

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko- biokemijski fakultet

Tanja Jović

**Antifungalni učinci berberina u uvjetima**

***in vitro***

Zagreb, 2012.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ivana Kosalca i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011/2012.

## Sadržaj:

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Oportunističko-patogene vrste roda <i>Candida</i></b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Berberin</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. Žutika (<i>Berberis vulgaris</i> L., Berberidaceae)</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Opći i specifični ciljevi rada</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Materijali i metode</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1. Priprema i analiza tinkture</b> .....	<b>6</b>
3.1.1. Biljni materijal i priprema tinkture .....	6
3.1.2. Određivanje koncentracije tinkture .....	6
3.1.3. HPLC analiza ispitivane tinkture .....	7
3.2. Priprema radnih otopina berberina.....	7
<b>3.3. Određivanje minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije (MIK, MFK)</b> .....	<b>8</b>
3.3.1. Korištene gljivične kulture.....	8
3.3.2. Priprema inokuluma .....	9
3.3.3. Metoda mikrodilucije.....	9
<b>3.4. Inhibicija germinacije blastospora <i>C. albicans</i></b> .....	<b>9</b>
3.4.1. Priprema inokuluma .....	9
3.4.2. Test inhibicije germinacije.....	10
<b>3.5. Ispitivanje vijabilnosti, apoptotičkih i nekrotičkih blastokonidija vrste <i>C. albicans</i></b> .....	<b>10</b>
<b>4. Statistička analiza</b> .....	<b>12</b>
<b>5. Rezultati i rasprava</b> .....	<b>13</b>

5.1. Metoda suhog ostatka.....	13
5.2. HPLC analiza tinkture žutike .....	13
5.3. Utvrđivanje MIK i MFK vrijednosti .....	15
5.4. Inhibicija germinacije blastospora <i>C. albicans</i> .....	18
5.5. Vijabilnost blastokonidija (apoptoza i nekroza).....	20
7. Zaključak.....	22
8. Literatura.....	23
9. Zahvale .....	26
10. Sažetak na hrvatskom jeziku.....	26
11. Summary .....	27
12. Životopis .....	28

## 1.Uvod

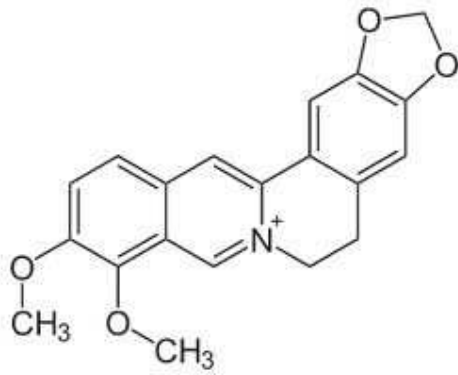
### 1.1. Oportunističko-patogene vrste roda *Candida*

