

# Kako istraživati antimikrobnu učinkovitost tvari prirodnog porijekla

---

Trninić, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:126184>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**VETERINARSKI FAKULTET**

**Domagoj Trninić**

**Kako istraživati antimikrobnu učinkovitost tvari prirodnog porijekla**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2020.**

Naziv zavoda : Zavod za farmakologiju i toksikologiju

Predstojnik : doc. dr. sc. Jelena Šuran

Mentori :

doc. dr. sc. Jelena Šuran

dr. sc. Josipa Vlainić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada :

1. Prof. dr. sc. Frane Božić
2. Doc. dr. sc. Jelena Šuran
3. Dr. sc. Josipa Vlainić
4. Prof. dr. sc. Andreja Prevendar Crnić (zamjena)

## **Popis i objašnjenje kratica**

**T<sub>max</sub>** - vrijeme za koje se postigne maksimalna koncentracija lijeka u krvi

**C<sub>max</sub>**- maksimalna koncentracija lijeka u krvi

**LD<sub>50</sub>** - srednja smrtonosna doza

**MIK** - minimalna inhibitorna koncentracija

**TLC** - „Thin layer chromatography“ – tankoslojna kromatografija

**CLSI** - „Clinical and Laboratory Standards Institute“

**EUCAST** - „European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing“

**CFU** - „colony forming unit“ – jedinica koja tvori kolonije

**IC<sub>50</sub>** - Inhibitorna koncentracija, koncentracija lijeka koja inhibira rast 50% mikroorganizama

**CC<sub>50</sub>** - koncentracija citotoksičnosti, koncentracija lijeka koja uzrokuje 50% odumiranja normalnih stanica

**MBK** - minimalna baktericidna koncentracija

**MFK**- minimalna fungicidna koncentracija

**MLK** – minimalna letalna koncentracija

## **Popis priloga**

**Slika 1.** Shematski prikaz pripreme i ekstrakcije biljaka

**Slika 2.** Slikovni prikaz metode agar difuzije

**Slika 3.** Prikaz metode određivanja minimalne inhibitorne koncentracije metodom difuzije

**Slika 4.** Prikaz metode difuzije bušenjem rupica u agaru

**Slika 5.** Prikaz usporedbe metoda tankoslojne kromatografije

**Slika 6.** Prikaz metode mikrodilucije

**Slika 7.** Prikaz kemijskih struktura sekundarnih metabolita

# SADRŽAJ

1) Uvod.....	2
2) Povijest otkrića proizvoda prirodnog porijekla .....	3
3) Proces otkrivanja lijeka .....	4
3.1. Pretklinička faza.....	4
3.2. Klinička faza.....	5
4) Proces istraživanja i razvoj antimikrobnih pripravaka prirodnog porijekla .....	6
4.1. Odabir biljaka .....	6
4.2. Priprema i ekstrakcija biljaka .....	7
4.3. Odabir primjerenog testa .....	9
4.3.1. Odabir testa za bakterije i gljivice .....	9
4.3.1.3. Metode dilucije.....	15
4.3.2. Odabir testa antivirusnog djelovanja .....	19
4.3.3. Odabir testa antiparazitskog djelovanja.....	21
4.4. Toksikološka ispitivanja.....	23
4.4.1. Testovi redukcije tetrazoliuma .....	23
4.4.2. Redukcija rezasurina .....	23
4.4.3. Test aktivnosti proteaze .....	24
4.4.4. ATP test.....	24
4.4.5. Testovi s različitim bojama .....	24
5) Primjeri antimikrobne aktivnosti prirodnih tvari.....	26
5.1. Prirodne tvari s antimikrobnom aktivnošću .....	26
5.2. Sekundarni metaboliti s antimikrobnom aktivnošću .....	28
6) Zaključak.....	32
7) Literatura .....	33
8) Sažetak.....	39
9) Summary .....	40
10) Životopis.....	41

## 1) Uvod

Unatoč mnogim revolucionarnim otkrićima u povijesti medicine, mnoge zarazne bolesti i njihovi uzročnici i danas predstavljaju značajan problem kako u ljudi, tako i u životinja. Među najvećim izazovima moderne medicine je razvoj rezistencije na antibiotike. Stoga se danas sve više istražuju alternative antibioticima, kao i novi, nekonvencionalni mehanizmi antimikrobnog djelovanja. Upravo zbog složenosti svog sastava, pa time i mehanizama antimikrobnog djelovanja, prirodni pripravci ponovo su u fokusu znanosti, kao jedno od potencijalnih rješenja u borbi protiv antimikrobne rezistencije. Iako imaju veliki potencijal kao kandidati za razvoj novih antimikrobnih lijekova, veliki je problem u načinu istraživanja njihovog djelovanja. Dok se industrijski proces istraživanja potencijalnih lijekova temelji na automatiziranom testiranju velikog brojeva spojeva, u pronalasku djelotvornih prirodnih pripravaka koristi se anegdotalni pristup te se takvi proizvodi podvrgavaju laboratorijskom ispitivanju (JURG G., 2009). Također, veliki je broj istraživanja koja pokazuju djelovanje prirodnih pripravaka na mikroorganizme u *in vitro* pokusima, ali takvo djelovanje ne pokazuju u *in vivo* pokusima, pa iz toga mogu proizaći pogrešni zaključci.

S obzirom na kompleksnost građe prirodnih pripravaka, njihova standardizacija i definiranje sastava predstavlja izazov u analitičkom i regulatornom smislu. No, kako interes javnosti i struke za ovakvim pripravcima sve više raste, sve je više strategija kojima se savladavaju ovakvi izazovi. Klasični farmaceutski pristup u kojem je u, najčešće polusintetskom pripravku, definirana koncentracija jedne ili nekoliko aktivnih tvari te njihovo djelovanje u ovisnosti o dozi, u slučaju prirodnih pripravaka se ne može primjeniti. Prirodni pripravci su mješavine velikog broja aktivnih spojeva koji mogu djelovati sinergistički ili antagonistički, ovisno o zastupljenosti i prisutnosti drugih spojeva. Stoga se oni standardiziraju prema količini pojedinih ekstrakata ili, ukoliko je riječ o pojedinom ekstraktu, prema odabranim skupinama najzastupljenijih ili po učinku najznačajnijih aktivnih tvari. Učinkovita doza ili koncentracija pripravka izražava se u odnosu na količinu (ili udio) ukupnog pripravka (mješavine) ili ljekovitog oblika koji sadrži određenu količinu ekstrakta.

Kako se sve više istražuje antimikrobna učinkovitost prirodnih pripravaka, cilj ovog preglednog diplomskog rada je dati pregled osnovnih metoda testiranja antimikrobne učinkovitosti iznijeti i preporučiti na koji način pronalaziti i istraživati proizvode i ekstrakte prirodnog porijekla.

## 2) Povijest otkrića proizvoda prirodnog porijekla

Etnofarmakologija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem biološki aktivnih tvari prirodnog porijekla. Iako su se ljudi koristili lijekovima iz prirode od samih početaka civilizacije, početak etnofarmakologije nalazimo u prvoj polovici 19. stoljeća kada mnogi znanstvenici počinju proučavati kemijsku strukturu farmakološki aktivnih tvari iz prirode. Mnogi su antropolozi u suradnji s biologima i kemičarima došli do značajnih otkrića u ovom području. Tako su Johann Wolfgang von Goethe i Friedlieb Ferdinand Runge izolirali kofein, a Robert Gordon Wasson i Albert Hofmann psilocibin iz psihoaktivnih gljiva (JURG G., 2009).

Pronalazak djelovanja biljaka *digitalis* (*Digitalis spp.*), maka (*Papaver somniferum*) i kurare (mješavina biljaka *Chondodendron tomentosum* i *Strychnos spp.*) bili su revolucionarni. *Digitalis* djeluje tako što povećava kontraktilnost srca, smanjuje kontraktilnost provođenja impulsa kroz atriiovtrikularni čvor te parasimpatičkom aktivnošću smanjuje broj otkucaja srca. Iz maka se ekstrakcijom dobiva opijum koji ima analgetski učinak; može se rabiti kao lijek koji zaustavlja kašalj (antitustik), međutim može izazvati i depresiju centra za disanje, euforiju i ovisnost. Dokazano je da kurare blokira signal na receptorima za acetilkolin i tako dovodi do neuromišićne relaksacije. Acetilsalicilna kiselina je izolirana iz kore vrbe (*Salix spp*) koja se tradicionalno koristila u Europi za liječenje upale i povišene tjelesne temperature. Nedavna istraživanja u Kini potvrdila su potencijal biljke jednodnevnog pelina (*Artemisia annua*) iz koje je izolirana aktivna tvar artemizinin koji se koristi u liječenju malarije. Osim ovih primjera, prepoznat je potencijal tvari prirodnog porijekla u mnogim područjima medicine. Zadnjih godina sve je veći broj članaka o antimikrobnom djelovanju tvari prirodnog porijekla u specifičnim časopisima kao što je *Journal of Ethnopharmacology*. No, unatoč velikom broju članaka i velikom broju potencijalnih prirodnih spojeva koji se mogu koristiti kao lijekovi, malo je članaka koji doista prikazuju na koji način djeluju spojevi te imaju li praktičnu primjenu. Vođeni velikim otkrićima znanstvenika na početku razvoja etnofarmakologije, veliki broj znanstvenika danas želi istraživati potencijal tvari prirodnog porijekla. Kako bi što objektivnije i sa što većom točnošću dobili zadovoljavajuće rezultate, potrebno je odrediti kriterije na koji način istraživati prirodne tvari.

Na kraju, nije važno koliko će tvari i spojeva biti pronađeno, nego pronaći tvari koje uistinu djeluju u živom organizmu. Potrebno je pronaći brze specifične testove koji će prepoznati djelovanje neke biljke ili spoja na patogene mikroorganizme sa što manjim postotkom lažno pozitivnih rezultata. Potrebno je standardizirati način istraživanja i pronalaska ovakvih tvari i tako smanjiti broj istraživanja koja iznose potencijal nekog spoja i povećati broj istraživanja koja dokazuju njegovo djelovanje (JURG G., 2009).



### 3) Proces otkrivanja lijeka

Bilo koji proces otkrivanja i razvoja lijeka je dugotrajan i skup. Proces razvoja nekog lijeka dijeli se na dvije faze: pretkliničku fazu i kliničku fazu.

#### 3.1. Pretklinička faza

Pretklinička faza počinje opsežnim istraživanjem velikog broja molekula. Istražuje se djeluje li neko protutijelo, gen ili aktivna tvar na neki molekularni mehanizam (engl. *drug target*). Provode se testovi probira (engl. *screening test*) na velikom broju molekula (5000 do 10000) te se zatim odabire ona koja djeluje na cilj koji je povezan s bolesti protiv koje se lijek razvija. Nadalje, istražuju se karakteristike potencijalnog lijeka kao što su struktura molekule, toksičnost, aktivnost i mehanizam djelovanja. Također, važno je razviti formulaciju lijeka koja će optimizirati biodostupnost lijeka, stabilnost, sterilnost, mogućnost skladištenja te određivanje uvjeta u kojima se mora držati te transportirati.

Pretklinička istraživanja počinju *in vitro* ispitivanjima djelotvornosti molekule na neku molekulu ili stanicu. Nakon što su pronađeni kandidati za potencijalni lijek, oni ulaze u niz pokusa koji podrazumijevaju probiranje svojstva lijeka (eng. *drug screening*) kojem je za cilj definirati aktivnost i selektivnost nekog lijeka (raznim metodama na molekularnoj, staničnoj, tkivnoj razini). Nakon opsežnih istraživanja definira se farmakološki profil lijeka, saznaju se toksički učinci lijeka, kao i eventualno neočekivano terapijsko djelovanje (FRANCETIĆ i VITEZIĆ, 2007). Kasnije se prelazi na fazu istraživanja na životinjama (*in vivo*). Na temelju rezultata dobijenih u ovoj fazi znanstvenici mogu predvidjeti kako će potencijalni lijek djelovati na ljude. Osim toga, potrebno je odrediti pojedine parametre farmakokinetike kao što su  $C_{max}$  i  $T_{max}$ .  $C_{max}$  označava maksimalnu koncentraciju u krvi, dok je  $T_{max}$  vrijeme za koje je ta maksimalna koncentracija dostignuta (Pacific Biolabs, 2019).

Pretkliničke studije uključuju, dakle, istraživanje sigurnosti i učinkovitosti lijeka na pokusnim životinjama. Toksikološka ispitivanja važan su korak u istraživanju sigurnosti. Toksičnost pripravka određuje se ispitivanjem akutne, subakutne i kronične toksičnosti, kao i djelovanje pripravka na reproduktivne sposobnosti, spolne organe, razvoj ploda (teratotoksičnost), nasljedna obilježja (mutageni efekt) i na nastajanje tumorskih promjena (karcinogenost). Akutna toksičnost izražava se srednjom smrtonosnom dozom ( $LD_{50}$ ). Srednja smrtonosna doza označava dozu pripravka koja ubija 50% ispitivanih životinja. Ova ispitivanja najčešće se koriste na dvije vrste životinja i korištenjem dva načina primjene lijeka. Dobivena doza  $LD_{50}$  uspoređuje se s dozom primjene pripravka i zaključuje se koliko je pripravak siguran, što je veća razlika između doza lijek je sigurniji. Subakutna toksičnost se

istražuje u trajanju od 28 dana do 6 mjeseci tako da se ispituje na dvije vrste životinja i korištenjem tri doze, dok se kronična toksičnost ispituje jednu do dvije godine. Za vrijeme ovih ispitivanja prate se biokemijski parametri, kao i patoanatomske i patohistološke promjene (ĆUPIĆ i sur., 2014).

Važno je napomenuti da se pri planiranju i provođenju pokusa na životinjama potrebno pridržavati „3R“ pravila, jednog od temeljnih načela u suvremenim biomedicinskim pokusima, kojeg po prvi puta spominju William Russell i Rex Burch 1959. godine u knjizi *The principles of Human Experimental Technique* (ŽUŽUL i sur. 2016 ). Pravilo 3R označava Replacement – zamjenu, Reduction – smanjivanje i Refinement – poboljšanje, kojim se nastoji svesti broj životinja u pokusu na minimum i pritom paziti na njihovu dobrobit. Ukoliko je potencijalni lijek zadovoljio sve postupke pretkliničkih studija, prelazi se u kliničke studije.

