigene sequence analysis and the proposal of *Peterozyma* gen. nov., a new member of the *Saccharomycetales*. *FEMS Yeast Res*, 2010, 10, 353-361.
- Kurtzman CP, Suzuki M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*, 2010, 51, 2-14.
- Kuwajima H, Morita M, Takaishi K, Inoue K, Fujita T, He ZD, Yang CR. Secoiridoid, coumarin and secoiridoid-coumarin glucosides from *Fraxinus chinensis*. *Phytochemistry*, 1992, 31, 1277-1280.
- Lamy S, Ouanouki A, Béliveau R, Desrosiers RR. Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Exp Cell Res*, 2014, 322(1), 89-98.
- Langford ML, Atkin AL, Nickerson KW. Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by *Candida albicans*. *Future Microbiol*, 2009, 4(10), 1353-1362.

- Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK, Retuerto M, Salem I, Long L, Isham N, Kovanda L, Borroto-Esoda K, Wring S, Angulo D, Ghannoum M. The emerging *Candida auris*: characterization of growth phenotype, virulence factors, antifungal activity, and effect of SSCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017.
- Larson JL, Wallace TL, Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Cossum PA. The reproductive and developmental toxicity of the antifungal drug Nyotran (liposomal nystatin) in rats and rabbits. *Toxicol Sci*, 2000, 53(2), 421-429.
- Lasker BA, Elie CM, Lott TJ, Espinel-Ingroff A, Gallagher L, Kuykendall RJ, Kellum ME, Pruitt WR, Warnock DW. Molecular epidemiology of *Candida albicans* strains isolated from the oropharynx of HIV-positive patients at successive clinic visits. *Med Mycol*, 2001, 39, 341-352.
- Lavelli V, Fregapane G, Salvador MD. Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity and monovarietal extra virgin olive oils. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(8), 3002-3007.
- Laursen NS, Magnani F, Gottfredsen RH, Petersen SV, Andersen GR. Structure, function and control of complement C5 and its proteolytic fragments. *Curr Mol Med*, 2012, 12, 1083-1097.
- Lee OH, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour Technol*, 2010, 1018(10), 3751-3754.
- Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, Chang YT, Huang PL. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307, 1029-1037.
- LeFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(11), 3839-3846.
- Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vittulo J, Fonzi W, Mirbod F, Nakashima S, Nozawa Y, Ghannoum MA. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 1998, 273(40), 26078-26086.
- Le Tutour B, Guedon D. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochem*, 1992, 31(4), 1173-1178.
- Lewis JS, Graybill JR. Fungicidal versus fungistatic: what's in a word? *Expert Opin Pharmacother*, 2008, 9, 927-935.



- Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 2003, 149(2), 353-362.
- Limiroli R, Consonni R, Ottolina G, Marsilio V, Bianchi G, Zetta L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1995, 1519-1523.
- Lopes G, Pinto E, Andrade PB, Valentão P. Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on *Candida albicans* virulence factor. *PLoS ONE*, 2013, 8(8), e72203.
- Lorenz MC, Fink GR. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 2001, 412(6842), 83-86.
- Loreto ES, Scheid LA, Noqueira CW, Zeni G, Santurio JM, Alves SH. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathologia*, 2010, 169(6), 431-443.
- Loscalzo R, Scarpati ML. A new secoiridoid from olive wastewaters. *J Nat Prod*, 1993, 56(4), 621-623.
- Luo G, Ibrahim AS, Spellberg B, Nobile CJ, Mitchell AP, Fu Y. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. *J Infect Dis*, 2010, 201(11), 1718-1728.
- Luo S, Skerka C, Kurzai O, Zipfel PF. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Immunol*, 2013, 56(3), 161-169.
- MacCallum DM. Massive induction of innate response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(7), 1111-1122.
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 2001, 9(1), 34-39.
- Mahata S, Bharti AC, Shukla S, Tyagi A, Husain SA, Das BC. Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. *Mol Cancer*, 2011, 10(39), 1-14.
- Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun*, 1994, 62(11), 5154-5156.
- Maoz M, Neeman I. Effect of *Inulaviscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*, 2000, 71(3), 479-482.
- Markin D, Duek L, Berdicevsky I. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*, 2003, 46, 132-136.

- Martins HPR, Da Silva MC, Paiva LCF, Svidzinski TI, Consolaro ME. Efficacy of fluconazole and nystatin in the treatment of vaginal *Candida* species. *Acta Derm Venereol*, 2012, 92(1), 78-82.
- Masuoka J, Hazen KC. Differences in the acid-labile component of *Candida albicans* mannan from hydrophobic and hydrophilic yeast cells. *Glycobiology*, 1999, 9(11), 1281-1286.
- Masuoka J, Hazen KC. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. *Infect Immun*, 2004, 72(11), 6230-6236.
- Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet*, 2013, 59(4), 251-264.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 2013, 4(2), 119-128.
- McCullers JA, Vargas SL, Flynn PM, Razzouk BI, Shenep JL. Candidal meningitis in children with cancer. *Clin Infect Dis*, 2000, 31(2), 451-457.
- McKenzie SE, Schreiber AD. Fc gamma receptors in phagocytes. *Curr Opin Hematol*, 1998, 5, 16-21.
- Meiller TF, Hube B, Schild L, Shirtliff ME, Scheper MA, Winkler R, Ton A, Jabra-Rizk MA. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One*, 2009, 4(4), e5039.
- Micol V, Caturla N, Perez-Fons L, Mas V, Perez L, Estepa A. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res*, 2005, 66, 129-136.
- Midkiff J, Borochoff-Porte N, White D, Johnson DI. Small molecule inhibitors of the *Candida albicans* budded-to-hyphal transition act through multiple signaling pathways. *PLoS One*, 2011, 6(9), e25395.
- Mijatović SA, Timotijević GS, Miljković ĐM, Radović JM, Maksimović-Ivanić DD, Dekanski DP, Stošić-Grujičić SD. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *Cancer Ther*, 2011, 128(8), 1955-1965.
- Miramón P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJP, Kurzai O, Hube B. Cellular response of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One*, 2012, 7(12), e52850.
- Mokaddas E, Khan ZU, Ahmad S, Nampoory MRN, Burhamah M. Value of (1-3)- $\beta$ -D glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA detection in the diagnosis of candidaemia. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(10), 1549-1553.

- Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*, 2010, 6(4), e1000886.
- Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AL, Nickerson KW. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(8), 4938-4940.
- Motamedifar M, Nekoelani AA, Mostari A. The effect of hydroalcoholic extract of olive leaves against herpes simplex virus type 1, *Iran J Med Sci*, 2007, 32(4), 222-226.
- Moussian B. The role of GlcNAc in formation and function of extracellular matrices. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, 149, 215-226.
- Mullick A, Elias M, Picard S, Bourquet L, Jovcevski O, Gauthier S, Tuite A, Harakidas P, Bihun C, Massie B, Gros P. Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in a C5-deficient mouse strain. *Infect Immun*, 2004, 72(10), 5868-5876.
- Mullick A, Leon Z, Min-Oo G, Berghout J, Lo R, Daniels E, Gros P. Cardiac failure in C5-deficient A/J mice after *Candida albicans* infection. *Infect Immun*, 2006, 74, 4439-4451.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(3), 400-428.
- Nantel A, Dignard D, Bachewich C, Harcus D, Marcil A, Bouin AP, Sensen CW, Hogues H, van het Hoog M, Gordon P, Rigby T, Benoit F, Tessier DC, Thomas DY, Whiteway M. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(10), 3452-3465.
- Naseem S, Gunasekera A, Araya E, Konopka JB. N-acetylglucosamine (GlcNAc) induction of hyphal morphogenesis and transcriptional responses in *Candida albicans* are not dependent on its metabolism. *J Biol Chem*, 2011, 286, 28671-28680.
- Naseem S, Araya E, Konopka JB. Hyphal growth in *Candida albicans* does not require induction of hyphal-specific gene expression. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(6), 1174-1187.
- Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IR, Svidzinski TI, Kioshima ES. Early state research on antifungal natural product. *Molecules*, 2014, 19, 2925-2956.
- Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*, 2004, 172(6), 3712-3718.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(1), 67-78.

- Nett JE, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, 510-520.
- Nett JE, Sanchez H, Cain MT, Ross KM, Andes DR. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot Cell*, 2011, 10, 1660-1669.
- Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich OM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR, Johnson AD. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, 2012, 148, 126-138.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*, 2010, 51(5), 561-570.
- Obied HK, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Anal Chim Acta*, 2007, 603(2), 176-189.
- Obied HK, Prenzler PD, Robards K. Potent antioxidant biophenols from olive mill waste. *Food Chem*, 2008, 111(1), 171-178.
- Obied HK, Prenzler PD, Omar SH, Ismael R, Servili M, Esposito S, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S. Pharmacology of olive biophenols. In: Fishbein JC, Heilman JM eds. *Advances in Molecular Toxicology*. 1th ed. London: Elsevier Ltd. 2012, 6, 195-241.
- Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*, 2003, 11(6), 272-279.
- Odds FC. In *Candida albicans*, resistance to flucytosine and terbinafine is linked to MAT locus homozygosity and multilocus sequence typing clade 1. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(7), 1091-1101.
- Oh H, Ko EK, Kim DH, Jang KK, Park SE, Lee HS, Kim YC. Secoiridoid glucosides with free radical scavenging activity from the leaves of *Syringa dilatata*. *Phytother Res*, 2003, 17(4), 417-419.
- Oliveras-López MJ, Molina JJ, Mir MV, Rey EF, Martin F, de la Serrana HL. Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr*, 2013, 57, 234-242.
- Ollert MW, Söhnchen R, Korting HC, Ollert U, Bräutigam W. Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun*, 1993, 61(11), 4560-4568.
- Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*, 2010, 78(2), 133-154.

- Onyewu C, Blakenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(3), 956-964.
- Osborne CS, Leitner I, Hofbauer B, Fielding CA, Favre B, Ryder NS. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(6), 2234-2236.
- Palmieri D, Aliakbarian B, Casazza AA, Ferrari N, Spinella G, Pane B, Cafueri G, Perego P, Palombo D. Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction. *Microvasc Res*, 2012, 83(3), 281-289.
- Panizzi L, Scarpati ML, Oriente G. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazzetta Chimica Italiana*, 1960, 90, 1449-1485.
- Parzonko A, Czerwińska ME, Kiss AK, Naruszewicz M. Oleuropein and oleacein may restore biological functions of endothelial progenitor cells impaired by angiotensin II via activation of Nrf2/heme oxygenase-1 pathway. *Phytomedicine*, 2013, 20(12), 1088-1094.
- Pasban-Aliabadi H, Esmaeili-Mahani S, Sheibani V, Abbasnejad M, Mehdizadeh A, Yaghoobi MM. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its component oleuropein. *Rejuvenation Res*, 2013, 16, 134-142.
- Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis*, 2002, 35(9), 1073-1080.
- Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 2007, 12(5), 1153-1162.
- Perrinjaquet-Moccetti T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Bradl B, Aydogan C. Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytother Res*, 2008, 22, 1239-1242.
- Perez-Herrera A, Rangel-Zuñiga OA, Delgado-Lista J, Marin C, Perez-Martinez P, Tasset I, Tunes I, Quintana-Navarro GM, Lopez-Segura F, Luque de Castro MD, Lopez-Miranda J, Camargo A, Perez-Jimenez F. The antioxidants in oils heated at frying temperature, whether natural or added, could protect against postprandial oxidative stress in obese people. *Food Chem*, 2013, 138(4), 2250-2259.
- Petratiene R, Petratis V, Groll AH, Candelario M, Sein T, Bell A, Lyman CA, McMillian CL, Bacher J, Walsh TJ. Antifungal activity of LY303366, a novel echinocandin B, in

- experimental disseminated candidiasis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(9), 2148-2155.
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res*, 1995, 78, 151-160.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(1), 133-163.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*, 2010, 36(1), 1-53.
- Pierce CG, Lopez-Ribot JL. Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opin Drug Discov*, 2013, 8(9), 1117-1126.
- Pires RH, Santos JM, Zaia JE, Martins CHG, Mendes-Giannini MJS. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and *in vitro* evaluation of the use of clinical antifungals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2011, 106(6), 646-654.
- Polke M, Hube B, Jacobson ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol*, 2015, 91, 139-235.
- Price CW, Gayle BF, Phaff HJ. Genome comparison in yeast systematics: Delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiol Rev*, 1978, 42(1), 161-193.
- Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, Wahle KWJ. Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br. J Nutr*, 2002, 88, 225-234.
- Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*, 2004, 76(4), 760-781.
- Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(11), 5459-5463.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(4), 633-638.
- Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*, 2012, 28521.