Mikoze uzrokovane vrstama roda *Candida* nazivaju se kandidoze. Najčešći uzročnik kandidoza je vrsta *Candida albicans*. *C. albicans* je član ljudskog mikrobioma unutar gastrointestinalnog i respiratornog sustava, te vagine. Rijetko uzrokuje kliničke manifestacije – kandidoze. Njen rast i razmnožavanje suprimiraju drugi pripadnici ljudskog mikrobioma. Ako bilo što naruši tu ravnotežu, *Candida albicans* može prijeći iz komenzalnog u patogeni oblik (Prescott i sur., 2007). Na nastanak bolesti utječu različita stanja (trudnoća, dijabetes i novorođenčad pogoduju infekcijama), poremećaji zdravlja (endokrini poremećaji, maligne bolesti, infekcije HIV-om) te brojni jatrogeni činitelji (antibiotici, citostatici i zračenje) (Kalenić i sur., 2005). Virulentni čimbenici *C. albicans* su polimorfizam (jedino ona od svih vrsta roda *Candida* ima to svojstvo), sekrecija hidrolitičkih enzima (aspartil-proteinaza, fosfolipaza, hemolizina, lipaza), povećano lučenje tvari koje reagiraju s komplementima C3d i C3b nositelja od strane pseudohifa i drugih koje vežu fibrinogen, transferin, ekstracelularni matriks, fibrinonektin i kolagen, zatim ekspimiranje laktinu sličnih površinskih komponenata koje se vežu za ugljikohidrate nositelja, ekspresija hidrofobnih komponenti na površini (Hentges, 1995) i tvorba biofilma (Wei i sur., 2011; Fujibayashi i sur., 2009). Navedeni činitelji virulencije vrste *C. albicans* zajednički sudjeluju u razvoju kandidoze. Kandidoze se dijele na sluzničke, kožne, sustavne i diseminirane (Kalenić i sur., 2005). Od sluzničkih česte su oralne kandidoze novorođenčadi (Hentges, 1995; Kalenić i sur., 2005; Prescott i sur., 2007) i osoba koje boluju od AIDS-a te vaginitis koji je učestaliji kod trudnica i HIV-pozitivnih žena (Hentges, 1995). Kožne kandidoze se najčešće razvijaju na vlažnoj, oštećenoj koži i noktima. U novorođenčeta se zbog neredovitog mijenjanja pelena može javiti tzv. pelenski osip, a izvor infekcije je najčešće sluznica crijeva novorođenčeta. Naziv sustavna kandidoza se koristi u slučaju kad je inficiran jedan unutarnji duboki organ, a diseminirana infekcija kad je riječ o najmanje dva duboka organa. U tim slučajevima dolazi do masovne invazije sluznice gastrointestinalnog trakta i prelaska *C. albicans* iz oblika jednostanične blastokonidije u pseudohife i hife koje lakše prodiru u dublja tkiva odn. organe. Blastokonidije mogu ući u krvotok bolesnika (kandidemija) i izazvati žarište u bilo

kojem organu. Najčešće su pogođeni bubrezi, srce, pluća, mozak i oči. Izvori infekcije su najčešće endogene vlastite kandidate na sluznici probavnog trakta, a rjeđe zaraženi intravenski ili urinarni kateteri ili zaražena osoba ( Kalenić i sur., 2005). Vrsta *C. albicans* je najčešći, ali ne i jedini uzročnik kandidoza. Nakon nje u kliničkim uzorcima najučestalija je *Candida glabrata*, a druge oportunističke vrste su *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* i *C. parapsilosis* (Horn i sur., 2012). Vrste *C. glabrata*, *C. dubliniensis* i *C. krusei* su učestaliji kod HIV-pozitivnih, nego kod HIV-negativnih pacijenata (Wei i sur., 2011). Broj infekcija uzrokovanih drugim vrstama roda *Candida* je u porastu proteklih godina. Taj pomak ka ne-*Candida albicans* vrstama se pripisuje selekciji manje osjetljivih sojeva vrsta roda *Candida* širokom upotrebom flukonazola kao profilaktika i terapeutika (Kullberg i sur., 2011). Vrste roda *Candida* postale su važni bolnički patogeni. U nekim bolnicama predstavljaju 10 % svih nozokomijalnih infekcija vaskularnog sustava (Prescott i sur., 2007). Nozokomijalne kandidoze povezane su s visokom stopom smrtnosti kod kritično bolesnih pacijenata. Porast incidencije kandidemije u razdoblju od 1999. do 2006. zabilježen je u brojnim državama (Kullberg i sur., 2011). Liječenje kandidoze uključuju antimikotike iz skupine azola, ehinokandina i poliena. Njihova terapijska primjena je ograničena kod nekih skupina pacijenata zbog njihove toksičnosti ( Wei i sur., 2011.; Katzung i sur., 2011) i porasta broja rezistentnih sojeva vrsta roda *Candida* ( Wei i sur., 2011.; Kullberg i sur., 2011).

## 1.2. Berberin

Berberin je alkaloid izokinolinske strukture (Slika 1) prisutan u korijenju, podancima i kori debela velikog broja medicinski značajnih biljnih vrsta (*Berberis aquifolium*, *Berberis aristata*, *Berberis vulgaris* itd.) (Mantena i sur., 2006). Dokazan mu je antimikrobni učinak protiv 54 mikroorganizma, inhibicija intestinalne sekrecije iona i inhibicija kontrakcije glatke muskulature, inhibicija ventrikularne tahikardije, protuupalni i antipiretski učinak te stimulacija sekrecije žuči (Minaiyan i sur., 2011). Berberin djeluje antifungalno na vrste *Candida albicans*, *Candida glabrata* i *Candida tropicalis*. Jači učinak mu je na micelarni oblik vrste *Candida albicans* što je značajno za sistemske kandidoze, jer je micelarni oblik značajan za patogenezu (Park i sur., 1999). Nadalje, u uvjetima *in vitro* je dokazan sinergizam berberina s antimikotikom