### **3.2. Klinička faza**

Klinička faza razvoja lijeka podrazumijeva testiranje sigurnosti i učinkovitosti potencijalnog lijeka na ljudima ili ciljnoj vrsti životinja. Naravno, prethodno se, u pretkliničkim istraživanjima mora dokazati da je potencijalni lijek siguran za primjenu (FRANCETIĆ i VITEZIĆ, 2007)..

Klinička faza dijeli se u tri podfaze. Prva faza kliničkih ispitivanja provodi se na zdravim ispitanicima (izuzetak su lijekovi koji bi naštetili zdravim ispitanicima, npr. citostatici) koji se dobrovoljno javljaju na ispitivanje. Broj ispitanika vrlo je mali na početku (nekoliko desetaka). U ovoj fazi istražuje se farmakokinetika, koji su činci lijeka na organizam i sigurna doza koja bi se mogla upotrijebiti pri nekoj indikaciji. Ova faza često je otvorena, što znači se zna da se daje lijek koji se ispituje. Druga faza kliničkih ispitivanja uključuje bolesne ispitanike kojima je cilj ustanoviti „proof of concept“, tj. djeluje li lijek za neku indikaciju i kojim mehanizmom. Druga faza uključuje 100-250 ispitanika i odgovara na pitanje u kojoj dozi je lijek zapravo djelotvoran. Ova faza uključuje i istraživanje nuspojava. Treća faza počinje nakon uspješno provedene prve dvije te odgovara na pitanje je li lijek zaista siguran i učinkovit te uzima u obzir dugotrajniji period moguće pojave nuspojava. U ovoj fazi sudjeluje 1000-5000 pomno odabranih ispitanika. Nakon ove faze podnosi se zahtjev za registraciju lijeka. Ukoliko se odobri registracija, odnosno zahtjev za odobrenjem puštanja u promet, lijek se može staviti na tržište. Nakon toga slijedi faza farmakovigilancije, odnosno praćenje sigurnosti primjene lijeka, a to podrazumijeva dugotrajno istraživanje prijavljenih nuspojava lijeka (FRANCETIĆ i VITEZIĆ, 2007)..

## **4) Proces istraživanja i razvoj antimikrobnih pripravaka prirodnog porijekla**

### **4.1. Odabir biljaka**

Pripravci prirodnog porijekla istražuju se zbog mnogobrojnih učinaka, poput protuupalnih, antimikrobnih, antiparazitske, antidijabetičke i antikancerogene učinke (RIAZ A., 2018). Četiri su standardna načina pronalaženja biljaka zanimljivih s aspekta antimikrobnog djelovanja: slučajan odabir biljaka koje se potom kemijski testiraju, slučajan odabir biljaka koje se potom testiraju prema antimikrobnom djelovanju, praćenje antimikrobne djelatnosti i izvještaja o takvom djelovanju neke biljke kroz vrijeme i praćenje tradicionalne primjene biljaka protiv određenih zaraznih bolesti (FABRICANT I FARNSWORTH, 2001).

Prvi pristup koji se temelji na kemijskoj analizi često se provodi u zemljama u razvoju jer ne zahtjeva velika financijska sredstva i testovi su jednostavni za izvedbu. Traže se sekundarni metaboliti neke biljke koja pokazuje antimikrobnu aktivnost npr. alkaloidi, izotiocijanati itd. Mana ovakvog pristupa je manja specifičnost testa, tj. pronalazak većeg broja lažno pozitivnih rezultata.

U drugom pristupu gdje se biljke skupljaju i potom se istražuje njihova antimikrobna aktivnost uzimaju se svi dijelovi biljke neovisno o prijašnjem znanju i iskustvu o djelovanju neke biljke. Takve se biljke potom testiraju na različitim patogenima. Mane ovakvog načina odabira biljaka su skupoća i intenzivan i mukotrpan rad. Također, rezultati ovakvog testa uvelike ovise o panelu patogena koji neki laboratorij posjeduje kao i o kriterijima koje postave oko razine aktivnosti.

Treća metoda iskorištava velik broj istraživanja i izvješća o djelovanju neke biljke. Ova metoda može imati svoje poteškoće u pronalaženju određenih biljaka pošto neka istraživanja mogu dati kontradiktorne rezultate jer nisu pratili istu metodologiju, stoga ih je potrebno uzimati s dozom sumnje.

Četvrta metoda koristi etnomedicinske informacije bile one prenijete usmenim ili pisanim putem. Informacije iz organiziranih tradicionalnih medicinskih sustava (Ayurveda, Unani, Kampo, tradicionalna kineska medicina) mogu biti prikupljene iz mnogih izvora kao što su knjige, herbariji, pregledni članci (istražuju medicinske biljke određene regije), terenskim radom i računalnim bazama podataka npr. NAPRALERT I USDA-Duke (PAUL i sur., 2006).

Dakle, koja se god metoda odabere potrebno je prikupiti podatke o biljkama, identificirati i prikupiti biljke te njene dijelove, odrediti kemijski sastav biljaka pomoću plinske kromatografije-

masene spektrometrije, prikupiti podatke o farmakološkom djelovanju pojedinih sastojaka i krenuti u istraživanje djelovanja prirodne supstance ili ekstrakta (CHAVEERACH i sur. 2017).

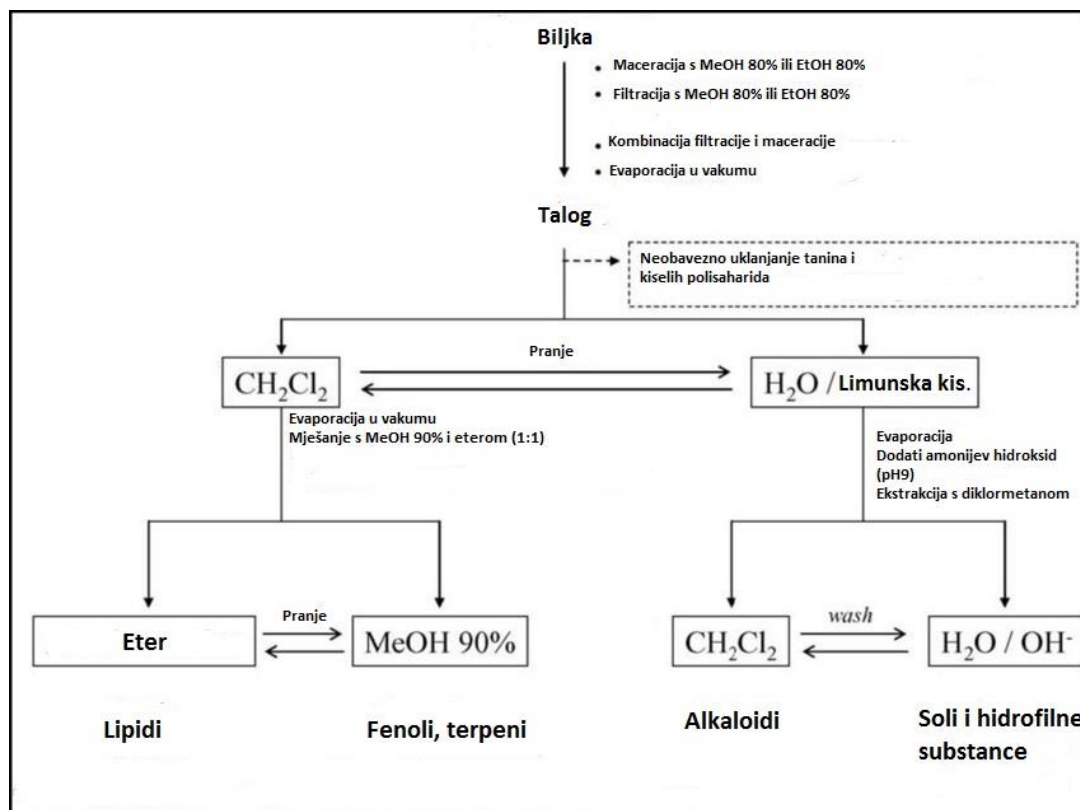
## 4.2. Priprema i ekstrakcija biljaka

Brojnim istraživanjima dokazano je da osnovu ljekovitosti neke biljke, a posebice njihove antimikrobne učinkovitosti, određuju kemijska struktura glikozida, flavonoida, saponina, tanina te eteričnih ulja, uključujući njihove brojne sastavnice (terpeni, geraniol, terpenoidi, timol, karvakrol, fenolpropani, eugenol, cimaldehid, vanilin, ketoni, alicin, izocijanati i drugi) (PEPELJNJAK, 2018).

Sastav bilja može se podijeliti u dvije skupine. Prva obuhvaća sastojke primarnog metabolizma neke biljke kao što su proteini, ugljikohidrati i masti dok druga uključuje sekundarne metabolite kao što su flavonoidi, alkaloidi, kinoni, tanini, kumarini itd. Većina sekundarnih metabolita pruža biljkama zaštitu od mikroorganizama, insekata ili biljojeda. Kemijska struktura većine sekundarnih metabolita koji pokazuju antimikrobno djelovanje sastoji se od substituiranih fenolnih prstenova koji sadrže –OH skupinu. Veći broj –OH skupina predstavlja veću toksičnost naspram mikroorganizama. S druge strane kinoni su visoko reaktivni i u kombinaciji s pojedinim aminokiselinama inaktiviraju proteine mikroorganizama (LAY i ROY, 2018).

Prvi korak u pripremi biljke za istraživanje je ekstrakcija aktivnih sastojaka. Određenim postupcima se ekstrahiraju aktivne tvari s namjerom da se pritom što manje izgube u ovom procesu. Biljni ekstrakti se pripremaju maceracijom ili filtracijom svježeg zelenog bilja ili sušenog biljnog materijala u vodi ili organskom otapalu. Za hidrofilne sastojke koriste se polarna otapala kao što su metanol, etanol, etil – acetat. Za ekstrakciju lipofilnih sastojaka koriste se diklormetan ili mješavina diklormetana i metanola u omjeru 1:1. Ponekad će se koristiti heksan za uklanjanje klorofila. Još jedan važan čimbenik kod odabira otapala je i tradicionalni način pripreme lijeka u etnomedicini. Obzirom da je često koncentracija aktivnih tvari u biljkama vrlo mala, potrebno je koncentrirati ekstrakt, uobičajeno evaporacijom u otapalu u vakuumu. Evaporacija se izvodi na niskim temperaturama kako se ne bi uništili aktivni sastojci. S druge strane koncentriranje sastojaka dovodi do precipitacije koja može dovesti do lošijih rezultata istraživanja i bioloških pokusa. Jedna od metoda koja se može koristiti za odvajanje sastojaka je i primjena različitih pH vrijednosti kako bi se odvojili kiseli, neutralni i bazični sastojci. Od mnogih shema ekstrakcije prihvaćena je ona predložena od MITSCHER i suradnika (1972) (slika 1) pošto daje logičan, jeftin, izvediv i uspješan početak. Nadalje, ukoliko logistika dopušta moguće je primijeniti „primarno“ frakcioniranje od ukupnog broja ekstrakata kako bi se odvojili polarni od nepolarnih ili manje polarnih sastojaka (VANDEN BERGE i VLIETINCK, 1991). Ovo omogućava bolju podjelu sastojaka na one koji imaju citotoksičan učinak od onih koji imaju antimikrobni potencijal.

Nakon pravilnog postupanja sa sastojcima i ekstraktima prelazi se na sljedeću fazu, in vitro testiranje.



**Slika 1.** Shema ekstrakcije biljnog materijala

(Preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Standard-scheme-for-preparation-of-plant-extracts-for-biological-screening-Mitscher\\_fig7\\_50927169](https://www.researchgate.net/figure/Standard-scheme-for-preparation-of-plant-extracts-for-biological-screening-Mitscher_fig7_50927169))

### 4.3. Odabir primjerenog testa

Iako postoji više testova za otkrivanje antimikrobnog učinka pojedinih prirodnih tvari, zlatnim standardom smatra se *in vitro* testiranje na mikroorganizmima (PAUL i sur., 2006). Osim testiranja na cijelim mikroorganizmima postoje i testovi na subcelularnoj razini gdje se testovi izvode na enzimima, receptorima i genima. Iako ovi testovi imaju svoje prednosti kao što su brže i jeftinije testiranje, jednostavna izvedba i manja količina opreme; smatra se kako su oni loš odabir pri pronalasku takozvanih pogodaka (engl. „hit molecules“) odnosno nalaženje tvari koje pokazuju antimikrobno djelovanje. Subcelularni testovi često pokazuju pogotke (engl. „hits“) kao djelotvorne, ali u daljnjoj fazi takvi spojevi se često pokazuju neuspješnima. Prirodni spojevi često su kompleksnog sastava i spojevi unutar njih mogu imati sinergistično ili antagonističko djelovanje koje se ne mora iskazati na cijelom mikroorganizmu. Neki spojevi, iako djeluju na substancijskoj razini tako da inhibiraju neki enzim, neće djelovati na cijeli mikroorganizam. Razlog tome je što neće svi sastojci ili cijeli spoj proći staničnu membranu i djelovati na uzročnika stoga bi uvijek prvi izbor i odabir testa trebao biti test primijenjen na cijele mikroorganizme (bakterije, viruse, parazite, gljivice). Uz testove koji će otkriti djeluje li neki prirodni sastojak na mikroorganizme, potrebno je istražiti i citotoksični učinak sastojak. Odabir testa ovisiti će i o uzročniku na kojeg se testira određeni prirodni sastojak.

#### 4.3.1. Odabir testa za bakterije i gljivice

Antimikrobna aktivnost prirodnih sastojaka i ekstrakata može se gledati kroz rast mikroorganizama u uzorcima u kojima su prirodni sastojci i mikroorganizmi u kontaktu. Antibakterijski i antigljivični testovi mogu se podijeliti na tri glavne grupe: difuzija, dilucija (razrjeđivanje) i bioautografija te četvrta nadolazeća metoda provodljivosti pomoću električne struje (PAUL i sur., 2006). Sve metode imaju svoje prednosti i mane, načine i uvjete izvođenja te će svaka biti objašnjena.