- Ramage G, Jose A, Sherry L, Lappin DF, Jones B, Williams C. Liposomal amphotericin B displays rapid dose-dependent activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(5), 2369-2371.
- Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot JL. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol*, 2009, 35, 340-355.
- Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R. Virulence factors and antifungal sensitivity pattern of *Candida* Sp. isolated from HIV and TB patients. *Indian J Microbiol*, 2011, 51(3), 273-278.
- Raut J, Rathod V, Karuppayil SM. Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 2010, 51(3), 131-136.
- Re P, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9-10), 1231-1237.
- Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(1), 1-8.
- Ripeau JS, Aumont F, Belhumeur P, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Repentigny L. Effect of the echinocandin caspofungin on expression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases and phospholipase *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(9), 3096-3100.
- Robbins N, Uppuluri P, Nett J, Rajendran R, Ramage G, Lopez-Ribot JL, Andes D, Cowen LE. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathog*, 2011, 7(9), e1002257.
- Rocha BS, Gago B, Barbosa RM, Laranjinha J. Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation. *J Toxicol*, 2009, 265(1-2), 41-48.
- Rodriguez MM, Perez J, Ramos-Cormenzana A, Martinez J. Effect of extracts obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *J Appl Microbiol*, 1988, 64(3), 219-226.
- Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett*, 1980, 9(1), 29-33.
- Rovellini P, Cortesi N. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oils: aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products. *Riv Ital Sost Grasse*, 2002, 79, 1-14.

- Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe*, 2007, 2(1), 55-67.
- Ryan D, Prenzler PD, Lavee S, Antolovich M, Robards K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J Agric Food Chem*, 51, 2532-2538.
- Saija A, Trombetta D, Tomaino A, Lo Cascio R, Principi P, Uccella N, Bonina F, Castelli F. *In vitro* evaluation of the antioxidant activity and biomebrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int J Pharm*, 1998, 166(2):18, 123-133.
- Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med*, 1996, 184(2), 377-386.
- Samuelsson G. The blood pressure lowering factor in leaves of *Olea europaea*. *Farmaceutisk Revy*, 1951, 15, 229-239.
- Sanglard D, Hube B, Monod M, Odds FC, Gow NA. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun*, 1997, 65(9), 3539-3546.
- Sanglard D, Ischer F, Marchetti O, Entenza J, Bille J. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol*, 2003, 48(4), 959-976.
- Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites – a brief review. *Arch Oral Biol*, 2011, 56, 951-959.
- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida M, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*, 2013, 62, 10-24.
- Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2005, 48(6), 365-377.
- Scharf DH, Heinekamp T, Brakhage AA. Human and plant fungal pathogens: The role of secondary metabolites. *PLoS Pathog*, 2014, 10(1), e1003859.
- Schweigkofler W, Lopandić K, Molnár O, Prillinger H. Analysis of phylogenetic relationships among Ascomycota with yeast phases using ribosomal DNA sequences and cell wall sugars. *Org Divers Evol*, 2002, 2(1), 1-17.
- Segal E. *Candida*, still number one - what do we know and where are we going from there? *Mycoses*, 2005, 48(1), 3-11.



- Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, Forche A, Berman J. An isochrome confers drug resistance *in vivo* by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol Microbiol*, 2008, 68(3), 624-641.
- Servili M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspect of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr*, 2004, 1504, 113-127.
- Shareck J, Belhumeur P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(8), 1004-1012.
- Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AJ, Bonomo RP. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sup>2</sup>. *Free Radic Biol Med*, 1991, 11, 1-8.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988, 175(1), 184-191.
- Rocha CR, Schröppel K, Harcus D, Marcil A, Dignard D, Taylor BN, Thomas DY, Whiteway M, Leberer E. Signalling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(11), 3631-3643.
- Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, De Castro. *In vitro* activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 680-686.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azaredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*, 2011, 19(5), 241-247.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azaredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 2011, 36(2), 288-305.
- Singh P, Ghosh S, Datta A. Attenuation of virulence and changes in morphology in *Candida albicans* by disruption of the N-acetylglucosamine catabolic pathway. *Infect Immun*, 2001, 69, 7898-7903.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simoni M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*, 2005, 89, 191-198.
- Soll DR. *Candida* biofilms: Is adhesion sexy? *Curr Biol*, 2008, 18(16), 717-720.
- Somova LO, Nadar A, Rammanan P, Shode FO. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, 2003, 10(2-3), 115-121.

- Sonesson A, Ringstad L, Nordahl EA, Malmsten M, Mörgelin M, Schmidtchen A. Antifungal activity of C3a and C3a-derived peptides against *Candida*. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(2), 346-353.
- Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Res Int*, 2013, 2013, ID 204237, 13 stranica.
- Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Köhler G, Morschhäuser J. Expression of virulence genes in *Candida albicans*. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 485, 167-176.
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 2000, 40, 175-179.
- Sterkel AK, Lorenzini JL, Fites JS, Vignesh KS, Sullivan TD, Wuthrich M, Brandhorst T, Hernandez-Santos N, Deepe GS, Klein BS. Fungal mimicry of a mammalian aminopeptidase disables innate immunity and promotes pathogenicity. *Cell Host Microbe*, 2016, 19, 361-374.
- Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J*, 1997, 16(8), 1982-1991.
- Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, 2001.
- Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 2004, 12(7), 317-324.
- Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(10), 737-748.
- Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley TV, Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33(5), 461-463.
- Sugiyama M, Machida K, Matsuda N, Kikuchi M. A secoiridoid glycoside from *Osmanthus asiaticus*. *Phytochemistry*, 1993, 34(4), 1169-1170.
- Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, Coleman DC. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 2004, 4(4-5), 369-376.
- Sung WS, Lee IS, Lee DG. Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by lycopene in *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(11), 1797-1804.