Slika 1. Kemijska struktura berberina

stanične migracije i invazije (Tan i sur., 2011). Utvrđena mu je antitumorska aktivnost na brojnim staničnim linijama (Yu i sur, 2007; Park i sur, 2011; Mantena i sur, 2006). Studije na životinjama pokazale su da berberin može suprimirati kemijskim agensima uzrokovanu karcinogenezu i invaziju tumora, a da pri tome ne djeluje toksično na zdrave stanice (Mahata i sur., 2011).

Berberin djeluje i antiviralno, u stanicama karcinoma cerviksa uzrokovanom HPV virusom djeluje inhibitorno na transkripciju viralnog genoma čiji produkti remete regulatornu funkciju stanice (Mahata i sur., 2011). Berberin utječe na metabolizam glukoze i lipida. Na miševima koji boluju od dijabetesa pokazano je da snižava razinu glukoze i slobodnih masnih kiselina u krvi (Chen i sur., 2011), u *in vitro* uvjetima berberin pojačava inhibitorno djelovanje inzulina na glukoneogenezu u stanjima stresa endoplazmatskog retikuluma hepatocita (Wang i sur., 2010) i potiče proliferaciju preadipocita, a sprječava njihovo sazrijevanje u zrele adipocite što povećava njihovu osjetljivost na inzulin, jer veliki broj malih adipocita puno je osjetljiviji na inzulin od manjeg broja zrelih adipocita. Nakon toga provedena je klinička studija u kojoj je pokazano da berberin kod osoba koje boluju od metaboličkog sindroma snižava indeks tjelesne mase i smanjuje obim struka. U drugoj kliničkoj studiji je pokazano da snižuje razinu LDL-a, kolesterola i triacilglicerola u krvi osoba koje pate od hiperkolesterolemije (Yang i sur., 2011).

flukonazolom (Quan i sur., 2006) i mikonazolom (Wei i sur., 2011) te *in vivo* s amfotericinom (Han i Lee, 2004). U novije vrijeme istraživanja su usmjerena ka antitumorskom učinku berberina. Berberin se specifično za oligonukleotide te stabilizira triplete i G-kvartete inhibirajući aktivnost topoizomeraze i telomeraze. Antineoplastična aktivnost uključuje: indukciju apoptoze, zaustavljanje staničnog ciklusa, inhibiciju

### 1.3. Žutika (*Berberis vulgaris* L., *Berberidaceae*)

Žutika je grm iz porodice *Berberidaceae*. Samonikla je u središnjoj i južnoj Europi, sjeverozapadnoj Africi i zapadnoj Aziji. Plod je duguljasta crvena bobica. Zrije u kasno ljeto ili ranu jesen. Bobe su jestive, bogate vitaminom C, ali imaju jako gorak okus. U Aziji, posebice u Iranu gdje ih zovu *zerešk*, gdje se bobice koriste u kulinarstvu. Žutika, kao i većina biljaka s berberinom, koristi se u ajurvedskoj, kineskoj i iranskoj tradicionalnoj medicini najmanje već najmanje 3000. godina. Fitokemijske analize kore korijena i debla pokazale su prisutnost protoberberina i bisbenzil-izokinolin alkaloida (Minaiyan i sur., 2009). Neki od njih su: berberin, oksiakantin, berbamin, kolumbamin, palmatin, jatrorhizin i berberubin (Parsaee i sur., 2006). Za razliku od korijena i debla, plod, cvijet i sjemenke sadrže jako malo alkaloida, no sadrže mnogo fenolnih spojeva, pektina i organskih kiselina (Minaiyan i sur., 2009). Svi dijelovi biljke se mogu koristiti u medicinske svrhe. U današnje vrijeme žutika se uglavnom koristi kao koleretik, kod problema sa žučnim kamencima i u slučajevima žutice (Hanachi i sur., 2009). Nadalje, ima antioksidativno djelovanje (Hanachi i sur., 2006), inhibitorni učinak na acetil-kolinesterazu i butiril-kolinesterazu, zbog čega se smatra da bi mogla biti korisna u liječenju Alzheimerove bolesti (Kolar i sur., 2011). Utvrđen je također i hipotenzivni (Fatehi i sur., 2005), citoprotektivni (Minaiyan i sur., 2009), antihistaminski i antikolinergički (Shamsa i sur., 1999) i antitumorski učinak na karcinogene stanice jetre inducirajući apoptozu (Hanachi i sur., 2008) i suprimirajući brojne celularne i molekularne promjene inducirane karcinogenim tvarima (Motaleb i sur., 2008). Djelovanje na metabolizam glukoze i masnih kiselina ovisi o tome da li je pripremljen ekstrakt ploda ili kore korijena: saponinski i vodeni ekstrakt kore korijena žutike pokazali su značajan hipoglikemijski i hipolipemični učinak (Meliani i sur., 2011) dok ekstrakt ploda žutike nije utjecao na razinu glukoze, a povisio je koncentraciju triacilglicerida (Hajzadeh i sur., 2011).