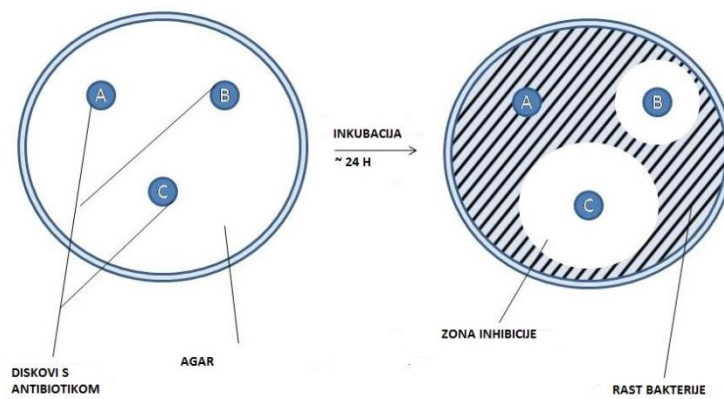
##### 4.3.1.1. Metode difuzije

###### 4.3.1.1.1. Agar-disk difuzijska metoda

Agar-disk difuzijska metoda testiranja antimikrobne osjetljivosti razvijena je 1940. godine i najčešće je primjenjivana metoda u kliničkim mikrobiološkim laboratorijima pri izvođenju antibiograma tj. testa za otkrivanje osjetljivosti i rezistencije bakterija na pojedine antibiotike. Ovom metodom nije moguće provjeriti osjetljivost svih patogenih mikroorganizama. Standardiziran je za patogene kao što su *Streptococcus spp*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis* upotrebljavajući specifične uvjete inkubacije, medija te

kriterija za inhibicijsku zonu (MOUNYR i sur., 2016). Ova metoda vrlo je jednostavna za izvođenje, jeftina je i brzo daje rezultat (18 – 24 sata nakon izolacije i identifikacije bakterija) te omogućuje ispitivanje većeg broja antibiotika ili ekstrakata u isto vrijeme. Izvodi se pomoću filter diskova (oko 6 mm promjera), hranjive podloge odgovarajuće debljine koja je inokulirana patogenom. Medij u kojem raste patogen, temperatura, vrijeme inkubacije i koncentracija bakterija određen je prema CLSI standardima (MOUNYR i sur., 2016). Metoda se izvodi tako da se natopljeni diskovi određene koncentracije postavljaju na čistu bakterijsku kulturu te se mjeri promjer tj. veličina zone inhibicije (BUBONJA i sur. 2008). Agar difuzijska metoda daje kvalitativne rezultate i označava ispitani uzorak kao osjetljiv, umjereno osjetljiv i rezistentan. Ova metoda odličan je prvi izbor u ispitivanju osjetljivosti neke bakterije. Jednostavna je za izvedbu, nije skupa, moguće je testirati velik broj ekstrakata u relativno malo vrijeme te je relativno jednostavna za očitavanje. Sve ove prednosti dovele su do toga da se ova metoda vrlo često koristi kao test probira antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata, esencijalnih ulja i drugih lijekova. Nedostaci ove metode su nemogućnost određivanja bakteriostatskog ili baktericidnog učinka lijeka, nije pogodna za određivanje MIK (minimalna inhibitorna koncentracija). Minimalna inhibitorna koncentracija definirana je kao najniža koncentracija antimikrobnog sredstva koja će inhibirati vidljivi rast mikroorganizma nakon inkubacije (M. ANDREWS J., 2001).

Predloženi protokol za agar disk difuziju: u Petrijevu zdjelicu doda se 20 ml hranjive podloge koja se ostavi na sobnoj temperaturi kako bi se osušila. Zatim se sterilnim priborom nacijepi bakterija protiv koje se želi testirati antimikrobni pripravak i inkubira se pola sata na 37°C. Nakon pola sata dodaju se diskovi (diskovi su promjera 6mm i natopljeni s 10µl pripremljenog uzorka). Petrijeva zdjelica inkubira se preko noći na 37°C i idući dan se očituju zone inhibicije. Također ovaj protokol može biti promijenjen upotrebom TWEEN 80 (detergent koji se koristi za stvaranje emulzija ulje u vodi, koristi se kako bi se pojačao rast bakterija). TWEEN 80 dodaje se ili u hranjivu podlogu (10ml koncentracija 0,2%, 0,1% i 1%) ili dodatkom u uzorak prije dodavanja na diskove (u koncentracijama 0,5%, 1%, 2,4%, 5%). Treba napomenuti kako koncentracija TWEEN-a 80 može utjecati na veličinu zone inhibicije. (PATI i KURADE, 2004)

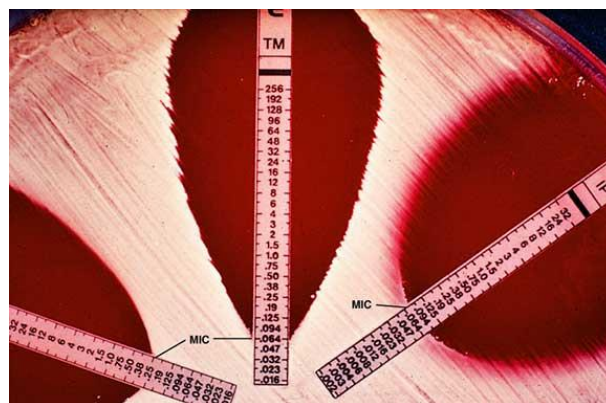


**Slika 2.** Agar disk difuzija

*Preuzeto s [https://en.wikipedia.org/wiki/Disk\\_diffusion\\_test](https://en.wikipedia.org/wiki/Disk_diffusion_test)*

#### 4.3.1.1.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (E-test)

Jedna od metoda određivanja MIK-a temelji se na kombinaciji difuzije i dilucije tj. razrjeđivanja. Test se izvodi tako da se postavi trakica s antibiotikom ili ekstraktom s rastućom koncentracijom antimikrobnog pripravka na agar s prethodno nacijepljenim pretraživanim patogenom. MIK vrijednost se očitava na križanju trakice i elipse zone inhibicije. Ova metoda ima prednost jer može odrediti MIK vrijednost, ali ne primjenjuje se često zbog toga što je relativno skupa, svaki komercijalni test s trakicom košta oko 15 – 20 kuna te nije pogodan za testiranje velikog broja pripravaka (JORGENSEN i FERRARO, 2009).



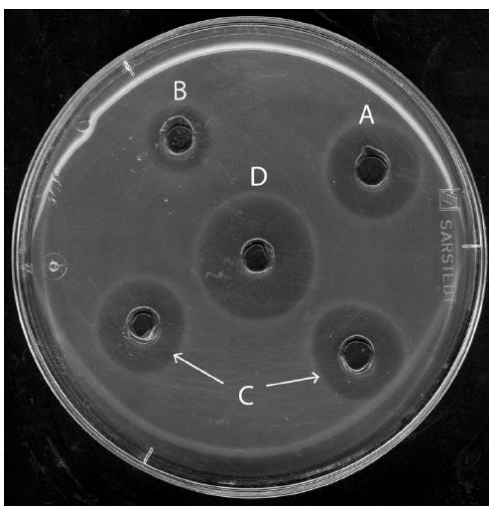
**Slika 3.** Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije metodom difuzije

*(Preuzeto s <https://microbiologynotes.com/e-epsilometer-test-principle-purpose-procedure-result-interpretation-with-precaution-advantages-and-disadvantages/>)*



#### 4.3.1.1.3. Metoda difuzije bušenjem rupica u agaru

Metoda difuzije bušenjem rupica u agaru vrlo je rasprostranjena metoda ispitivanja antimikrobne osjetljivosti biljaka, biljnih ekstrakata i mikrobnih ekstrakata. Ova metoda se izvodi tako što se na prethodno pripremljeni agar nacijepi određeni patogen te se izbuše rupice u agaru promjera 6-8 mm pomoću sterilnog bušača rupa volumena 20-100  $\mu$ l. U rupice se pomoću sterilne pipete stavi određeni ekstrakt ili pripravak željene koncentracije (MOUNYR i sur., 2016). Prednosti metode su jednostavna izvedba, brzina izvođenja i niska cijena (VALGAS i sur., 2007). Ova metoda također je



**Slika 4.** Metoda difuzije bušenjem rupica u agaru

(Preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Agar-well-diffusion-test-showing-inhibition-of-Listeria-innocua-HPB-13-by-divergicin-M35\\_fig1\\_24361856](https://www.researchgate.net/figure/Agar-well-diffusion-test-showing-inhibition-of-Listeria-innocua-HPB-13-by-divergicin-M35_fig1_24361856))

kvalitativna i nije predviđena za određivanje MIK neke tvari.

#### 4.3.1.2. Tankoslojna kromatografija (TLC) – bioautografija

Godine 1946. Goodal i Levi kombinirali su papirnatu kromatografiju (PC) s bioautografijom kako bi detektirali različite penicilinske pripravke. Poslije toga Fisher i Lautner uvode tankoslojnu kromatografiju u ovo područje (MOUNYR i sur., 2016). Biljni pripravci koji nisu topivi u vodi kao što su esencijalna ulja nemoguće je testirati metodama difuzije i dilucije, stoga je za takve pripravke potrebno optimizirati i reproducirati testove koji su pogodni za ovakva ulja (HORVATH i sur., 2010). Rješenje problema moglo bi se naći u tankoslojnoj kromatografiji u kombinaciji s bioautografijom. To je učinkovita i jeftina tehnika za istraživanje biljnih spojeva kako bi se odredile bioaktivne supstance te joj je prednost u tome što se može izvoditi i u skupim i softificiranim kao i u manje opremljenim laboratorijima (DEWANJEE i sur., 2015). Tri metode bioautografije su opisane za istraživanje antimikrobne osjetljivosti prirodnih pripravaka: agar difuzija, direktna bioautografija, tehnika prekrivanja agara.

##### 4.3.1.2.1. Agar difuzija

Agar difuzija ili kontaktna bioautografija uključuje difuziju antimikrobnog pripravka s kromatograma na agar ploču nasadenu odgovarajućim mikroorganizmom. Ova metoda je najmanje korištena tehnika od navedenih bioautografija (MARSTON A., 2011). Pripremljeni kromatogram s ispitujućom tvari položen je na nacijspljeni agar. Agar se nacijsplji s odgovarajućim mikroorganizmom. Nakon odgovarajućeg vremena (kako bi se omogućila difuzija ispitujuće tvari) miče se kromatogram s agara. Agar se potom inkubira (16 – 24 sata). Osjetljivost mikroorganizma se očituje kao zona inhibicije na površini (DEWANJEE i sur., 2015). Nedostaci kontaktne bioautografije su poteškoće u postizanju potpunog kontakta između agara i ploče te je glavni problem ove metode nepredvidiva difuzija tj. nejednaka difuzija sastojaka biljaka, posebno onih netopivih u vodi (MARSTON A., 2011).

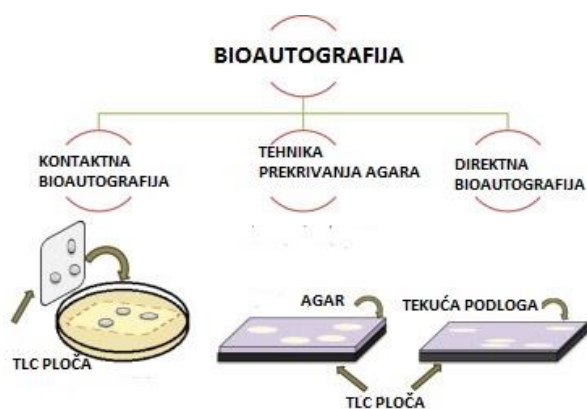
##### 4.3.1.2.2. Direktna bioautografija

U direktnoj bioautografiji pripremi se TLC (engl. *Thin Layer Chromatography*) ploča (TLC ploča je staklena, metalna ili plastična ploča na koji je nanesen određeni adsorbens (npr. silikagel), na koju se potom nanese kap ispitivane tvari te se pomoću otapala na temelju različitih fizikalno – kemijskih svojstava komponente neke smjese razdvajaju na pojedine sastojke) s biljnim pripravkom gdje se su različite komponente pripravka odvojile na kromatogramu. Potom se kromatogram naspreja ili namoči suspenzijom mikroorganizma. Prema radu G. SCHMOURLO i suradnika (2004) dovoljno je

upotrijebiti suspenziju koja sadrži  $10^6$  CFU/ml za bakterije i gljivice. Potom se bioautogram inkubira 48 sati na  $25^\circ\text{C}$  u vlažnim uvjetima. Kako bi se reakcija očitovala koriste se tetrazolium soli koje se uz enzim dehidrogenazu u prisutstvu mikroorganizama pretvaraju u formazan koji se intenzivno boji. Kada se soli tetrazolium dodaju na bioautogram, on se ponovno inkubira 24 sata na  $25^\circ\text{C}$  ili 3 – 4 sata na  $37^\circ\text{C}$ . Reakcija te potvrda antimikrobne aktivnosti očituje se bijelim zonama inhibicije na ljubičastom papiru (DEWANJEE i sur., 2015). Za uzgoj mikroorganizama koristi se mješavina Muller – Hintonog tekućeg agara i MH krutog agara u omjeru 90:10 (OKUSA i sur., 2010). Direktna bioautografija koristi se za otkrivanje antimikrobne aktivnosti biljaka protiv gljivica iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium* kao i protiv bakterija *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*.