- Susalit E, Agusb N, Effendia I, Tjandrawinatac RR, Nofiarnyc D, Perrinjaquet-Moccetti T, Verbruggend M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 2011, 18, 251-258.
- Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. *Guide to clinically significant fungi*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998.
- Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*, 2013, 8(10), 1325-1337.
- Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA, Svidzinski TI. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2007, 40, 91-93.
- Tanahashi T, Takenaka Y, Nagakura N. Two dimeric secoiridoid glucosides from *Jasminum polyanthum*. *Phytochemistry*, 1996, 41, 1341-1345.
- Tasioula-Margari M, Okogeri O. Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS. *J Food Sci*, 2001, 66(4), 530-534.
- Tassou CC, Nychas GJE, Bord RG. Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotech Appl Biochem*, 1991, 13, 231-237.
- Tavanti A, Davidson AD, Row NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1), 284-292.
- Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: A review. *Front Microbiol*, 2015, 6, 1420.
- Theiss S, Ishdorj G, Brenot A, Kretschmar M, Lan CY, Nictlerlein T, Hacker J, Nigam S, Agabian N, Kohler GA. Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild type *Candida albicans* reduces cell associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296, 405-120.
- Thomson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(9), 1173-1182.
- Toenjes KA, Munsee SM, Ibrahim AS, Jeffrey R, Edwards JE, Johnson DI. Small-molecule inhibitors of the budded-to-hyphal-form transition in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(3), 963-972.
- Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, Bouchara JP. Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Med Mycol*, 2008, 46, 749-772.

- Trovato A, Forestieri AM, Iauk L, Barbera R, Monforte MT, Galati EM. Hypoglycaemic activity of different extracts of *Olea europaea* L. in the rat. *Plant Med Phytother*, 1993, 26(4), 300-308.
- Uppuluri P, Nett J, Heitman J, Andes D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(3), 1127-1132.
- Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR, Kadosh D, Lopez-Ribot JL. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Patog*, 2010, 6(3), e1000828.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*, 2009, 7(1), 65-74.
- van der Walt JP, Hopsu-Havu VK. A colour reaction for the differentiation of ascomycetous and hemibasidiomycetous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1976, 42, 157-163.
- Vanden BH, Marichal P, Odds FC, Luyten W. Mechanisms of resistance to azole antifungals. *Program and Abstracts of the Thirty-Third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, abstract 1586, 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Vanden BH. Echinocandins – an update. *Expert Opin Ther Patents*, 2002, 12, 151-167.
- Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*, 2012, 2012, 713687.
- Vediyappan G, Rossignol T, d'Enfert C. Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5), 2096-2111.
- Veer WLC, Gerris V, Ribbers JE, Oud PJ, van Ree PJ, Beyerman HC, Bontekoe JS. A compound isolated from *Olea europaea*, *Recueil*, 1957, 76, 839-840.
- Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*, 2006, 60(1), 5-15.
- Villar-Vidal M, Marcos-Arias C, Eraso E, Quindós G. Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enferm Infecc Microbial Clin*, 2011, 29(9), 660-665.
- Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. Virgin olive oil study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr*, 2005, 44, 121-127.

- Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*, 2002, 22, 65-75.
- Visioli F, Galli C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci*, 1994, 55(24), 1965-1971.
- Wang Y, Aisen P, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun*, 1995, 63(8), 3131-3136.
- Wei GX, Xu X, Wu CD. *In vitro* synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(6), 565-572.
- Wiederhold NP, Cota JM, Frei CR. Micafungin in the treatment of invasive candidiasis and invasive aspergillosis. *Infect Drug Resist*, 2008, 1, 63-77.
- Wozniok I, Hornbach A, Schmitt C, Frosch M, Einsele H, Hube B, Löffler J, Kurzai O. Induction of ERK-kinase signalling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils. *Cell Microbiol*, 2008, 10(3), 807-820.
- Xie GH, Fang XM, Fang O, Wu XM, Jin YH, Wang JL, Guo OL, Gu MN, Xu OP, Wang DX, Yao SL, Yuan SY, Du ZH, Sun YB, Wang HH, Wu SJ, Cheng BL. Impact of invasive fungal infection on outcome of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. *Crit Care*, 2008, 12, R5.
- Xie P, Huang L, Zhang C, Zhang Y. Phenolic composition, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure-activity relationships. *J Funct Foods*, 2015, 16, 460-471.
- Yangui T, Dhouib A, Rhouma A, Sayadi S. Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chem*, 2009, 117, 1-8.
- Yi S, Sahni N, Daniels KJ, Lu KL, Srikantha T, Huang G, Garnaas AM, Soll DR. Alternative mating type configuration (a/a versus a/a or  $\alpha/\alpha$ ) of *Candida albicans* result in alternative biofilms regulated by different pathways. *PLoS Biol*, 2011, 9, e1001117. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal\\_med\\_000141.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/herbal/medicines/herbal_med_000141.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d).
- Yordanov M, Dimitrova P, Patkar S, Saso L, Ivanovska N. Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. *Can J Microbiol*, 2008, 54(6), 435-440.
- Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol*, 2007, 9(12), 2938-2954.