## 2. Opći i specifični ciljevi rada

Biljne droge i njihove iscrpine stoljećima se, nekad više nekad manje, primjenjuju u terapiji najrazličitijih bolesti. Broj pacijenta s kandidozom (Kullberg i sur., 2011), kao i broj sojeva kandida koji pokazuju smanjenu osjetljivost na antimikotike raste (Wei i sur., 2011; Kullberg i sur., 2011) što rezultira potrebom za novim tvarima s antifungalnim učinkom ili povećanje učinkovitosti već upotrijebljenih.

Utjecaj alkaloida berberina kao i kore korijena žutike bogate berberinom (Minaiyan i sur., 2009) na vrste roda *Candida* slabo je istražen te je cilj ovog rada ispitati u usporediti spektar antifungalnog učinka etanolnog ekstrakta korijena žutike (*B. vulgaris* L.) i berberina. Usporedbom te dvije otopine cilj nam je dobiti predodžbu o utjecaju ostalih komponenti iscrpine na djelovanje berberina.

U svrhu postizanja ciljeva odredit će se u uvjetima *in vitro*:

- a) udio alkaloida berberina u ekstraktu korijena žutike izokratnom HPLC metodom prema validiranoj metodi Kosalca i sur. (2009),
- b) minimalne inhibitorne i minimalne fungicidne koncentracije (MIK, MFK) prema smjernicama EUCAST Edef 7.1 (2008),
- c) inhibiciju germinacije blastokondija kao bitnog virulentnog čimbenika vrste *C. albicans* te
- d) način ugibanja (apoptozom/nekrozom) blastokonidija vrste *C. albicans* fluorescentnim postupkom.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Priprema i analiza tinkture**

##### **3.1.1. Biljni materijal i priprema tinkture**

Biljni materijal nabavljen je ljubaznošću firme Suban d.o.o. i Samobora. Drogu je činio usitnjena i osušena kora korijena žutike (*Berberidis radice cortex*). Droga je porijeklom iz Pakistana. Serijski broj proizvoda je #21201.

Pripremljene su tri iscrpine. Ekstrakcijsko sredstvo bilo je apsolutni etanol (ALKALOID AD-SKOPJE), a omjer droge i ekstrakcijskog sredstva u sva tri slučaja bio je 1:5. Za pripremu prve dvije iscrpine 100 g droge, a za pripremu treće 50 g droge podvrgnuto je digestiji 1h na 60°C uz povremeno miješanje. Nakon digestije, sve tri mješavine droge i iscrpine podvrgnute su jednosatnoj ultrazvučnoj ekstrakciji u aparaturi proizvađača BANDELIN SONOREX. Temperatura ultrazvučne kupelji bila je 55°C. Iza ultrazvučne ekstrakcije uslijedila je filtracija preko grubog, naboranog filter papira. Sva tri filtrata su sjedinjena. Zatim su manje količine uparena do suha pomoću vakuum uparivača (Leborota 4000 Efficient, Njemačka) prema zadanim parametrima za etanol ( $p=17.500 \text{ Pa}$ ,  $T=58^\circ\text{C}$ ) uz broj okretaja od 90 rpm-a. Čvrsti ekstrakti su sastrugani i sjedinjeni. Na sobnoj temperaturi dodano je 50 mL apsolutnog etanola. Nakon miješanja na Vortex aparatu neotopljeni sadržaj odvojen je filtracijom preko grubog, naboranog filter papira. Tinktura je čuvana na +4°C u mraku.