#### 4.3.1.2.3. Tehnika prekrivanja agara

Tehnika prekrivanja agara kombinacija je direktne bioautografije i kontaktne bioautografije. Ona se izvodi tako da se načini suspenzija pretraživane bakterije u odgovarajućem agaru te se nježno razmaže po već pripremljenoj TLC ploči. Ploča se zatim inkubira nekoliko sati u vlažnim uvjetima. Aktivni sastojci difuzijom prelaze na mikroorganizme (MARSTON A., 2011). Poslije inkubacije i difuzije potrebno je reakciju učiniti vidljivom, a to omogućavaju soli tetrazoliuma koji se uz prisutstvo dehidrogenaze pretvaraju u formazen ljubičaste boje. Zona inhibicije očituje se bijelom bojom na ljubičastoj podlozi. Za Gram negativne bakterije moguće je upotrijebiti crveno obojanu bakteriju *Serratia marcescens*. Na ovakvoj podlozi nakon inkubacije pojaviti će se bijele ili žučkaste zone inhibicije na crvenoj podlozi (DEWANJEE i sur., 2015). Ova tehnika može se koristiti za otkrivanje antimikrobne aktivnosti biljnih pripravaka protiv gljivice *Candida albicans* i bakterije *B. subtilis* (RAHALISON i sur., 1991) te bakterija *E. coli*, *S. aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (SAXENA i sur., 1995).



**Slika 5.** Usporedba metoda tankoslojne kromatografije

(Preuzeto s <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012417223400011X>)

#### 4.3.1.3. Metode dilucije

Metode dilucije najprikladnije su za određivanje MIK vrijednosti pošto one omogućuju određivanje koncentracije testiranog antimikroba, kako na tvrdoj podlozi (agar dilucija) tako i na tekućoj podlozi (makrodilucija ili mikrodilucija). Nadalje, na obje podloge moguće je određivati *in vitro* MIK vrijednosti bakterija i gljivica (MOUNYR i sur., 2016). Test se može izvoditi na tekućoj ili čvrstoj podlozi tako da se antibiotik serijski razrjeđuje, inkorporira u bakteriološku podlogu i zatim se u nju (ili na nju) inokulira ispitivani soj bakterije. Nakon inkubacije od 18 do 24 sata na 35 °C – 37 °C gleda se prisutnost zamućenja (bujona) ili porast kolonija (na čvrstoj) podlozi. Koncentracija antibiotika, koja se nalazi u prvoj podlozi (u nizu), u kojoj nema porasta bakterija, naziva se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i izražava se mg/L ili µg/ml (SMILJA KALENIĆ i sur, 2013).

Za izvođenje testova dilucije mnogi laboratoriji diljem svijeta voditi će se smjernicama pruženim od CLSI i EUCAST-a (MOUNYR i sur., 2016). Smjernice su praktične i sadrže uniformne procedure testiranja koje se mogu provesti u većini svjetskih laboratorija. Iako standardizirani postupci ne garantiraju nužno i kliničku važnost omogućuju standardiziran pristup bioanalizi i procjenu različitih rezultata kliničkih ispitivanja (PFALLER i sur., 2004).

##### 4.3.1.3.1. Izvođenje testova dilucije na tekućoj podlozi

Izvođenje dilucijske metode na tekućoj podlozi može se podijeliti na mikrodiluciju i makrodiluciju. Ove dvije metode jedne su od najosnovnijih testova za određivanje osjetljivosti mikroorganizama na antimikrobne pripravke. Postupak izvođenja testova uključuje pripremu dvostrukih razrjeđenja antimikrobnog sredstva ( npr. 1, 2 ,4, 8, 16, 32 µg/ml) u tekućoj podlozi u epruvetama minimalnog volumena 2 ml (makrodilucija) ili u mikrotitracijskim jažicama (mikrodilucija) (MOUNYR i sur., 2016). Nakon toga svaka epruveta ili jažica inokulira se ispitanim mikroorganizmom koncentracije  $5 \times 10^5$  CFU/ml te se svi sastojci testa miješaju. Potom se epruvete ili jažice inkubiraju pod uvjetima koje zahtijeva testni mikroorganizam.

Mikrodilucijska metoda za određivanje MIK vrijednosti podrazumijeva upotrebu mikrotitracijskih jažica, pri čemu ukupna zapremina u jažici ploče ne prelazi zapreminu od 500 µL (WIEGAND i sur., 2008). Standardne mikrotitracijske ploče imaju zapreminu 12x8 jažica (ukupno 96) stoga se može ispitivati 12 antimikrobnih pripravaka u 8 koncentracija ili 8 antimikrobnih pripravaka u 12 koncentracija. Mikrotitracijske ploče mogu se proizvoditi u laboratoriju u kojem se ispituje antimikrobna osjetljivost ili postoje komercijalne ploče koje u svojim jažicama imaju dehidrirani antibiotik u odgovarajućim koncentracijama (LEDINA i sur, 2018).

Rezultati kod makrodilucijske metode se očituju na osnovi zamućenja bujona, a kod mikrodilucijske metode na osnovu prisutstva ili odsustva sedimenta u mikrotitracijskoj jažici. Također su razvijene metode spektrofotometrijskom određivanja upotrebom tetrazolijskih soli.

Prednosti postupka mikrodilucije uključuju mogućnost upotrebe velikog broja pripremljenih ploča te ekonomičnost reagensa i prostora do kojih dolazi uslijed minimalizacije testa. Dodatna pomoć može se naći u računalnim izvještajima ako se koristi automatizirani čitač ploča. Nadalje, nekoliko kolorimetrijskih metoda je razvijeno temeljenih na upotrebi bojila kao što su soli Tetrazoiuma, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl), 2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) i 2,3-bis{2 methoxy-4-nitro-5-[(sulfenylamino)carbonyl]-2H- tetrazolium-hydroxide}(XTT). Alamar plava boja (rezasurin) također se može koristiti u svrhe detekcije (MOUNYR i sur., 2016). Glavni nedostatak metode mikrodolucije je limitirani izbor lijekova dostupnih u standardnim komercijalnim panelima.

Prednost makrodilucijske metode je u tome što je ona bila jedna od prvih razvijenih metoda za otkrivanje osjetljivosti neke bakterije prema ispitivanim antibioticima. Danas se makrodilucijska metoda rijetko upotrebljava zbog svojih mnogih mana. Glavni nedostaci makrodilucijske metode su naporna priprema antibiotskih otopina za svaki test koje osoblje mora samo pripremiti, mogućnost pogrešaka u pripremi otopina antibiotika i relativno velika količina reagensa i prostora potrebnog za svako ispitivanje (JORGENSEN i FERRARO, 2009).

Na MIK vrijednost utječu količina bakterija, vrsta tekuće hranjive podloge, vrijeme inkubacije i način pripreme inokuluma.

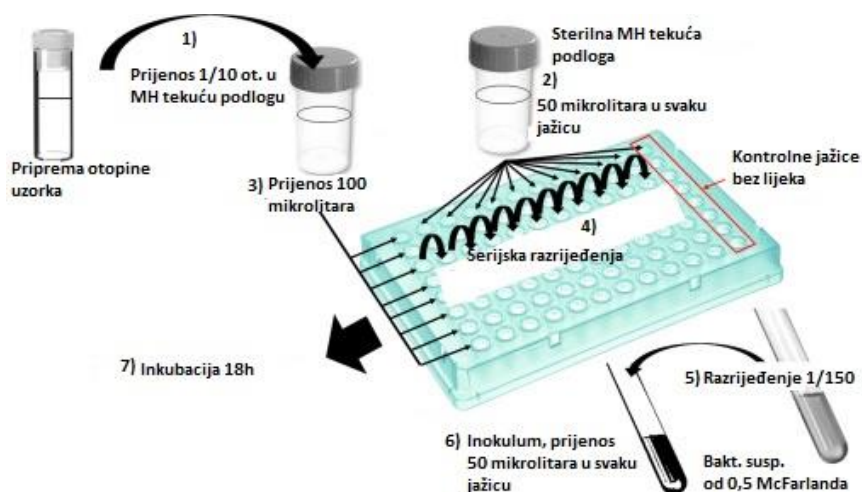
U istraživanju koje su proveli GOMEZ-LOPEZ A. i suradnici 2005. godine na sojevima *Aspergillus spp.* dobiveni rezultati sugeriraju kako nisu pronađene promjene u MIK vrijednosti s hranjivom podlogom kojoj je dodano 2% glukoze naspram obične hranjive podloge (korištena je Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 podloga) nakon čak 100h inkubacije, a MIK vrijednosti nisu lažno povišene kada je korišten inokulum veličine  $10^5$  CFU / ml.

Zapažen je značajan utjecaj sufraktanta na rezultate MIK-a *Aspergillus*. Više MIK vrijednosti dobiveni su kada su za koncentriranje inokuluma korištene velike koncentracije TWEEN-a koji se koristio kako bi se olakšala priprema spora *Aspergillus spp.* TWEEN 20 je neionski deterdžent koji se široko koristi u biokemijskim primjenama. Koristi se kao emulgator za pripremu stabilnih emulzija ulje-u-vodi.

U istom istraživanju pokazalo se kako je inhibitorni učinak TWEEN-a bio dramatičan za itrakonazol i terbinafin i posebno značajan za izolate *A. terreus*. Vrijeme inkubacije značajno je utjecalo na krajnje MIK vrijednosti. Zabilježena je značajna razlika između 24 i 48 h, razlika koja se može objasniti činjenicom da je mnogim izolatima bilo potrebno 48 sati za postizanje rasta koji se

mogao detektirati. Međutim, razlike između očitavanja MIC vrijednosti tijekom 48 i 72 h bile su minimalne za većinu analiziranih antifungalnih lijekova.

Ako se u dilucijskoj metodi u bujonu, nakon inkubacije od 18 do 24 sata, podloge bez vidljivog porasta bakterija subkultiviraju na čvrstu podlogu bez antibiotika, može se odrediti i minimalna baktericidna koncentracija (MBK), tj. ona najniža koncentracija antibiotika koja ubija određenu bakteriju, a izražava se također u mg/L (SMILJA KALENIĆ i sur, 2013). Na isti način može se odrediti i minimalna fungicidna koncentracija (MFK) koje zajedno možemo nazvati minimalna letalna koncentracija (MLK). Kod određivanja MBK potrebno je odrediti koncentraciju antimikrobnog pripravka koji uništava 99,9% ( $\geq 3$ -log 10) inokuluma, dok je kod određivanja MFK potrebno odrediti koncentraciju antimikrobnog pripravka koji uništava 98-99,9% ( $\geq 3$ -log10) inicijalnog inokuluma (ARIKAN S.,2007).



**Slika 6.** Mikrodilucija

(Preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Broth-microdilution-for-antibacterial-testing-as-recommended-by-CLSI-protocol\\_fig4\\_285656686](https://www.researchgate.net/figure/Broth-microdilution-for-antibacterial-testing-as-recommended-by-CLSI-protocol_fig4_285656686))

#### 4.3.1.3.2. Test dilucije na tvrdoj podlozi

Test agar dilucije uključuje pripremu različitih koncentracija antimikrobnog pripravka na agar podlozi. Test se izvodi tako da se pripreme padajuća dvostruka razrjeđenja ispitivanog antimikrobnog pripravka (npr. 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 itd.), pripremljene koncentracije pripravka miješaju se s agarom i stavljaju u Petrijeve zdjelice. Potom se na agar pločama s dvostrukim razrjeđenjima antimikrobnog pripravka inokulira ispitivani mikroorganizam. Ovaj test prikladan je i za ispitivanje osjetljivosti bakterija i gljivica. Prednost agar dilucije je u tome što se može istovremeno ispitivati osjetljivost vrlo velikog broja mikroorganizama i točno određivanje minimalnih inhibicijskih koncentracija (MIK) kada se koristi puni raspon razrjeđenja antimikrobnog sredstva. Također, može se upotrijebiti ukoliko se MIK vrijednost ne može detektirati na tekućoj podlozi (kada spoj ili ekstrakt zamaskira rast mikroorganizma svojim bojenjem). Metoda agar dilucije poznata je i kao zlatni standard pri testiranju osjetljivosti na antimikrobne lijekove, međutim rijetko se izvodi zbog potrebne velike količine radne snage. Ova tehnika zahtijeva opsežnu obuku osoblja i može biti skuplja i zahtjevnija prilikom testiranja mnogih organizama na veliki broj antimikrobnih pripravaka nego druge metode ispitivanja (VARELA i sur., 2008).

Agar dilucija je u pozitivnoj korelaciji s E-testom ( $91,2 \pm 1,5\%$  za gram-pozitivne bakterije i  $92,5 \pm 0,7\%$  za gram-negativne bakterije) vjerojatno jer su MIK vrijednosti dobivene na tvrdoj podlozi (BAKER i sur., 1991).

#### 4.3.1.4. *Time-kill test (Time-kill krivulja)*

*Time-kill* testovi omogućuju procjenu brzine baktericidne aktivnosti u različitim koncentracijama antimikrobnog pripravka tijekom vremena. Iako su ova ispitivanja dugotrajna i naporna jer zahtijevaju 24 satnu inkubaciju, *time-kill* test može usporediti kombinirano djelovanje dvaju ili više antimikrobnih pripravaka. Rezultati analize *time-kill* testa obično su prikazani grafički, prikazujući preživjeli broj kolonija i koncentraciju testiranog antimikrobnog pripravka u određenom vremenu (0, 4, 8, 12 i 24 sata) (JENKINS i SCHUETZ, 2012).

*Time-kill* test najprikladniji je za određivanje djeluje li neki antimikrobni pripravak tako što ubija (baktericidno ili fungicidno) ili tako što zaustavlja rast bakterija ili gljivica (bakteriostatski ili fungistatski). Za bakterije ovaj test je standardiziran i opisan u dokumentu M26-A (CLSI). Test se provodi u tekućem mediju pomoću tri epruvete koje sadrže bakterijsku suspenziju koncentracije  $5 \times 10^5$  CFU / mL. Prva i druga epruveta sadrže ispitivani antimikrobni pripravak obično u krajnjoj koncentraciji od  $0,25 \times \text{MIK}$  i  $1 \times \text{MIK}$ , a treća epruveta služi kao kontrola rasta. Inkubacija se vrši u pogodnim uvjetima kroz 24h. Potom se računa postotak uginulih bakterija u prve dvije epruvete tako

da što se uspoređuje broj uginulih bakterija naspram treće epruvete koja je služila kao kontrola rasta. Brojanje bakterija i izračun postotka uginulih radi se na PCA agaru (Plate Count Agar). Baktericidni učinak postiže se postotkom smrtonosnosti od 90% za 6h, što je ekvivalent smanjenju od 99,9% za 24h (MOUNYR i sur., 2016). Naposljetku izradom *time-kill* krivulje moguće je pomoću farmakokinetičkih i farmakodinamičkih modela odrediti prikladnu dozu antimikrobnog pripravka (*in silico*) (MUELLER i sur., 2004).