- Zakikhany K, Thewes S, Wilson D, Martin R, Albrecht A, Hube B. From attachment to invasion: infection associated genes of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 2008, 49(4), 245-251.
- Zaslaver M, Offer S, Kerem Z. Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 9934-9939.
- Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun*, 2001, 69(1), 405-412.
- Zhang MX, Kozel TR. Mannan-specific immunoglobulin G antibodies in normal human serum accelerate binding of C3 to *Candida albicans* via the alternative complement pathway. *Infect Immun*, 1998, 66(10), 4845-4850.
- Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*, 2011, 18, 1181-1190.
- Zorić N, Kopjar N, Bobnjarić I, Horvat I, Tomić S, Kosalec I. Antifungal activity of oleuropein against *Candida albicans* – the in vitro study. *Molecules*, 2016, 21, 1631.
- Zorić N, Kopjar N, Oršolić N, Tomić S, Kosalec I. Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis* – the in vitro viability study. *Acta Pharm*, 2016, 66, 411-421.
- Zorić N, Horvat I, Kopjar N, Vučemilović A, Kremer D, Tomić S, Kosalec I. Hydroxytyrosol expresses antifungal activity in vitro. *Curr Drug Targets*, 2013, 14, 992-998.
- Zugar A, Louie E, Holzman RS, Simberkoff MS, Rahal JJ. Cryptococcal disease in patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Ann of Intern Med*, 1986, 104, 234-240.

## **8. SAŽETAK**

Učinak sekundarnog metabolita masline (*Olea europaea* L.) oleuropeina, njegovog razgradnog produkta hidroksitirosola i vodenog ekstrakta maslinova lista na staničnu vijabilnost medicinski značajne gljivične vrste *Candida albicans* ispitan je *in vitro* testovima. HPLC analizom utvrđeno je da je najzastupljeniji spoj ekstrakta korištenog u istraživanju bio oleuropein ( $9,281 \pm 0,185$  g tirosola / 100 g suhog ekstrakta). Metodom mikrodilucije određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) koje uzrokuju 80 % smanjenja stanične vijabilnosti i koje su iznosile 12,5 mg/ml za oleuropein, 6,25 mg/ml za hidroksitirosol te 25 mg/ml za vodeni ekstrakt maslinova lista. Kvantitativna analiza s fluorescentnim bojanjem upućuje na zaključak da je apoptoza primarni način stanične smrti u uzorcima tretiranim sa sub-MIK koncentracijama oleuropeina, hidroksitirosola i vodenog ekstrakta maslinova lista.

Budući da je patogenost vrste određena virulentnim čimbenicima, ispitani su učinci oleuropeina i hidroksitirosola na najznačajnije virulentne čimbenike vrste *C. albicans*. Utvrđen je inhibitorni učinak ovih fenolnih tvari na morfogenezu u hifalni oblik rasta kod *C. albicans* induciranu u uvjetima staničnog gladovanja, a koja ima ulogu u procesima virulencije poput kolonizacije, diseminacije u tkiva, adhezije na staničnu površinu nositelja i stvaranje biofilma. U usporedbi s drugim vrstama roda *Candida* spp., *C. albicans* pokazuje veću patogenost i učestalije stvaranje biofilma. Provedena analiza pri sub-MIK koncentracijama oleuropeina i hidroksitirosola nije pokazala inhibitorno djelovanje ispitivanih tvari na stvaranje biofilm ove vrste. Negativno nabijene fosfatne skupine polisaharidnih bočnih lanaca kod proteina stanične stijenke vrste *C. albicans* utječu na elektrostatski naboj te na staničnu površinsku hidrofobnost koja se dovodi u svezu s adhezijom *C. albicans* na biomaterijale i smatra se čimbenikom povezanim s gljivičnom patogenošću. Pri subinhibitornim koncentracijama, oleuropein i hidroksitirosol su uzrokovali modulaciju hidrofobnosti nakon 24 sata inkubacije. Tretiranjem vrste *C. albicans* s oleuropeinom i hidroksitirosolom utvrđeno je višestruko djelovanje ovih tvari uključujući oštećenje stanične stijenke, stanične membrane i otpuštanje citoplazmatskog sadržaja. Određivanje stanične permeabilnosti posrednim ispitivanjem otpuštanja staničnog sadržaja pokazalo je koncentracijski ovisan efekt pri testiranim koncentracijama, za oleuropein u rasponu 1,25 – 50 mg/ml i hidroksitirosol u rasponu 0,625 – 25 mg/ml. S obzirom da mnogi antimikotici djeluju kao inhibitori biosinteze ergosterola, provedeno je ispitivanje učinka oleuropeina i hidroksitirosola na modulaciju ergosterola spektrofotometrijskim određivanjem kao i GC-MS metodom kojima je utvrđeno značajno smanjenje ovog sterola u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji (195,31  $\mu$ g/ml i 1250  $\mu$ g/ml za oleuropein te 97  $\mu$ g/ml i 625  $\mu$ g/ml za hidroksitirosol). Ispitivane fenolne tvari pokazale su učinak na oštećenje membrane i stijenke i kroz posredno ispitivanje njihovog djelovanja na depolarizaciju stanične membrane pri testiranim koncentracijama 12,5 mg/ml i 125 mg/ml za oleuropein te 6,25 mg/ml i 62,5 mg/ml za hidroksitirosol. Dodatno je ispitano djelovanje ovih tvari na kandidine izvanstanične hidrolitičke enzime od kojih su najznačajnije aspartil-proteaze (Sap). Uzgoj vrste *C. albicans* u prisutnosti oleuropeina i hidroksitirosola uzrokovao je značajnu inhibiciju Sap aktivnosti u rasponu koncentracija 3,125 – 12,5 mg/ml za oleuropein i 1,5625 – 6,25 mg/ml za hidroksitirosol te je navedeni inhibitorni učinak bio koncentracijski-ovisan.

Uz testove određivanja djelovanja oleuropeina i hidroksitirosola na medicinski značajnu gljivičnu vrstu, ispitani su mogući citotoksični i genotoksični učinci na stanice nositelja. Navedene tvari nisu pokazale hemolitičku aktivnost na humanim eritrocitima pri testiranim koncentracijama u rasponu 3-60  $\mu$ M. Ispitivanje učinka navedenih antioksidansa na humanim limfocitima periferne krvi provedeno kometnim testom pokazalo je protektivno djelovanje ovih tvari na oštećenja DNA inducirana s mutagenom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pri čemu je hidroksitirosol imao bolji protektivni učinak u usporedbi s oleuropeinom nakon 120 min predtretmana s ispitivanim tvarima u koncentracijama 1, 5 i 10  $\mu$ M.