##### **3.1.2. Određivanje koncentracije tinkture**

Koncentracija tinkture određena je metodom suhog ostatka prema Europskoj farmakopeji (2008). U posudu s ravnim dnom promjera oko 50 mm i visine oko 30 mm stavljeno je 2 mL priređene tinkture. Uparena je do suha na vodenoj pari nakon čega je čvrsti ostatak sušen 3h na temperaturi od 100°C. Nakon hlađenja u desikatoru iznad bezvodnog silika gela suhi ostatak je izvagan. Iz poznate mase suhog ostatka i uzetog volumena tinkture za ispitivanje izračunata je koncentracija tinkture. Pokus je ponovljen tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost mjerenja sa standardnom devijacijom.

### 3.1.3. HPLC analiza ispitivane tinkture

Tekućinska kromatografija ispitivane tinkture izvedena je prema metodi Kosalec i sur. (2009). Korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (Shimadzu LC system, Japan) opremljen pumpom (FCV-10 AV) , degazerom (DGU-14 A) i UV-Vis detektorom (SPD-10A). Korištena kolona (CTO-10 A) za separaciju bila je C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm s veličinom čestica od 5 µm (Shimadzu Shimpach VP-ODS). Mobilna faza pripremljena je miješanjem acetonitrila (Panreac Qimica Sau, EU) i 0,2% trifluoroctene kiseline (Merck, Njemačka) u ultračistoj vodi (Millipore, Njemačka) u omjeru 45:55 (v/v). Brzina protoka mobilne faze podešena je na 0,3 mL/min. Kromatogrami su snimani na valnoj duljini od 345 nm. 20 µL ispitivane otopine pomiješano je s metanolom (Lab-Scan, Irska) u omjeru 1:10 (v/v), a zatim je iz te razrijeđene otopine uzeto 100 µL koji su dodani u 900 µL metanola. 20 µL te otopine, nakon filtracije kroz najlonski filter 0,45 µm (Nalgane Rochester, NY, SAD), injektirano je u kolonu. Temperatura pećnice se održavala stalnom na 25°C. Ukupno vrijeme HPLC analize određeno je na 10 min. Za izradu baždarnog pravca, pripremljena je serija pet otopina berberin-hidroklorida (5,6-dihidro-9,10-dimetoksibenzo[g]-1,3-benzodioxolo[5,6-a]kinolizin hidroklorid, Sigma-Aldrich, Njemačka; definirane čistoće od 99,98% utvrđene HPLC analizom) ( u nastavku-berberin) koncentracijskog niza od 51 µg/mL do 0,051 µg/mL u metanolu (Lab-Scan, Dublin, Irska). Osigurana je linearnost metode s koeficijentom korelacije  $r^2 = 0.9917$  (jednadžba pravca  $y = 14937x - 15493$ ). Sva otapala bila su HPLC-čistoće i filtrirana kroz najlonske filtre 0.45 µm (Nalgane Rochester, NY, SAD). Podaci dobiveni HPLC analizom analizirani su pomoću Shimadzu VP-CLASS (verzija 6.14) softverom (Shimadzu Njemačka GmbH). Rezultat je izražen kako srednja vrijednost tri neovisna mjerenja.

### 3.2. Priprema radnih otopina berberina

Pripravljene su dvije radne otopine čistog berberina otapanjem poznate mase berberina u apsolutnom etanolu (ALKALOID AD – SKOPJE) u odmjernim tikvicama. Koncentracija otopine STOCK1 bila je 5 mg/mL, a otopine STOCK2 2,016mg/mL. Iz STOCK1 je pripremljena otopina za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

(MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MDK), a iz STOCK2 su priređene otopine za test inhibicije germinacije.