#### **4.3.1.5. Odabir mikroorganizama i hranjive podloge za izvođenje metoda**

Izbor mikroorganizama koji će sudjelovati u određenoj metodi ovisi o cilju istraživanja. U prvotnom izvođenju testova kada se testira velik broj pripravaka poželjno je upotrijebiti na antibiotik ili antimikotike osjetljive mikroorganizme.

Test bi trebao sadržavati predstavnike Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Pripravci koji pokazuju potencijal i aktivnost protiv Gram pozitivnih koka bilo bi poželjno testirati na metilicilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) i vankomicin rezistentnog enterokoka (VRE) (PAUL i sur., 2006). Problem kod otpornosti mikroorganizama je i stvaranje biofilma. Biofilm je danas definiran kao sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno, uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile, a imaju izmijenjen fenotip uslijed promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena koje ne uočavamo u planktonskih organizama (VRANEŠ i LESKOVAR, 2009). Stoga se u testovima preporučuje korištenje neke bakterije koja stvara biofilm (npr. *Staphylococcus aureus* ATCC6538).

Kao predstavnike dermatofita predlaže se korištenje *Trichophyton mentagrophytes* i *Epidermophyton floccosum*. Za oportunističke nitaste gljivice *Aspergillus niger* i *Fusarium solari*.

Najčešće upotrebljavana hranjiva podloga za bakterije je Muller-Hinton (MH) agar ili tekuća podloga. Uz nju može se koristiti još i podloge kao što su Tryptic soy agar (TSA) i Tryptic soy broth (TSB). Za bakterije koje zahtijevaju posebne uvjete rasta koristiti će se prikladne hranjive podloge s dozom opreza. Npr. dodatkom ovčje krvi u MH agar povećava se MIK vrijednost flavomicina s 0,12 na 256 mg/l (BUTAYE i sur., 2000).

MH podloga predstavlja standard i zadovoljava većinu zahtjeva (moguće je usporediti različite antimikrobne pripravke, dobra je za rast mnogih bakterija i sadrži malen broj antagonista) za obavljanje testova. Pri testiranju antimikrobne tvari na gljivicama koristi se Sabouraud agar (SAB) (PAUL i sur., 2006).

#### **4.3.2. Odabir testa za viruse**



Dokazivanje antivirusne aktivnosti uključuje antivirusnu efikasnost i staničnu toksičnost. Virusi rastu na različitim staničnim kulturama i gotovo je nemoguće dizajnirati jedinstveni antivirusni test koji bi se mogao primijeniti na sve viruse. Dostupno je nekoliko metoda za otkrivanje virucidne ili inhibicijske antivirusne aktivnosti. Istraživanje može biti usmjereno na citopatogeni učinak virusa, stvaranje plakova ili proliferativni učinak na stanične kulture. Test inhibicije citopatogenog učinka, CPE prikazuje morfološke promjene u stanicama uzrokovane citopatogenim virusom. Uobičajeni primjeri citopatogenog učinka uključuje zaokruživanje zaražene stanice, fuziju sa susjednim stanicama te nastanak sincicija i pojavu nuklearnih ili citoplazmatskih tijela. Ovo je najisplativiji i vremenski najučinkovitiji test, ali koristi se samo kod virusa s ovim učinkom. Kod testa koji gleda redukciju stvaranja plakova virusa, virus ima sposobnost stvaranja plakova zaraženih stanica. Plakovi se otkrivaju ili kao mrtve stanice detektirane staničnim mrljama ili kao područja zaraženih stanica koja mogu biti obojana posebnom bojom. Kod testa redukcije plaka gleda se smanjenje stvaranja takvih područja nakon primjene testnog pripravka. Reprodukcijska virusa može se testirati detekcijom virusnih produkata poput DNK, RNK ili polipeptida. Jedan od testova koji se ovdje može koristiti je lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu gdje će se gledati smanjenje količine DNK ili RNK virusa nakon primjene nekog pripravka. Treba napomenuti da se u antivirusnim testovima često istražuju aktivne tvari koje sprječavaju adsorpciju mikroorganizma u stanicu domaćina. Ova se aktivnost zanemaruje u postupcima provjere antibakterijskih i gljivičnih tvari iako ima dokaza o antiadhezivnim svojstvima antibakterijskih tvari. Preporučljivo bi bilo što češće procijenjivati antimikrobne pripravke biljnog porijekla na ovakvo djelovanje, osim na baktericidno i bakteriostatsko djelovanje (COWAN, 1999).

Predloženi virusni paneli uključuju *Herpes simplex* virus (HSV) i adenovirus kao predstavnike DNK virusa i *coxsackievirus* kao predstavnika RNK virusa. *Coxsackievirus* predstavlja obitelj *Picornaviridae*, koji uključuje rinoviruse i enterovirus (PAUL i sur., 2006).

Ključni dio testiranja antivirusnih pripravaka je određivanje indeksa selektivnosti (SI). Indeks selektivnosti se odnosi na omjer maksimalne koncentracije lijeka izazivajući 50% ili 90% inhibicije rasta normalnih stanica ( $CC_{50}$ ,  $CC_{90}$ ) i minimalnu koncentraciju lijeka koja inhibira rast 50% ili 90% virusa ( $IC_{50}$ ,  $IC_{90}$ ). Stanična kultura koja se koristi u testu ovisiti će o osobinama pretraživanog virusa. Najčešće stanične linije koje se koriste su VERO (stanična linija koja se dobiva iz epitelnih stanica bubrega afričkog zelenog majmuna) i MRC-5 (diploidna linija ljudske stanične kulture sastavljena od fibroblasta plućnog tkiva 14-tjednog pobačenog muškog ploda izdvojenih 1966. god.).

### 4.3.3. Odabir testa za parazite

Paraziti su jednostanični (protozoa) ili višestanični (helminti, artropodi) organizmi koji preživljavaju živeći unutar drugog, u pravilu većeg organizma. Svi paraziti imaju specifične životne cikluse. Parazitarne bolesti imaju veliki značaj u zemljama u razvitku. Preko pola ljudske populacije boluje od najčešćih parazitarnih bolesti kao što su bolest spavanja, malarije, lišmanioze, Chagasove bolesti koje prevladavaju u tropskim i subtropskim krajevima (MONZOTE, 2014). Iako su se uložili veliki naponi za razvitak cjepiva protiv parazitarnih bolesti, niti jedno cjepivo nije učinkovito u borbi protiv parazitarnih invazija. Jedini način suzbijanja parazitarnih invazija je nespecifična prevencija i kemoterapeutici. Nedostatak kemoterapeutika je posljedica visoke cijene, razvitka rezistencije, loše učinkovitosti postojećih sredstava i nedovoljna sigurnost primjene.

Pri proučavanju antimikrobnih pripravaka koji djeluju na parazite teško je postaviti određeni test i upotrijebiti ga za veći broj vrsta obzirom su paraziti vrsno specifični. Zbog svoje specifičnosti u ovom radu prikazani su oni testovi za one parazite koji predstavljaju najveći rizik za ljudsko zdravlje tj. javno zdravstvo. Iako su testovi za parazite specifični potrebno je držati se nekih pravila. Potrebno je koristiti sojeve koji su osjetljivi na već poznate antihelmintike te kliničke sojeve upotrebljavati u kasnijim stadijima istraživanja. Tehnike očitavanja rezultata mogu biti vrsno specifične, ali preporučljivo je korištenje najjednostavnijih metoda. Tako će jednostavno bojenje po Giemsi dati odlične rezultate za uzročnike malarije, lišmanioze i američke tripanosomijaze (Chagasove bolesti). Rezultati se izražavaju kao postotak redukcije broja parazita u usporedbi s kontrolom (PAUL i sur., 2006).

#### 4.3.3.1. *Leishmania spp.*

Kod provođenja istraživanja bitno je koristiti vrste osjetljive na već poznate medikamente. U slučaju *Leishmania spp.* predlaže se korištenje vrsta koje uzrokuju visceralni tip bolesti. Vrste koje uzrokuju visceralni tip su *L. donovani* i *L. infantum*. Osim što predstavljaju najveću prijetnju ljudskom zdravlju za ove vrste postoje referentni lijekovi s kojima je moguće usporediti rezultate istraživanih pripravaka. U istraživanjima bi trebalo izbjegavati upotrebu promastigota (razvojni ciklus lišmanija odvija se u fazi promastigota u vektoru i amastigota u domaćinu).

Za pripremu uzorka koriste se slezene zaraženih sisavaca (npr. hrčak), a za staničnu kulturu koriste se mišji peritonealni makrofazi. Nakon pripreme uzorka stanice makrofaga prenesu se na mikrotitracijske pločice (uzima se  $10^4$  stanica po pločici i  $10^5$  amastigota) te se inkubira 5 dana. Potom se gleda postotak preživljavanja amastigota pomoću metode bojanja po Giemsi (PAUL i sur., 2006).

#### **4.3.3.2. *Trypanosoma spp.***

Uzročnici iz roda *Trypanosoma* uzrokuju razne parazitarne bolesti. Dvije najznačajnije bolesti su bolest spavanja i Chagasova bolest. Bolest spavanja uzrokuju dvije vrste *Trypanosoma brucei gambiense* i *Trypanosoma brucei rhodesiense* i prenosi ju ce-ce muha. Za istraživanje se uzima soj koji je za čovjeka nepatogen i osjetljiv na kemoterapeutike *Trypanosome brucei*. Uzima se krv zaraženih životinja u kojoj se nalaze tripomastigoti koji se uzgajaju na Hirumi 9 mediju (HMI) na 37°C u atmosferi 5% CO<sub>2</sub> (PAUL i sur., 2006). Test se provodi na pločici s 96 jažica gdje svaka sadrži 10<sup>4</sup> parazita i ispitivani lijek. Nakon inkubacije od 4 dana rast parazita procijenjuje se dodatkom boja rezasurina ili Alamar blue boje fluorometrijskim očitanjem.

Chagasova bolest ili američka tripanosomoza uzrokovana je s vrstom *Trypanosoma cruzi* kod rizika od širenja u zajednicu moraju se poduzeti sve mjere biosigurnosti kod istraživanja ovog patogena u posebnim laboratorijima. U ispitivanjima uzima se Tulahuen soj *T. cruzi* koji je osjetljiv na nifurtimox i uzgaja se na MRC-5 staničnoj kulturi. Test se provodi na mikrotitracijskoj ploči s 96 jažice gdje svaka jažica sadrži 3x10<sup>3</sup> MRC-5 stanica i 3x10<sup>4</sup> parazita. Nakon inkubacije rezultate je moguće očitati pomoću Almar blue boje (PAUL i sur., 2006).

#### **4.3.3.3. *Plasmodium spp.***

Kao i kod ostalih parazita bitno je uzeti soj koji je osjetljiv na već poznate kemoterapeutike i jedan koji je rezistentan. Parazita je potrebno održavati u eksponencijalnoj fazi rasta u RPMI-1640 mediju s dodatkom 10% ljudskog seruma ili govedeg albumina i 4% ljudskih eritrocita. Uzgaja se na 37°C i u mikroaerofilnim uvjetima (7% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub> i 92% N<sub>2</sub>) (TRAGER I JENSEN, 1976). Testiranje se provodi u mikrotitracijskim pločama. Svaka jažica sadrži inokulum koji sadrži parazite i ispitivanu tvar koja se dodaje u dvostrukim razrjeđenjima. Inokulum se priprema tako da se uzme krv zdravih donora krvi. Krv se potom razrjeđuje antikoagulansom (npr. citrat fostat dekstroza) kako bi se dobio 2% hematokrit i parazitemija od 1% (CORBETT i sur., 2004). Poslije 72h inkubacije ploče se mogu čuvati na -20°C. Prije izvođenja testa 20µl suspenzije hemoliziranih parazita iz svake jažice se prenesu na novu ploču uz dodatak 100µl Malstat reagensa i 10µl mješavine PES (fenazin ethnosulfat) i NBT (Nitro Blue Tetrazolium Grade III) u omjeru 1/1 kako bi mogli očitati promijenu broja mikroorganizma. Ploče se zatim drže u mraku 2 h i promjena boje se očitava spektrofotometrijski na 655 nm. Može se koristiti i obično bojanje po Giemsi (PAUL i sur., 2006).

## 4.4. Toksikološka ispitivanja

Prednosti *in vitro* testova toksičnosti su niža cijena u odnosu na *in vivo* testove, mogućnost ponavljanja testa tj. standardizacija i brzina izvođenja te dobrobit eksperimentalnih životinja. Također, primjenom staničnih kultura u kratkom se vremenu može analizirati veliki broj tvari u različitim koncentracijama. Nedostaci primjene su nepotpuna ili u potpunosti odsutna metabolička aktivnost ispitivane tvari u staničnim sustavima, s obzirom da stanice ipak imaju izmijenjena svojstva u odnosu na ishodne stanice, te mogućnost reagiranja ispitivane tvari sa sastojcima medija (RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ i sur., 2016).

Test redukcije tetrazoliuma, redukcija rezasurina i aktivnost proteaze su testovi koji mjere općeniti metabolizam stanica ili enzimatsku aktivnost kao markeri stanica. Uz ove testove često se koriste i Kenacid Blue, tripansko modriilo i Neutral Red metoda.

### 4.4.1. Testovi redukcije tetrazoliuma

MTT ((3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolij bromid)) bio je među prvim testovima razvijenim za otkrivanje citotoksičnosti neke tvari na mikrotitracijskim pločama. MTT otopina se priprema u fiziološkoj otopini i dodaje se staničnoj kulturi u koncentraciji od 0,2-0,5 mg/ml. Žive stanice imaju mogućnost redukcije MTT u vidljivi ljubičasto obojani formazin. Za otapanje stvorenih kristala formazana koriste se kiseli izopropanol, DMSO (dimetil sulfoksid), SDS (natrijev dodecil sulfat) itd. Postotak mrtvih stanica određuje se usporedbom apsorbancije tretiranih stanica i netretiranih stanica. Nedavno razvijeni tetrazolijevi reagensi (MTS, XTT, WST) mogu se reducirati živim stanicama koje stvore formazan izravno topiv u mediju.