## **9. SUMMARY**

*Candida* species are commensal organisms that normally colonize mucosal surfaces of healthy individuals and, under conditions of host weakness, can become opportunistic pathogens. Among *Candida* species, *C. albicans* is the predominant cause of invasive fungal infections. An increase in serious human infections in immunocompromised patients caused by fungi and a progression of drug resistance to conventional therapeutics triggered a need for more effective treatment. Considering that molecules that derive from natural sources have considerable antifungal properties and can be a promising source for the development of new anti-candidal therapy, in this research antifungal activity of oleuropein, a phenol secoiridoid present in olive tree products, its derivative hydroxytyrosol and water extract of olive leaf were investigated using *in vitro* tests against opportunistic fungal pathogen *C. albicans*.

Reverse-phase HPLC with diode array detection was carried out to determine polyphenolic composition of olive leaf extract. Oleuropein was found to be the most abundant compound in the analysed extract ( $9,281 \pm 0,185$  g of tyrosol /100 g of dry extract). Antifungal susceptibility testing was used to estimate the drop of viability up to 80 % in comparison to the control (untreated cells). Minimal inhibitory concentration (MIC) against *C. albicans* for oleuropein was 12,5 mg/ml, for hydroxytyrosol was 6,25 mg/ml and for water extract of olive leaf was 25 mg/ml. Morphological changes in the nuclei after staining with fluorescent DNA-binding dyes revealed that apoptosis was a primary mode of cell death in analyzed samples treated with sub-MIC concentrations of oleuropein, hydroxytyrosol and olive leaf extract.

In order to understand mode of action of oleuropein and hydroxytyrosol, their effect on *C. albicans* virulence factors essential for development of infection in the host has been investigated. The yeasts actively participate in the pathophysiology of the disease using mechanisms called virulence factors. *C. albicans* is a polymorphic fungus and is able to undergo reversible morphological transition between yeast and filamentous forms. It has been reported that the growth of hyphae promotes virulence and plays an important function in tissue invasion and resistance to phagocytosis. Both oleuropein and hydroxytyrosol modulate morphogenetic conversion and inhibit filamentation of *C. albicans* induced in the conditions of reduced nutrient availability. On the other hand, treatment with sub-MIC concentrations of these phenolic compounds did not affect *C. albicans* biofilm formation. The hydrophobicity assay showed that oleuropein and hydroxytyrosol, in sub-MIC values, have decreased the cellular surface hydrophobicity, a factor associated with adhesion to epithelial cells. The tested compounds also inhibit activity of extracellular hydrolytic enzymes important in adherence, tissue penetration, invasion and destruction of host tissue. The most significant hydrolytic enzymes involved in the virulence of *C. albicans* are Sap proteins. Cultivation of *C. albicans* in the presence of oleuropein (3,125 – 12,5 mg/ml) and hydroxytyrosol (1,5625 – 6,25 mg/ml) caused inhibition of Sap activity in the dose-dependent manner.

Most therapies for fungal infections target the ergosterol biosynthesis pathway or its end product ergosterol which is necessary for growth and normal function of fungal cells. At subinhibitory concentrations (195,31  $\mu$ g/ml and 1250  $\mu$ g/ml for oleuropein; 97  $\mu$ g/ml and 625  $\mu$ g/ml for hydroxytyrosol) tested phenolic compounds have altered sterol content and subsequently affected the cell membrane of *C. albicans*. Both oleuropein (1,25 – 50 mg/ml) and hydroxytyrosol (0,625 – 25 mg/ml) induced dose-dependent loss of intracellular material to outer space (DNA, protein leakage) and caused membrane depolarisation indicating their direct effect on the membrane.

In addition to tests for determining the antifungal activity against *C. albicans*, cytotoxicity and genotoxicity assays were performed to elucidate the effect of oleuropein and hydroxytyrosol on the host cells. Oleuropein and hydroxytyrosol exhibited no hemolytic activity on human erythrocytes at tested concentrations (3-60  $\mu$ M). Antigenotoxic effects of oleuropein and hydroxytyrosol against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage in human lymphocytes were evaluated *in vitro* by alkaline comet assay. Pretreatment of human lymphocytes with each of

the substance for 120 min produced dose-dependent reduction of primary DNA damage in the tested cell type. At tested concentrations (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ), hydroxytyrosol showed better protective effect than oleuropein against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced DNA breaks. Additionally, oleuropein and hydroxytyrosol were found to have strong antioxidant activity determined using ABTS scavenging assay, reducing power assay (FRAP) and recently introduced cupric reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC) and our results suggest that their genoprotective effects could be attributed to their radical scavenging and metal ions chelating activity.

## **10. PRILOZI**

Ovaj dodatak sadrži objavljene znanstvene radove koji obrađuju problematiku iz ovog doktorskog rada:

**Izvorni znanstveni radovi u Current Contents (CC) časopisima:**

Prilog 1. Zorić N, Kopjar N, Bobnjarić I, Horvat I, Tomić S, Kosalec I. Antifungal activity of oleuropein against *Candida albicans* – the *in vitro* study. *Molecules*, 2016, 21, 1631.

Prilog 2. Zorić N, Kosalec I, Tomić S, Bobnjarić I, Jug M, Vlainić T, Vlainić J. Membrane of *Candida albicans* as a target of berberine. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17, 268.

**Znanstveni radovi u drugim časopisima:**

Prilog 3. Zorić N, Horvat I, Kopjar N, Vučemilović A, Kremer D, Tomić S, Kosalec I. Hydroxytyrosol expresses antifungal activity *in vitro*. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(9), 992-998.

Prilog 4. Zorić N, Kopjar N, Kraljić K, Oršolić N, Tomić S, Kosalec I. Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis* – the *in vitro* viability study. *Acta Pharm*, 2016, 66, 411-421.