### **3.3. Određivanje minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije (MIK, MFK)**

#### **3.3.1. Korištene gljivične kulture**

Antifungalni učinak otopina berberin hidroklorida i tinkture korijena žutike ispitan je na gljivičnim vrstama i sojevima iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (oznake sojeva MFBF). Korišteni su klinički izolati vrste *Candida albicans* iz rodnice (oznaka MFBF 10774, MFBF 10784, MFBF 10781, MFBF 10775, MFBF 10790, MFBF 10780, MFBF 10777, MFBF 10778, MFBF 10776, MFBF 10773), izolati *C. albicans* iz stolice (oznaka MFBF 10422, MFBF 10423, MFBF 10424, MFBF 19425, MFBF 10348, MFBF 10349, MFBF 10350, MFBF 10351, MFBF 10352, MFBF 10353) te standardni laboratorijski sojevi vrsta *Candida albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 14243, *C. dubliniensis* CBS 501, *C. parapsilosis* MFBF 10381, *C. pulcherina* MFBF 10836, *C. glabrata* MFBF 10806, *C. guilliermondii* MFBF 10824.

U radu je korištena sintetska podloga RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Njemačka), Sabouraudov 2% glukozni agar (m/V) (Merck, Njemačka) i fiziološka otopina 0,9% (m/V) (priređena „in house“). Mikrobiološke podloge su predhodno sterilizirane autoklaviranjem na 121°C (1,1 bar) tijekom 20 min (osim RPMI1640 koji je membranski filtriran).

#### **3.3.2. Priprema inokuluma**

Za pripremu inokuluma, pripremljene su svježe kulture kandida. Kandidate su presađene na Sabouraudov 2 % glukozni agar te inkubirane 24 h na 37°C. Inokulum za svaku gljivičnu vrstu je pripremljen suspendiranjem svježih kolonija kandida u fiziološkoj otopini tako da optička gustoća suspenzije bude 0,5 McFarlanda odnosno  $5 \times 10^6$  stanica kandida/mL.

### 3.3.3. Metoda mikrodilucije

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne fungicidne koncentracije (MFK) određene su dvostrukim serijalnim razrijeđenjem metodom mikrodilucije prema preporukama EUCAST Edef. 7.1. (2008) koristeći mikrotitracijske ploče s 96 jažica. U svaku jažicu unešeno je 100 µL umjetne podloge RPMI 1640. Zatim je u prvi red dodano 100 µL ispitivane otopine. Iz prvog reda je polovina sadržaja jažica (100 µL) prebačena u sljedeći red (u kojem je RPMI 1640), pa iz tog u sljedeći i tako dalje sve do zadnjeg reda kad se polovica sadržaja baci. Na taj način dobiveno je dvostruko serijsko razrjeđenje po stupcima mikrotitracijske ploče koje je bilo u rasponu od 15,82 mg/mL do 0,1243 mg/mL i od 0,0622 mg/mL do  $4,875 \times 10^{-4}$  mg/mL za tinkturu, a za otopini berberina od 0.7688 mg/mL do  $6 \times 10^{-3}$  mg/mL. Zatim je u svaku jažicu unešeno 20 µL inokuluma i to tako da se u jažice istog stupca stavlja inokulum jedne kandidate. Konačna koncentracija u svakoj jažici bila je  $8,3 \times 10^4$  stanica / mL. Kontrola za svaki soj priređena je stavljanjem 20 µL inokuluma u 100 µL RPMI 1640. Ploče su inkubirane 48 h na 37°C. Nakon inkubacije svako razrjeđenje nasađivano su na Sabouroudov 2% glukozni agar. Svaka Petrijeva ploča podijeljena je na 9 sektora. Na sektore se pomoću sterilne eze nanosio sadržaj iz jažica mikrotitarske ploče (jedna Petrijeva-jedan soj) i kontrola. Ploče su inkubirane 48 h na 25°C. Za minimalnu fungicidnu koncentraciju uzeta je najniža koncentracija za koju nije bilo vidljivog rasta na sektoru. Za minimalnu inhibitornu koncentraciju uzeta je najniža koncentracija za koju je uočen prorijeđen rast u odnosu na kontrolu.

## 3.4. Inhibicija germinacije blastospora *C. albicans*

### 3.4.1. Priprema inokuluma

Za pripremu inokuluma pripremljena je svježja kultura *C. albicans* MFBF 10774, kliničkog izolata iz rodnice žene s klinički manifestnim vulvovaginitisom. *C. albicans* MFBF 10774 presađena je na Sabouraudov 2 % glukozni agar te inkubirana 24 h na

37°C. Inokulum je pripremljen suspendiranjem kolonija u fiziološkoj otopini tako da optička gustoća suspenzije bude 0,5 McFarlanda odnosno  $5 \times 10^6$  stanica kandida/mL.