### 4.4.2. Redukcija rezasurina

Test redukcije rezasurina sličan je onom kao i kod tetrazolijumskih reagensa. Rezasurin se može otopiti u fiziološkim puferima (otopina plave boje) i dodaje se izravno u staničnu kulturu. Inkubacija traje jedan do četiri sata. Žive stanice reduciraju rezasurin u resorufin (ružičast i fluorescentan). Količina resorufina mjeri se fluorometrom. Prednost redukcije rezasurina je ta što je jeftin za izvođenje i osjetljiviji je od tetrazolijuma. Dok su nedostaci eventualno fluoresciranje same tvari koja se testira i njegov dodatni toksični učinak na stanice (RISS i sur., 2016).

#### **4.4.3. Test aktivnosti proteaze**

Mjerenjem aktivnosti enzima proteaze moguće je odrediti je li stanica živa ili mrtva. Nedavno je razvijen stanično propustljivi fluorogeni supstrat proteaze (glicilfenilalanil-aminofluorokoumarin; GF-AFC) za selektivno otkrivanje aktivnosti proteaze živih stanica. GF-AFC supstrat može penetrirati žive stanice gdje citoplazmatske aminopeptidaze odstranjuju dio molekule tako da ostane sačuvan aminofluorokoumarin (AFC) koji potom fluorescira, a jačina fluorescencije povezana je s količinom živih stanica. Ukoliko je stanica mrtva nema citoplazmatske aminopeptidaze kako bi rascijepala supstrat i stanična kultura manje fluorescira. Prednost ovog testa je relativna netoksičnost, mogućnost dugotrajnog korištenja i kraće vrijeme inkubacije (30 min do 1 sat). Upravo obilježje netoksičnosti čini ovaj supstrat pogodan za usporedbu s drugim testovima kako bi se istražio mehanizam toksičnosti (npr. upotreba uz adenzin trifosfat tj. ATP kao marker test) (RISS i sur., 2016).

#### **4.4.4. ATP test**

ATP je marker živih stanica. Kod oštećenja integriteta membrane, stanice gube sposobnost sinteze ATP-a, a endogene ATP-aze brzo iscrpljuju preostali ATP iz citoplazme. Za mjerenje količine ATP-a koristi se luciferin. Spajanjem luciferina i ATP-a uz luciferazu kao katalizator reakcije nastaje svjetlost. ATP test najbrži je od nabrojanih testova, najosjetljiviji i s najmanje artefakata. Luminiscentni signal doseže stabilno stanje i stabilizira se u roku od 10 minuta nakon dodavanja reagensa (luciferin). Prednosti testa su brzina izvođenja (nema inkubacije) te test može prepoznati mali broj stanica u jažici (10 stanica) što ga čini pogodnim za korištenjem na pločama malog formata. (RISS i sur., 2016)

#### **4.4.5. Ostali testovi**

Kenacid blue boja koristi se kod istraživanja citotoksičnosti obzirom se boja veže za stanične proteine. Što se više boje veže veća je toksičnost nekog pripravka. Isti učinak dobije se primjenom tripanskog modrila također ulazi u mrtve stanice i veže se na njih te sulfohodamin B koji se veže za stanične proteine.

Neutral red metoda zasniva se na mogućnosti stanice da pomoću lizosoma u sebe unese, u vodi topivu, crvenu boju. Pripravci koji uništavaju plazmu, lizosomalnu membranu ili ometaju

normalan proces endocitoze smanjiti će mogućnost stanice da primi crvenu boju (PUTNAM i sur., 2002).

Analizom laktatne dehidrogenaze (LDH) mjeri se integritet stanične membrane količina izlučenog LDH u medij koji je proporcionalna s oštećenjem stanica.

Iako je mnogo testova dostupno za određivanje citotoksičnosti u istraživanju antimikrobnih pripravaka prirodnog porijekla predlaže se slijedeći način određivanja.

## 5) Primjeri antimikrobne aktivnosti prirodnih tvari

### 5.1. Prirodne tvari s antimikrobnom aktivnošću

**Pčelinji vosak.** Pčelinji vosak proizvod je pčela radilica kojeg luče iz svojih voskovnih žlijezda. Najčešće vrste pčela koje se koriste u proizvodnji voska su azijska medonosna pčela (*Apis cerana*) i europska medonosna pčela (*Apis mellifera*). Vosak je topiv u vodi, hladnom alkoholu i kloroformu. Vosak je mješavina ugljikovodika, slobodnih masnih kiselina, estera masnih kiselina, diestera i raznih stranih primjesa (propolis, pelud). Točan sastav voska najviše ovisi o vrsti pčele i okolišu u kojem se prikuplja. Njegova upotreba zabilježena je u ranoj ljudskoj povijesti pa su ga tako stari Egipćani koristili za liječenje žuljeva, opekotina i rana; Grci za liječenje upale krajnika; Rimljani za liječenje opekotina, rana, lomova. Posljednjih godina mnogo se istraživao antimikrobni potencijal voska. Dokazana je djelotvornost protiv gljivice *Candida albicans*, gram pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* i *Streptococcus pyogenes*, gram negativnih bakterija *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* (GHANEM, 2011). Također pokazalo se kako vosak u kombinaciji s propolisom i maslinovim uljem pokazuje antimikrobnu aktivnost prema gljivicama iz roda *Malassezia* (*Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia globular* i *Malassezia obtusa*) (FRATINI i sur., 2016). Iako se vosak pokazao kao potencijalni antimikrobni pripravak potrebno ga je dodatno istraživati samostalno kao i u kombinaciji s ostalim pčelinjim proizvodima, potrebno je standardizirati test kojim bi se određivala MIK. Treba uzeti u obzir i upotrebu pesticida, antibiotika, raznih okolišnih onečišćenja, akaricida u tehnologiji proizvodnje pčelinjih proizvoda tj. u gospodarenju pčela te ih svesti na minimum kako ne bi nanijeli štetu zdravlju ljudi.

**Propolis.** Propolis je prirodna smolasta tvar koju skupljaju pčele obilazeći razno cvijeće. Koriste ga kao građevni materijal u košnici i štiti košnicu od bakterija i gljivica. U tradicionalnoj medicini propolis se koristi više od tisuću godina. Propolis se razlikuje po geografskom području u kojem obitavaju pčele no općenito sastav je 50% smola, 30% vosak, 10% esencijalna i aromatična ulja, 5% peludi i 5% nečistoća. Najvažniji spojevi u sastavu propolisa su flavonoidi (luteoin, kvercetin, garbanzol, medikarpin itd.), potom slijede terpenoidi i fenolni spojevi (ZABAIUO i sur., 2017). Mnoga istraživanja potvrdila su učinkovitost propolisa protiv bakterija, gljivica, protozoa i virusa. Bakteriostatski mehanizam djelovanja bazira se na oštećenju stanične membrane ili nemogućnosti sinteze nukleinskih kiselina. Antimikrobno djelovanje uvelike ovisi o vrsti propolisa, dozi i otapalu. Dokazano je djelovanje protiv *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* (SFORCIN, 2016; ORYAN i sur., 2018). Propolis osim antimikrobnih svojstava ima i razne druge funkcije kao što su protuupalna, antioksidativna, hepatoprotektivna, antitumorska i citostatska te djeluje kao imunostimulans. Unatoč mnogobrojnim

učincima potrebno je standardizirati postupak ekstrakcije propolisa, utvrditi najbolji način primjene i odrediti dozu i vrijeme trajanja liječenja (ORYAN i sur., 2018).

**Začini.** Kako bi se smanjila upotreba raznih aditiva i konzervansa koji sprječavaju rast patogenih bakterija u prehrambenoj industriji, istražuje se antimikrobna aktivnost raznih začina. Mnogi začini se u tradicionalnoj medicini, poput klinčića, origana, timijana, cimeta i kumina, primjenjuju za liječenje zaraznih bolesti te za sprječavanje rasta mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane i alimentarne infekcije i intoksikacije.

Klinčić se često koristi kao antiseptik kod periodontalnih bolesti i kao prirodni začina u hrani. Glavni metabolit zaslužan za njegovu antimikrobnu aktivnost je eugenol. Dokazano je kako djeluje *in vitro* i *in vivo* na bakterije *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (NASSAN i sur., 2015). Također dokazano je kako prah klinčića djeluje protiv *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Pseudomonas fluorescens* (KUANG i sur., 2011). Smatra se kako klinčić djeluje tako što uništava staničnu stjenku ili membranu, ima mogućnost proći kroz membranu i potom inhibirati sintezu proteina i DNK (LIU i sur., 2017).

Origano je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice usnača (*Lamiaceae*) koja se koristi kao začinsko bilje dugi niz godina. Glavni spojevi odgovorni za antimikrobnu aktivnost u sastavu origana su karvakrol i timol. Oni spadaju u skupinu fenolnih spojeva. Djeluju na staničnu membranu jer imaju lipofilna svojstva te tako uzrokuju oštećenje iste te remete promet tvari i iona (RODRIGUEZ-GARCIA i sur., 2016). Kao i ostala eterična ulja origano je pokazao bolje djelovanje na gram pozitivne bakterije i gljivice nego na gram negativne bakterije. Neke od bakterija na koje djeluje su *Salmonella spp.* (*S. gallinarum*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Aspergillus niger* (LIU i sur., 2017).

Timijan (*Thymus vulgaris*) je trajna biljka iz porodice usnača (*Lamiaceae*). Glavne komponente ulja timijana su flavonoidi i fenolni spojevi od kojih su najzastupljeniji timol i cimene (ASSIRI i sur., 2016). Mehanizam djelovanja sličan je kao i kod origana jer aktivni sastojak timol djeluje tako što remeti funkciju stanične membrane i tako onemogućava transport tvari. U raznim istraživanjima pokazalo se kako timijan tj. njegova ulja djeluju protiv *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* i gljivica *Candida albicans* i *Candida vaginalis*. Također pokazalo se kako su vrste timijana *T. vulgaris* i *T. serpyllum* najdjelotvornije (LIU i sur., 2017).

Cimet (*Cinnamomum zeylanicum*) je tropsko drvo koje pripada porodici lovorovki (*Lauraceae*). Cinamaldehyd, cinnamil acetat i cinamilni alkohol su tri glavne komponente cimeta. Komponente inhibiraju sintezu stanične membrane i inhibira funkciju membrane. Istraživanja su



pokazala kako je esencijalno ulje cimeta djelotvornije od ekstrakta cimeta (GUPTA i sur., 2008). Cimet djeluje protiv *Bacillus cereus*, *Penicillium spp.*, *Escherichia coli*. Pokazalo se kako može djelovati i protiv meticilin rezistentnog stafilokoka te stvaranja biofilma iste bakterije (CUI i sur., 2016).

Kumin (*Cuminum cyminum*) je biljka iz porodice štitarki (*Apiaceae*) koji se upotrebljava kao začin, u Indiji se sjemne kumina koriste kao antiseptik i dezinficijens. Cuminaldehid, cimen i terpenoidi glavne su komponente s antimikrobnom aktivnošću. Pokazalo se kako esencijalna ulje kumina djeluje protiv *E. coli*, *S. aureus* i *S. faecalis*, dok su bakterije *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* rezistentne (ALLAHGHADRI i sur., 2010). Također djeluje protiv mnogih gljivica koje uzrokuju trovanje hranom (*A. fumigatus*, *A. niger*, *P. citrinum*) (KEDIA i sur., 2014). Kao i ostali začini smatra se kako aktivne komponente kumina djeluju na staničnu membranu bakterija i gljivica.

## 5.2. Sekundarni metaboliti s antimikrobnom aktivnošću

**Fenoli i fenolne kiseline.** Mnoge fitokemikalije u sebi sadrže jednostavni fenolni prsten. Jedna od najpoznatijih je kafeinska kiselina koju sadrže biljke estragona (*Artemisia dracunculus*) i timijana (*Thymus vulgaris*) te je pokazala djelovanje na mnogobrojne bakterije, viruse i gljivice. Mehanizam toksičnosti fenola prema mikroorganizmima leži u njihovoj mogućnosti oksidacije drugih spojeva (COWAN M.M.,1999).

**Kinoni.** Kinoni su organski spojevi s aromatskom bazom kao što su benzen, naftalen i atracen. Kinoni su ubikvitarni spojevi. Može ih se naći u obliku vitamina K, koenzima Q, također nalaze se u voću te uzrokuju smeđe obojenje voćke nakon nekog oštećenja, sudjeluju u staničnom disanju, fotosintezi te mnogim drugim procesima. Kinoni se mogu vezati za aminokiseline te uzrokuju oštećenje funkcije aminokiselina i proteina. Zbog tog svojstva imaju veliki antimikrobni potencijal pošto se mogu vezati za peptide stanične membrane i razne enzime. Kinoni, a naročito naftokinoni, dobro su poznati po protubakterijskim, protugljivičnim i protutumorskim aktivnostima. Još jedna skupina, antrokinoni imaju širok spektar antimikrobnog djelovanja (djeluje i na mikobakterije) (TAMOKOU i sur.,2017). KAZMI i suradnici (1994) dokazali su bakteriostatsko djelovanje antrokinona, iz biljke bezbojne kane (*Senna italica*), prema bakterijama *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* i *P. aeruginosa* te baktericidno djelovanje prema bakteriji *Pseudomonas pseudomallei*.