## **Prilog 1.**

## **11. ŽIVOTOPIS**

Nataša Zorić, mag. ing. biotech., rođena je 1984. godine u Rijeci gdje je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Nakon završetka opće gimnazije, upisala je studij biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagreb. Diplomirala je 2007. godine s temom diplomskog rada „Istraživanje bakterije *Enterobacter sakazakii* u mlijeku i dehidriranim pripravcima dječje hrane“. Nakon diplome, zaposlila se u kompaniji PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, u odjelu Analitika farmaceutskih proizvoda na radnom mjestu istraživač-mikrobiolog. Nakon PLIVE, zapošljava se u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode, gdje u Odjelu za odobravanje lijekova radi na regulatornim poslovima od 2009. godine.

Poslijediplomski studij „Farmaceutske znanosti“ upisuje 2010. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te započinje rad na disertaciji „Antifungalni i antigenotoksični učinci oleuropeina“ u okviru projekta „Modulacija virulentnih čimbenika medicinski značajnih *Candida* vrsta“ na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Autorica je 5 znanstvenih radova te je sudjelovala na kongresnim skupovima s posterskim izlaganjima.

#### **Izvorni znanstveni radovi u Current Contents (CC) časopisima:**

1. Zorić N, Kosalec I, Tomić S, Bobnjarić I, Jug M, Vlainić T, Vlainić J. Membrane of *Candida albicans* as a target of berberine. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17, 268.
2. Zorić N, Kopjar N, Bobnjarić I, Horvat I, Tomić S, Kosalec I. Antifungal activity of oleuropein against *Candida albicans* – the *in vitro* study. *Molecules*, 2016, 21, 1631.

#### **Znanstveni radovi u drugim časopisima:**

3. Zorić N, Kopjar N, Kraljić K, Oršolić N, Tomić S, Kosalec I. Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis* – the *in vitro* viability study. *Acta Pharm*, 2016, 66, 411-421.
4. Zorić N, Horvat I, Kopjar N, Vučemilović A, Kremer D, Tomić S, Kosalec I. Hydroxytyrosol expresses antifungal activity *in vitro*. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(9), 992-998.



5. Zulfikari S, Filipović Sučić A, Meštrović K, Perić Barbaraić M, Mandarić V, Zorić N, Tomić S. Generic medicines in Croatia – regulatory aspects and statistics. *Coll Antropol*, 2015, 39(2), 363-370.

**Sažeci u zbornicima skupova:**

1. Zorić N, Vlainić J, Kosalec I, Tomić S. Effect of hydroxytyrosol and oleuropein on *Candida albicans* cell permeability. *Knjiga sažetaka 5. hrvatskog kongresa farmacije*. Zorc B (ur.), Rovinj: Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2015, 159-159.
2. Bobnjarić I, Vlainić J, Zorić N, Kosalec I. Modulation of the cell wall of yeast *Candida albicans* with berberine. *Knjiga sažetaka 5. hrvatskog kongresa farmacije*. Zorc B (ur.), Rovinj: Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2015, 163-163.
3. Zorić N, Uzeirbegović S, Ikić Komesar J, Tomić S. Utjecaj uredbe Europske komisije br. 1234/2008 na postupak odobravanja izmjena u Hrvatskoj. *Zbornik radova 2. kongresa farmaceuta Bosne i Hercegovine*, Banja Luka, 2011, 379-380.
4. Šimundža Perojević Z, Šimpraga B, Zorić N, Tomić S. „Patient friendly“ patient information leaflet (package leaflet). *Period Biol*, 2010, 112(1), 6. hrvatski kongres farmakologije, Opatija, 2010.
5. Meštrović K, Perić Barbaraić M, Mandarić V, Zorić N, Tomić S. Farmaceutska dokumentacija za ocjenu kakvoće generičkog lijeka. *Knjiga sažetaka 4. hrvatskog kongresa farmacije*. Zorc (ur.), Opatija: Hrvatsko farmaceutsko društvo, 2010, 140-140.

**12. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/  
BASIC DOCUMENTARY CARD**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za mikrobiologiju  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

### ANTIFUNGALNI I ANTIGENOTOKSIČNI UČINCI OLEUROPEINA

Nataša Zorić

#### SAŽETAK

Učinak sekundarnog metabolita masline (*Olea europaea* L.) oleuropeina, njegovog razgradnog produkta hidroksitirosola i vodenog ekstrakta maslinova lista na staničnu vijabilnost medicinski značajne gljivične vrste *Candida albicans* ispitan je *in vitro* testovima. Metodom mikrodilucije određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) koje uzrokuju 80 % smanjenja stanične vijabilnosti i koje su iznosile 12,5 mg/ml za oleuropein, 6,25 mg/ml za hidroksitirosol i 25 mg/ml za vodeni ekstrakt maslinova lista. Kvantitativna analiza s fluorescentnim bojanjem upućuje na zaključak da je apoptoza primarni način stanične smrti u uzorcima tretiranim sa sub-MIK koncentracijama ovih tvari. Budući da je patogenost vrste određena virulentnim čimbenicima, ispitani su učinci oleuropeina i hidroksitirosola na najznačajnije virulentne čimbenike vrste *C. albicans*. Utvrđen je inhibitorni učinak ovih fenolnih tvari na promjenu u hifalni oblik rasta kod vrste *C. albicans* induciranu u uvjetima staničnog gladovanja. Pri sub-MIK koncentracijama, oleuropein i hidroksitirosol nisu pokazali inhibitorno djelovanje na stvaranje biofilma ove vrste. Pri subinhibitorskim koncentracijama nakon 24 sata inkubacije, oleuropein i hidroksitirosol su uzrokovali modulaciju stanične površinske hidrofobnosti koja se dovodi u vezu s adherencijom vrste *C. albicans* na biomaterijale. Uzgoj vrste *C. albicans* u prisutnosti oleuropeina i hidroksitirosola je uzrokovao inhibiciju aktivnosti kandidinih hidrolitičkih enzima, aspartil-proteaza (Sap) i  $\alpha$ -glukozidaza. Tretiranjem vrste *C. albicans* s oleuropeinom i hidroksitirosolom utvrđeno je višestruko djelovanje ovih tvari uključujući oštećenje stanične stijenke, stanične membrane i otpuštanje citoplazmatskog sadržaja (DNA i proteina). S obzirom da neki antimikotici djeluju kao inhibitori biosinteze ergosterola, provedeno je ispitivanje učinka oleuropeina i hidroksitirosola na modulaciju ergosterola kojima je utvrđeno smanjenje ovog sterola u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji. Uz testove određivanja djelovanja na gljivičnu vrstu, ispitani su mogući citotoksični i genotoksični učinci na stanice nositelja. Navedene tvari nisu pokazale hemolitičku aktivnost na humanim eritrocitima pri testiranim koncentracijama u rasponu 3-60  $\mu$ M. Ispitivanje učinka na humanim limfocitima periferne krvi provedeno kometnim testom pokazalo je protektivno djelovanje ovih tvari na oštećenja DNA inducirana s mutagenom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pri čemu je hidroksitirosol imao bolji protektivni učinak u usporedbi s oleuropeinom nakon 120 min predtretmana s ispitivanim tvarima u koncentracijama 1, 5 i 10  $\mu$ M. Navedeni genoprotektivni učinci su posljedica snažnog antioksidativnog djelovanja ovih fenolnih spojeva utvrđenih ABTS, FRAP i CUPRAC metodom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 243 stranice, 56 grafičkih prikaza, 17 tablica i 369 referenci. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: oleuropein, hidroksitirosol, ekstrakt maslinova lista, *Candida albicans*, antifungalni učinak, apoptoza, virulentni čimbenik, inhibicija germinacije, biofilm, stanična površinska hidrofobnost, modulacija ergosterola, hidrolitički enzimi, aspartil-proteaze, citotoksičnost, antioksidativna aktivnost, antigenotoksični učinak, kometni test, humani limfociti