#### **3.4.2. Test inhibicije germinacije**

U osam sterilnih plastičnih eppendorf epruveta od 2 mL odpipetirano je 100 µL inokuluma, 800 µL goveđeg fetalnog seruma (FBS, Sigma-Aldrich, SAD) te u prve dvije određeni volumen otopine berberina ( $c=15,376 \mu\text{g/mL}$ , a priređena je razrjeđivanjem STOCK2 otopine), a u preostale dvije određeni volumen razrijeđene tinkture ( $c=318,2 \mu\text{g/mL}$ ) i to tako da ukupni volumen suspenzije bude 1 mL, konačne koncentracije berberina redom su bile:  $3 \mu\text{g/mL}$ ;  $0,3 \mu\text{g/mL}$  i  $0,03 \mu\text{g/mL}$ , a tinktura je u konačnici bila razrijeđena na  $62 \mu\text{g/mL}$ ;  $6,2 \mu\text{g/mL}$  i  $0,062 \mu\text{g/mL}$ .

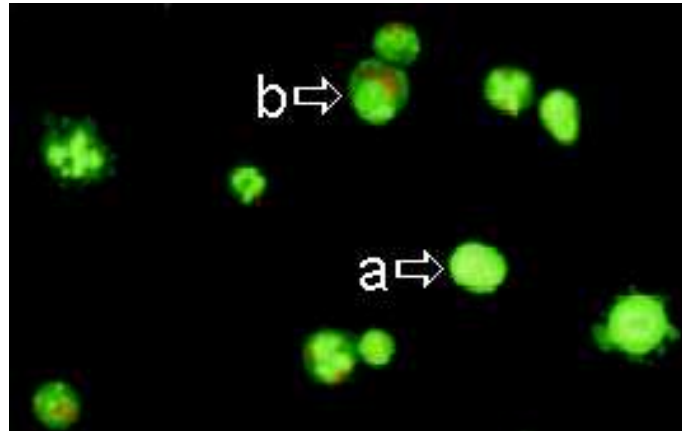
Pozitivna kontrola načinjena je od 100 µL inokuluma, 800 µL FBS-a i 100 µL nistatina ( $c= 5 \text{ mg/mL}$ ), a negativna kontrola od 100 µL inokuluma i 900 µL FBS-a.

Sve epruvete su inkubirane aerobno 5 h na 37°C . Nakon inkubacije, iz svake epruvete uzeto je 10 µL suspenzije te mikroskopirano u hemocitometru pri mikroskopskom povećanju faznog kontrasta od 800 x. Za svaku koncentraciju u pokusu, uključujući i kontrolne skupine, prebrojano je 80 vidnih polja ( $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ ). Statistički je uspoređen odnos % negerminiranog i ukupnog broja blastokonidija (u 80 polja).

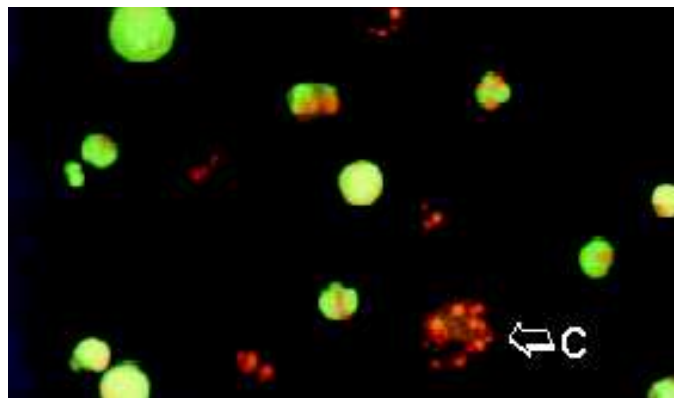
#### **3.5. Ispitivanje vijabilnosti, apoptotičkih i nekrotičkih blastokonidija vrste *C. albicans***