**Terpeni.** Terpeni su nezasićeni ugljikovodici ugodna mirisa. Opća formula im je  $C_{10}H_{16}$  i pojavljuju se u obliku monoterpena ( $C_5$ ), diterpena ( $C_{20}$ ), triterpena ( $C_{30}$ ), seskviterpena ( $C_{15}$ ) itd. Ukoliko u svojoj strukturi imaju dodatne elemente, obično kisik, nazivaju se terpenoidi (TAMOKOU i

sur.,2017). U mnogim istraživanjima dokazano je kako terpeni i terpenoidi djeluju protiv bakterija, gljivica, virusa i protozoa. Mehanizam djelovanja im nije u potpunosti objašnjen, ali pretpostavlja se kako uključuje prekid kontinuiteta membrane lipolitičkim djelovanjem. Frakcija topiva u etanolu, ljubičaste prerijske djeteline (*Dalea purpurea*), daje terpenoid nazvan petalostemumol, koji je pokazao aktivnost protiv *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans* i manju aktivnost protiv Gram negativnih bakterija. Najznačajniji predstavnik terpena je artemisin koji se koristi kao lijek protiv malarije (COWAN,1999).

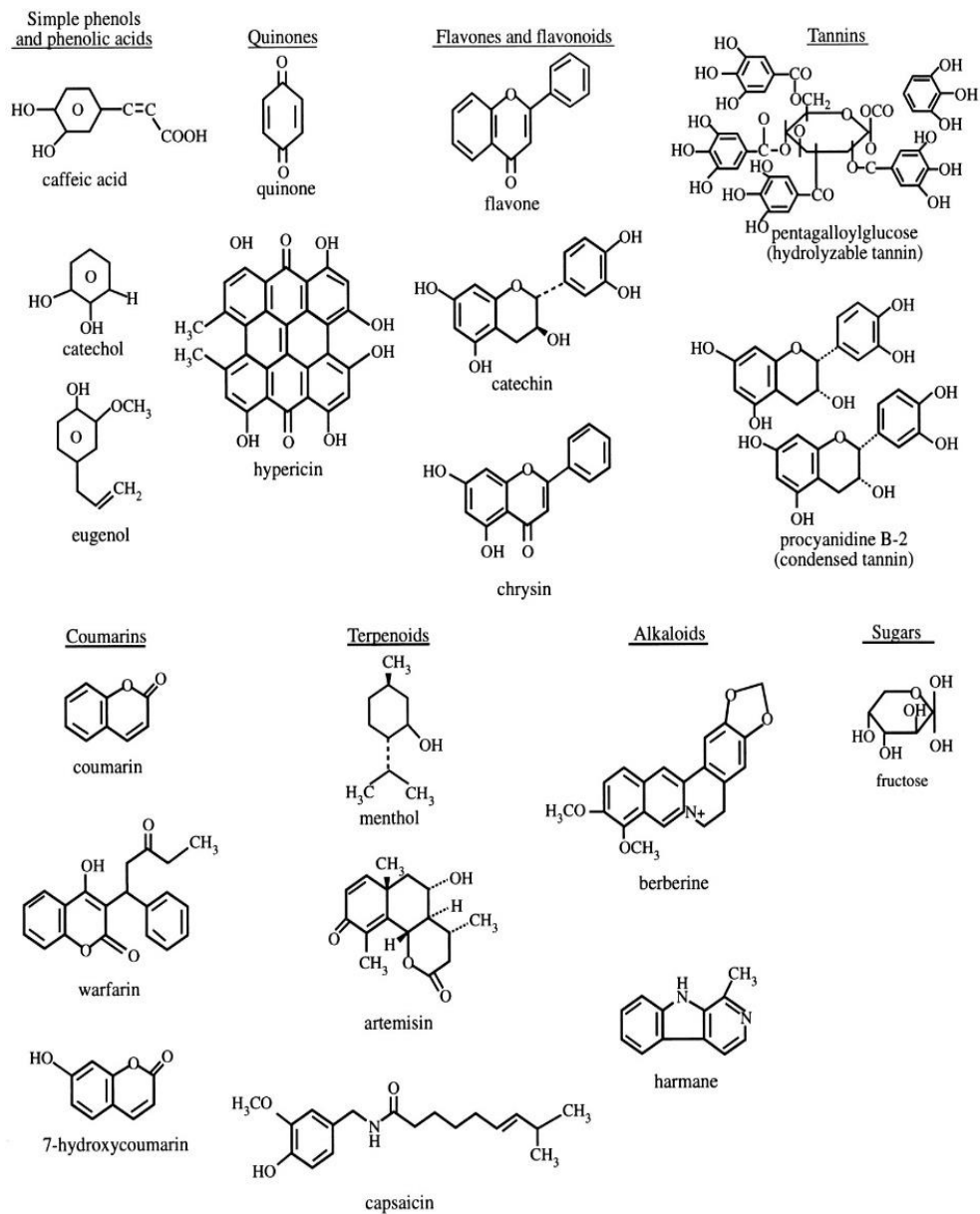
**Tanini.** Tanini spadaju u grupu polimernih fenolnih supstanci koji imaju adstrigena svojstva. Oni su topivi u vodi, alkoholu i acetonu te imaju mogućnost precipitiranja proteina. Dije se u dvije skupine: derivate flavanola (kondenzirani tanini) i hidrolizirajuće tanine (galotanini), koji su mnogo značajnija grupa. Djeluju tako što precipitiraju proteine stanične membrane bakterija te tako smanjuju permeabilnost same membrane (MUJEZINOVIĆ i sur., 2018). Tanini u biljkama inhibiraju rast insekata i smanjuju rad probavnih organa u preživača. Na bakterije djeluju bakteriostatski. Pokazali su se djelotvorni protiv protozoa, gljivica, insekata, helminta i virusa.

**Kumarini.** Kumarini su fenolne tvari koje se sastoje od benzena i  $\alpha$ -pironskog prstena. Kumarini pokazuju mnštvo bioloških aktivnosti, uključujući antikoagulacijsku, estrogenu, dermalno fotosenzitirajuću, antimikrobnu, vazodilatacijsku, moluskicidnu (ubijanje mekušaca), djeluju kao antihelmintici u živim organizmima, sedativi i hipnotici, a pokazuju i analgetsko i hipotermičko djelovanje (MOLNAR I ČAČIĆ, 2011). Najpoznatiji predstavnik je varfarin koji se koristi kao antikoagulans u medicini te kao rodenticid u proizvodima za uklanjanje štetnih glodavaca. Pokazalo se kako kumarini djeluju na *C. albicans*, kako može spriječiti recidive prehlade u osoba zaraženih HSV-1 (Herpes simplex virus) preko stimulacije makrofaga, skopoletin koji djeluje protiv uzročnika tuberkuloze. Neki derivati kumarina kao što je fitoaleksin djeluju protugljivično.

**Flavonoidi.** Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koje sintetiziraju razne biljke kao odgovor na razne infekcije uzrokovane mikroorganizmima, pa ne čudi što su pokazali svoj in vitro antimikrobni potencijal. Mehanizam njihovog djelovanja sličan je djelovanju kinona. Mijenjaju strukturu proteina (vežu se za staničnu membranu, mijenjaju oblik transportnih proteina, različitih staničnih enzima). Najznačajniji pripadnik ove skupine je katekin koji je pokazao *in vitro* antimikrobno djelovanje protiv *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella spp* i mnogih drugih bakterija. Od virusa djeluju inhibitorno na virus HIV-a, respiratornog sincicijskog virusa (RCV) i HSV-1. Također, ukoliko se primjenjuju topikalno mogu spriječiti shitosomijazu (izoflavon) (COWAN,1999). Osim svojeg antimikrobnog djelovanja, flavonoidi djeluju i antioksidativno, protuupalno, protumutageno i protutumorski te su pokazali efikasnost u liječenju Alzheimerove bolesti i ateroskleroze (PANCHE i sur., 2016). Predstavnici s najvećim potencijalom su kvarcetin, naringin, hesperetin i katekin.

**Alkaloidi.** Alkaloidi su prirodni spojevi s dušikom lužnatih svojstva. Najpoznatiji alkaloid je morfij. Alkaloidi izolirani iz biljne porodice Žabnjakovki (*Ranunculaceae*) pokazali su antimikrobno djelovanje na razne mikroorganizme. Solamargine, alkaloid izoliran iz bobica biljke *Solanum khasianum*, može biti koristan kod pacijenata s HIV-om i sprječavanju gastrointestinalnih infekcija osoba oboljelih od AIDS-a. Još jedan bitan predstavnik alkaloida je i berberin koji djeluje protiv *Trypanosom spp.* i *Plasmodium spp.* te protiv gljiva (ZORIĆ i sur., 2017) Djeluju tako što se umeću u staničnu stjenku i DNK (TAMOKOU i sur.,2017).

**Antimikrobni peptidi.** Antimikrobni peptidi (AMP), zvani peptidi obrane, su male molekule sa širokim spektrom antimikrobnog djelovanja protiv bakterija, virusa, gljivica. Uz to djeluju i citostatički prema stanicama tumora, protuupalno i kao imunomodulatori. AMP predstavljaju davni oblik obrane domaćina od raznih infekcija, također značajni su u evoluciji jednostavnih oblika života u mnogostanične oblike (KANG i sur., 2017). U svojoj strukturi AMP imaju različite kombinacije aminokiselina, ali glavna značajka im je da su pozitivno nabijeni te ih privlači negativno nabijena stanična membrana raznih mikroorganizama. Druga važna značajka AMP-a je hidrofobnost što im omogućava prodiranje u stanicu i uništavanje same membrane, kao i ometanje sinteze DNK i unutarstaničnih proteina te samog metabolizma stanice (AOKI i UEDA, 2013). Postoje humani, prirodni te sintetizirani AMP. Primjeri prirodnih AMP su nađeni u koži vodozemaca, najčešće žaba. Kod vodozemaca imaju ulogu sprječavanja kožnih infekcija i mehaničkih, električnih ili kemijskih oštećenja. Upotreba u ljudi im je ograničena zbog visoke hemotoksičnosti. Magainin predstavlja tipični AMP izoliran iz vodozemaca. Njegov analog Pexiganan odobreni je topikalni lijek za liječenje infekcija koje su posljedica dijabetesa te se pokazao kao dobar lijek kod dekubirusnih rana, ulcera, kirurških rana. (KANG i sur., 2017) Kod biljaka su izolirane dvije vrste AMP-a, to su thionini i defensini. U *in vivo* istraživanjima thionin se pokazao aktivan na bakterije i gljivice (COWAN,1999; JENSSEN i sur, 2006). Iako su se AMP-ovi pokazali kao dobri antimikrobni pripravci često su toksični za ljudski organizam (hemolitički učinak), pokazuju preširoko djelovanje što može poremetiti biološku mikrofloru organizma, mogu biti deaktivirani visokim postotkom soli, skupa im je proizvodnja te se brzo metaboliziraju u organizmu, stoga ih je potrebno dodatno klinički istraživati i poboljšati im farmakokinetiku (AOKI i UEDA, 2013).



**Slika 7.** Sekundarni metaboliti

(Preuzeto s <https://www.semanticscholar.org/paper/Plant-products-as-antimicrobial-agents.-Cowan/6e45b669654170a64fe105951c19fd7e3cfb2075/figure/1>)

## 6) Zaključak

Antimikrobna rezistencija je sposobnost nekog mikroorganizma da razvije otpornost prema antimikrobnim lijekovima koji su do tada bili uspješni u liječenju infekcija uzrokovanih tim mikroorganizmima. Antimikrobna rezistencija se razvila u tolikoj mjeri zbog pretjerane i neracionalne upotrebe antimikrobnih pripravaka, naročito antibiotika. Posljedica toga je sve veći broj multirezistentnih mikroorganizama koji uzrokuju smrt ljudi i životinja. Stoga se razvila potreba razvika novih, učinkovitijih antimikrobnih tvari. Veliki potencijal prirodnih pripravaka u liječenju čovjek je koristio od svojih ranih početaka pa sve do danas. Budući da je velik broj tvari prirodnog porijekla te njihovi produkti pokazuju antimikrobnu sposobnost potrebno je osigurati standardizirane protokole istraživanja takvih tvari kako bi se što vjerodostojnije odredila njihova učinkovitost. U ovome radu su prikazane metode koje se koriste u *in vitro* istraživanjima antimikrobne učinkovitosti. Neke od tih metoda je bolje koristiti za prirodne pripravke od drugih.

U fazi otkrivanja prirodnih pripravaka potrebno je istražiti povijesnu upotrebu istih kroz razne baze podataka. Potom je potrebno prikupiti biljku, identificirati ju, pravilno skladištiti i pravilno pripremiti za daljnje istraživanje. Kod odabira mikroorganizama treba koristiti standardizirane sojeve koji su osjetljivi na poznate antibiotike i koji se koriste u svakodnevnoj upotrebi kao što su ATCC (engl. *American Type Culture Collection*). Kod svih navedenih metoda potrebno je koristiti čitave mikroorganizme. Uz ispitivanje antimikrobne osjetljivosti pojedinog pripravka potrebno je paralelno istražiti štetnost prema stanicama određenim testovima citotoksičnosti. Kako bi se isključilo previše lažno pozitivnih rezultata potrebno je uzeti granicu za  $IK_{50}$  manju od  $100 \mu\text{l/ml}$  za mješavine i  $IK_{50}$  manji od  $25 \mu\text{g/ml}$  za čiste tvari. Kod svakog istraživanja potrebno je koristiti i kontrolne testove s barem jednim pripravkom koji djeluje na pretraživani mikroorganizam i jednim pripravkom s negativnom kontrolom. Ukoliko neka tvar pokaže antimikrobno djelovanje na određene mikroorganizme u *in vitro* uvjetima neizbježno je i istraživanje na životinjskim modelima. Klinička ispitivanja prirodnih antimikrobnih pripravaka provode se rigorozno kao za sve ostale lijekove. Prirodni pripravci imaju veliki potencijal u borbi protiv raznih zaraznih bolesti stoga je opravdano ulaganje u njihov razvoj i istraživanje. Naravno, kao kod svakog istraživanja, pritom je potrebno držati se propisanih, standardnih protokola i preporuka. Usprkos brojnim izazovima prirodni pripravci imaju i imati će važnu ulogu u borbi protiv antimikrobne rezistencije i očuvanju zdravlja ljudi i životinja.