Mentori: **Dr. sc. Ivan Kosalec**, izv. prof. Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Siniša Tomić**, izv. prof., Agencija za lijekove i medicinske proizvode

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, izv. prof. Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Lidija Bach Rojceky**, izv. prof. Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Vesna Eraković Haber**, prof., Fidelta Ltd.  
**Dr. sc. Nada Vrkić**, izv. prof. Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (zamjena)

Rad je prihvaćen dana: 12. srpnja 2017. god.

## BASIC DOCUMENTARY CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Microbiology  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

### ANTIFUNGAL AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF OLEUROPEIN

Nataša Zorić

#### SUMMARY

Activity of oleuropein, a phenol secoiridoid present in olive tree products, its derivative hydroxytyrosol and water extract of olive leaf were investigated using *in vitro* tests against opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. Antifungal susceptibility testing was used to estimate the drop of viability up to 80 % in comparison to the control (untreated cells). Minimal inhibitory concentration (MIC) against *C. albicans* for oleuropein was 12,5 mg/ml, for hydroxytyrosol was 6,25 mg/ml and for water extract of olive leaf was 25 mg/ml. Morphological changes in the nuclei after staining with fluorescent DNA-binding dyes revealed that apoptosis was a primary mode of cell death in analyzed samples treated with sub-MIC concentrations of tested compounds. In order to understand mode of action of oleuropein and hydroxytyrosol, their effect on *C. albicans* virulence factors essential for development of infection in the host have been investigated. Both oleuropein and hydroxytyrosol modulate morphogenetic conversion and inhibit filamentation of *C. albicans* induced in the conditions of reduced nutrient availability. On the other hand, treatment with sub-MIC concentrations of these phenolic compounds did not affect *C. albicans* biofilm formation. The hydrophobicity assay showed that both compounds, in sub-MIC values, have decreased the cellular surface hydrophobicity, a factor associated with adhesion to epithelial cells. Cultivation of *C. albicans* in the presence of oleuropein and hydroxytyrosol also inhibits, in the dose-dependent manner, activity of aspartyl-proteases (Sap), hydrolytic enzymes important in adherence, tissue penetration, invasion and destruction of host tissue. Most therapies for fungal infections target the ergosterol biosynthesis pathway or its end product ergosterol which is necessary for growth and normal function of fungal cells. At subinhibitory concentrations tested compounds have altered sterol content and subsequently affected the cell membrane of *C. albicans*. Both compounds induced dose-dependent loss of intracellular material to outer space (DNA, protein leakage) and caused membrane depolarisation indicating their direct effect on the membrane. In addition, cytotoxicity and genotoxicity assays were performed to elucidate the effect of oleuropein and hydroxytyrosol on the host cells. Oleuropein and hydroxytyrosol exhibited no hemolytic activity on human erythrocytes at tested concentrations (3-60  $\mu$ M). Antigenotoxic effects of oleuropein and hydroxytyrosol against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage in human lymphocytes were evaluated *in vitro* by alkaline comet assay. Pretreatment of human lymphocytes with each of the substance for 120 min produced dose-dependent reduction of primary DNA damage in the tested cell type. At tested concentrations (1, 5, 10  $\mu$ M), hydroxytyrosol showed better protective effect than oleuropein against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA breaks. Our results suggest that genoprotective effects of these phenolic compounds could be attributed to their radical scavenging and metal ions chelating activity which were determined using ABTS, FRAP and CUPRAC assays.

The thesis is deposited in the Central Library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Thesis includes: 243 pages, 56 figures, 17 tables and 369 references. Original is in Croatian language.

Keywords: oleuropein, hydroxytyrosol, extract of olive leaf, *Candida albicans*, antifungal activity, apoptosis, virulence factor, inhibition of germ-tube formation, biofilm, cellular surface hydrophobicity, modulation of ergosterol content, hydrolytic enzymes, aspartyl-proteases, cytotoxicity, antioxidative activity, antigenotoxic effect, comet assay, human lymphocytes

Mentors: **Ivan Kosalec, Ph.D.**, Assoc. Prof., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Siniša Tomić, Ph.D.**, Assoc. Prof., Agency for Medicinal Products and Medical Devices

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.**, Assoc. Prof., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach Rojceky, Ph.D.**, Assoc. Prof., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Vesna Eraković Haber, Ph.D.**, Full Prof., Fidelta Ltd.  
**Nada Vrkić, Ph.D.**, Assoc. Prof., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (substitute)

The thesis was accepted: July 12<sup>th</sup>, 2017