## 7) Literatura

1. ALLAHGHADRI, T., I. RASOOLI, P. OWLIA, M. J. NADOOSHAN, T. GHAZANFARI, M. TAGHIZADEH, S. ASTANEH (2010): Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran, *Journal of Food Science*, 75, 54–61
2. ANDREWS, M. J. (2001): Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16
3. AOKI, W., M. UEDA (2013): Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics, *Pharmaceuticals*, 6, 1055-1081
4. ARIKAN, S. (2007): Current status of antifungal susceptibility testing methods, *Medical Mycology*, Vol 45, Issue 7, 569–587
5. ASSIRI, A. M., K. ELBANNA, H.H. ABULREESH, M. F. RAMDAN (2016): Bioactive Compounds of Cold-pressed Thyme (*Thymus vulgaris*) Oil with Antioxidant and Antimicrobial Properties, *Journal of Oleo Science*, 65(8), 629-640
6. BAKER, N. C., S. A. STOCKER, D. H. CULVER, C. THORNSBERRY (1991): Comparison of the E Test to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 29 No 3, 533-538
7. BUBONJA, M., M. MESARIĆ, A. MIŠE, M. JAKOVAC, M. ABRAM (2008): Utjecaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom, *Medicina*, Vol. 44, No. 3-4, 280-284.
8. BUTAYE, P., L. A. DEVRIESE, F. HAESBROUCK (2000): Influence of different medium components on the in vitro activity of the growth-promoting antibiotic flavomycin against enterococci, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol 46, Iss 5, 713-716
9. CHAVEERACH, A., R. SUDMOON, T. TANEE (2017): Interdisciplinary researches for potential developments of drugs and natural products, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7(4), 378-384
10. CORBETT, Y., L. HERRERA, J. GONZALEZ, L. CUBILLA, T. L. CAPSON, P. D. COLEY, T. A. KURSAR, L. I. ROMERO, E. ORTEGA-BARRIA (2004): A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70, 119–124
11. COWAN, M.M (1999): Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Review*, Vol. 12, No. 4, 564-582

12. CUI, H.Y., W. LI, C.Z. LI, S. VITTAYAPADUNG, L. LIN (2016): Liposome containing cinnamon oil with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm, *Biofouling*, 32, 215–225
13. ČUPIĆ, V., M. MUMINović, S. KOBAL, R. VELEV (2014): Farmakologija za studente veterinarske medicine, Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje, 13-17
14. DEWANJEEA, S., M. GANGOPADHYAYB, N. BHATTACHARYAA, R. KHANRAA, T. K. DUA (2015): Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 5(2), 75-84
15. FABRICANT, D.S., FARNSWORTH, N.R., (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* 109, 69–75
16. FRANČETIĆ, I., D. VITEZIĆ (2007): Osnove kliničke farmakologije, Medicinska naklada, Zagreb, 43-58
17. FRATINI, F., G. CILIA, B. TURCHIL, A. FELICIOLI (2016): Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol 9, Issue 9, 839-843
18. GHANEM, N.B. (2011): The Antimicrobial Activity of Some Honey Bee Products and some Saudi Folkloric Plant Extracts, *Journal of King Abdulaziz University-Science*, Vol. 23 No. 2, 47-62
19. GOMEZ-LOPEZ, A. , A. ABERKANE, E. PETRIKKOU, E. MELLADO, J. L. RODRIGUEZ-TUDELA, M. CUENCA-ESTRELLA (2005): Analysis of the Influence of Tween Concentration, Inoculum Size, Assay Medium, and Reading Time on Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 43, No. 3, 1251-1255
20. GUPTA, C., A.P. GARG, R.C. UNİYAL, A. KUMARI (2008): Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2, 247–251.
21. HORVATH, G., N. JAMBOR, A. VEGH, A. BOSZORMENY, É. LEMBERKOVICS, É. HETHELYI K. KOVACSC, B. KOCSISC (2010): Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography, *Flavour Fragr. J.* 25, 178–182
22. JENKINS, S., G., A. N. SCHUETZ (2012): Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy, *Mayo Clinic Proceeding*, 87(3):290-308
23. JENNSSEN, H., P. HAMILL, R. E. W. HANCOCK (2006): Peptide Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol 19, No 3, 491-511
24. JORGENSEN, J. H., M. J. FERRARO (2009): Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, *Clin. Infec. Dis.* 49, 1749-1755
25. JURG, G. (2009) : How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology* 122., 177-183

26. KANG, H.K, C. KIM, C. H. SEO, Y. PARK (2017): The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review, *Journal of Microbiology*, Vol. 55, No. 1, 1–12
27. KAZMI, M.H., A. MALIK, S. HAMEED, N. AKHTAR, S. NOOR ALI(1994): An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry* 36 (3), 761–763
28. KEDIA, A., B. PRAKASH, P. K. MISHRA, N. K. DUBEY (2014): Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities, *International Journal of Food Microbiology*, 168, 1–7
29. KUANG, X., B. LI, R. KUANG, X. D. ZHENG, B. ZHU, B. L. XU, M. H. MA (2011) Granularity and antibacterial activities of ultra-fine cinnamon and clove powders, *Journal of food safety*, 31:291–296
30. LAI, P. K., J. ROY (2004) : Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices, *Current Medicinal Chemistry* 11, 1451-1460
31. LEDINA, T., S. BULAJIĆ, J. ĐROĐEVIĆ (2018): Metode za određivanje antimikrobne rezistencije kod mikroorganizama u hrani, *Veterinary Journal of Republic of Srpska* Vol.XVIII, No.1, 207–224
32. LIU, Q., X. MENG, Y. LI, C. N. ZHAO, G. Y. TANG, H. B. LI (2017): Antibacterial and Antifungal Activities of Spices, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1283
33. MARSTON, A. (2011): Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry, *Journal of Chromatography A* 1218, 2676–2683
34. MITSCHER, L. A., J. L. BEAL, M. S. BATHALA,, W. N. WU, R. WHITE, R. P. LEU (1972): Antimicrobial agents from higher plants 1. Introduction, rationale, and methodology. *Lloydia* 35, 157–176
35. MOLNAR, M., M. ČAČIĆ (2011): Biološka aktivnost derivata kumarina, *Croatian. Journal of Food Science and Technology*, 3 (2) 55-64
36. MONZOTE, L. (2014): Development of Natural Products as Anti-Parasitic Agents, *Current Clinical Pharmacology*, 9, 181-186
37. MOUNYR, B., M. SADIKI, S. K. IBNSOUDA (2016): Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79
38. MUELLER, M., A. DE LA PENA, H. DERENDORF (2004): Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48(2): 369–377
39. MUJEZINOVIĆ I., A. SMAJLOVIĆ, A. ZUKO, B. DUKIĆ i V. ČUPIĆ (2018): Tanini pitomog kestena (*CASTANEA SATIVA*), *Veterinarska stanica* br. 49 (5), 371-377
40. NASSAN, M.A., E. H. MOHAMED, S. ABDELHAFEZ, T.A. ISMAIL (2015): Effect of clove and cinnamon extracts on experimental model of acute hematogenous pyelonephritis in albino rats: Immunopathological and antimicrobial study, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28, 60–68



41. OKUSA, J. P. N., C. STEVIGNY, M. DEVLEESCHOUWER, P. DUEZ (2010) : Optimization of the Culture Medium Used for Direct TLC–Bioautography. Application to the Detection of Antimicrobial Compounds from *Cordia gilletii* De Wild (Boraginaceae), *Journal of Planar Chromatography* 23(4), 245-249
42. ORYAN, A., E. ALEMZADEH, A. MOSHIRI (2018): Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 469–483
43. PACIFIC BIOLABS (2019): <<https://pacificbiolabs.com/stages-of-drug-development>>, Pristupljeno 10.8.2019.
44. PANCHE, A. N., A. D. DIWAN, S. R. CHANDRA (2016): Flavonoids: an overview, *Journal of Nutritional Science*, vol. 5, e47, 1-15
45. PATI, U.S., N. P. KURADE (2004): Antibacterial screening methods of natural products, *Regional Station, Indian Veterinary Research Institute*, 1-3
46. PAUL, C., A. J. VLIETINCK, D. VANDEN BERGHE, L. MAES (2006): Anti-infective potencial of natural products: How to develop a stronger „proof of concept“, *Journal of Ethnopharmacology* 106, 290-302
47. PEPELJNAK, S. (2018): Istraživanja ljekovitih i toksičnih biološki aktivnih tvari prirodnog porijekla u radovima članova Kolegija farmaceutskih znanosti Akademije medicinskih znanosti Hrvatske, *Ljetopis* 16, 41- 47
48. PFALLER M.A., D. J. SSHEEHAN, J.H. REX (2004): Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Review* 17, 268-280
49. PUTNAM, K. P., D.W. BOMBICK, D.J. DOOLITTLE (2002): Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate, *Toxicology in Vitro* 16, 599–607
50. RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ, I., M. CVJETKO BUBALO, V. GAURINA SRČEK, K. RADOŠEVIĆ (2016): Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 11 (3-4), 169-175
51. RAHALISON, L. M. HAMBURGER, K. HOSTETTMANN, M. MONOD, E. FRENK (1991): A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants, *Phytochem. Anal.* 2, 199-203
52. RIAZ, A. K. (2018): Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals, *Saudi Pharmaceutical Journal* 26, 739-753
53. RISS, L. T., R. A. MORAVEC, A. L. NILES, S. DUELLMAN, H. A. BENINK, T. J. WORZELLA i L. MINOR (2016): Cell Viability Assays, *Assay Guidance Manual*, Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors, 1-25

54. RODRIGUEZ-GARCIA, I., B.A. SILVA-ESPINOSA, L.A. ORTEGA-RAMIREZ, J.M. LEYVA, M.W. SIDDIQUI, M.R. CRUZ-VALENZUELA, G.A. GONZALEZ-AGUILAR, J.F. AYALA-ZAVALA (2016): Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1717–1727
55. SAXENA, G., S. FARMER, G.H.N. TOWERS, R.E.W. HANCOCK (1995): Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique, *Phytochem. Anal.* 6, 125-129
56. SCHMOURLO, G., R. R. MENDONCA-FILHO, C. S. ALVIANO, S. S. COSTA (2005): Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 96, Issue 3, 563-568
57. SFORCIN, M. J. (2016): Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis, *Phytotherapy Research*, 30, 894–905
58. SMILJA, K. i suradnici (2013): *Medicinska mikrobiologija*, Medicinska naklada, Zagreb, str. 248-249
59. TAMOKOU, J. D. D., A. T. MBAVENG, V. KUETE (2017): Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables, *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* 207–237
60. TRAGER, W., J. B. JENSEN (1976): Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673–675
61. VALGAS, C., S. MACHADO de SOUZA, E. F. A. SMANIA, A. SMANIA Jr. (2007): Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 369-380
62. VANDEN BERGHE, D.A., A. J. VLIETINCK (1991) : Screening for antibacterial and antiviral agents. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 6, Assays for Bioactivity. Academic Press, London, pp. 47–59, (Chapter 3)
63. VARELA, N.P., R. FRIENDSHIP, C. DEWEY, A. VALDIVIESO (2008): Comparison of Agar Dilution and E-test for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter coli* isolates recovered from 80 Ontario swine farms, *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 72(2): 168–174
64. VRANEŠ J., V. LESKOVAR (2009): Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija, *Medicinski Glasnik*, Vol 6 No 2, 147-165
65. WIEGAND, I., HILPERT K., HANCOCK R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–75
66. ZABAIQUA, N., A. FOUACHEA, A. TROUSSONA, S. BARONA, A. ZELLAGUID, M. LAHOUELC, J. A. LOBACCAROA (2017): Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product, *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 214–222

67. ZORIĆ N., I. KOSALEC, S. TOMIĆ, I. BOBNJARIĆ, M. JUG, TONI VLAINIĆ, J. VLAINIĆ (2017): Membrane of *Candida albicans* as a target of berberine, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17:268, 1-10
68. ŽUŽUL, S., K. MATKOVIČ, M. OSTOVIĆ, Ž. PAVIČIĆ (2016): Načela etičnosti u radu s pokusnim životinjama, *Zbornik radova / Harapin, Ivica - Zagreb : Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu*, 2016, 417-422

## 8) Sažetak

### **Kako istraživati antimikrobnu učinkovitost tvari prirodnog porijekla**

Zarazne bolesti uzrokovane bakterijama, gljivama, virusima i parazitima predstavljaju opasnost za javno zdravlje. Iako postoje brojni antimikrobni lijekovi, danas je potraga za novim supstancama s antimikrobnim djelovanjem sve intenzivnija posebice s obzirom na razvoj rezistentnih sojeva, te zbog nedostupnosti lijekova u siromašnim zemljama. Naime, biološka raznolikosti i postojanje brojnih prirodnih produkata, koje nalazimo kao čiste tvari ili kao standardizirane ekstrakte, su brojni što daje veliku mogućnosti pronalaska adekvatnog lijeka.

Istraživanje antimikrobnog djelovanja prirodnih pripravaka nužno treba biti standardizirano kao i samo dobivanje ekstrakata. U ovom se preglednom radu iznose preporuke za stvaranje okvira istraživanja antibakterijskih, antivirusnih, antiparazitskih i antivirusnih učinaka prirodnih pripravaka.

## **9) Summary**

### **How to test antimicrobial activity of natural products**

Infectious diseases caused by bacteria, fungi, viruses and parasites pose a threat to public health. Although there are numerous antimicrobials, the search for new antimicrobial substances is increasingly intensified, especially with regard to the development of resistant strains and the unavailability of drugs in poor countries. Biodiversity and the existence of numerous natural products, which are found as pure substances or as standardized extracts, are numerous, which gives a great opportunity to find an adequate drug. Research of the antimicrobial activity of natural substances needs to be standardized as well as the extraction itself. With this review graduate thesis we give recommendations for the research of antibacterial, antifungal, antiparasite and antiviral effect of natural products.

## **10) Životopis**

Rođen sam u Zagrebu 29.04.1994. godine. Završio sam osnovnu školu Vladimira Nazora te nakon toga prirodoslovnu gimnaziju u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga u Zagrebu. Veterinarski fakultet upisao sam 2013. godine. Za vrijeme studiranja obavljao sam razne studentske poslove: rad u Pet shopu, rad na promocijama hrane za životinje kao savjetnik za prehranu te promocije preparata protiv vanjskih nametnika za pse i mačke.