Za utvrđivanje stanične smrti i morfoloških promjena u staničnoj jezgri primjen je postupka ugradbe boja u kojoj se mogu vizualizirati žive blastospore vrste *C. albicans* s intaktnom staničnom stjenkom od mrtvih (s oštećenom staničnom stjenkom) nakon bojanja s fluorescentnim DNA-vezujućim bojama (Slike 2 i 3). Smjesa boja etidij-bromid i akrudin-narančasto je dodana u suspenziju blastospora vrste *C. albicans* u koncentraciji  $100 \mu\text{g/mL}$  (1:1, V/V). Paralelno je izvođena negativna kontrola (blastospore koje nisu tretirane) kao i pozitivna kontrola (blastospore tretirane s 15%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Pod fluorescentim svjetlom i povećanjem 400x izmjereno je na 300 stanica vrste *C. albicans* broj živih, odnosno broj apoptotičkih (u ranoj i kasnoj apoptozi) i

nekrotičkih stanica. Načinjen je koncentracijski niz (u 900  $\mu$ L RPMI1640) od 4 otopine iscrine i 4 otopne berberina te su nakon inokulacije sa 100  $\mu$ L blastospora vrste *C. albicans* MFBF 10781 inkubirano aerobno tijekom 1h na 37°C. Nakon inkubacije, alikvot od 10  $\mu$ L korišten je za mjerenje odnosa apoptoza/nekroza nepsoredno nakon bojanja fluorescentnim bojama unutar 1 minute.



Slika 2. Razlučivanje živih stanica (a) od stanica u apoptozi (b) bojanjem etidij-bromidom i akridin-narančastim



Slika 3. Razlučivanje nekrotičnih stanica (c) bojanjem etidij-bromidom i akridin narančastim

#### **4. Statistička analiza**

Podaci dobiveni mikrodulucijom (MIK vrijednosti) između kandida izoliranih s dva sijela uspoređeni su t-testom s nivoom značajnosti od  $p < 0,05$  upotrebom statističkog programa GraphPad Prism, verzija 5.00 za Windowse, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Grafički prikaz regresijskog pravca, izračun jednadžbe pravca, inhibicija germinacije, odnos apoptoze, nekroz i živih stanica izračunat je kao postotak i prikazan grafički primjenom Excel programa unugtra Windows platforme.



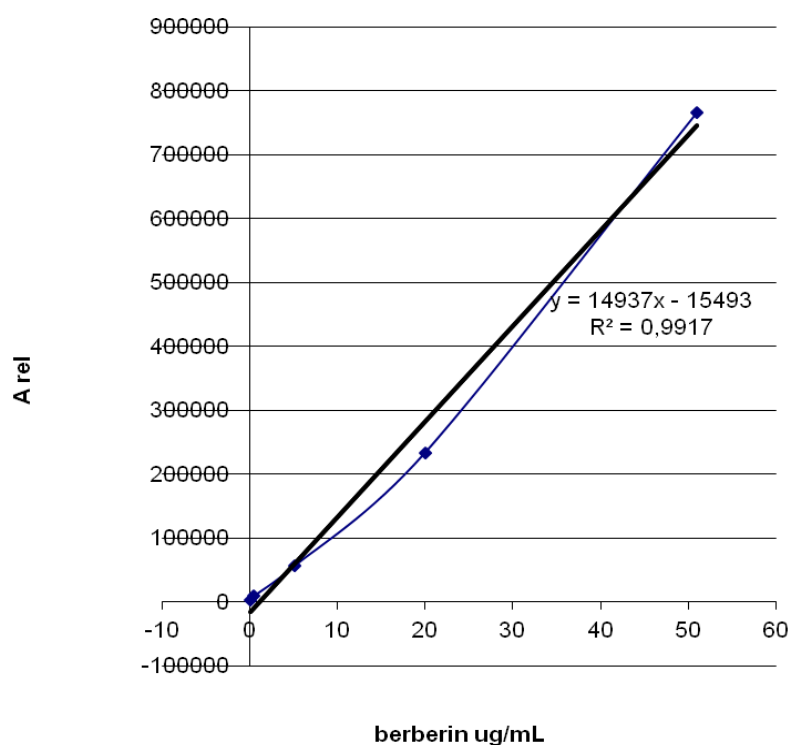
## 5. Rezultati i rasprava

### 5.1. Metoda suhog ostatka

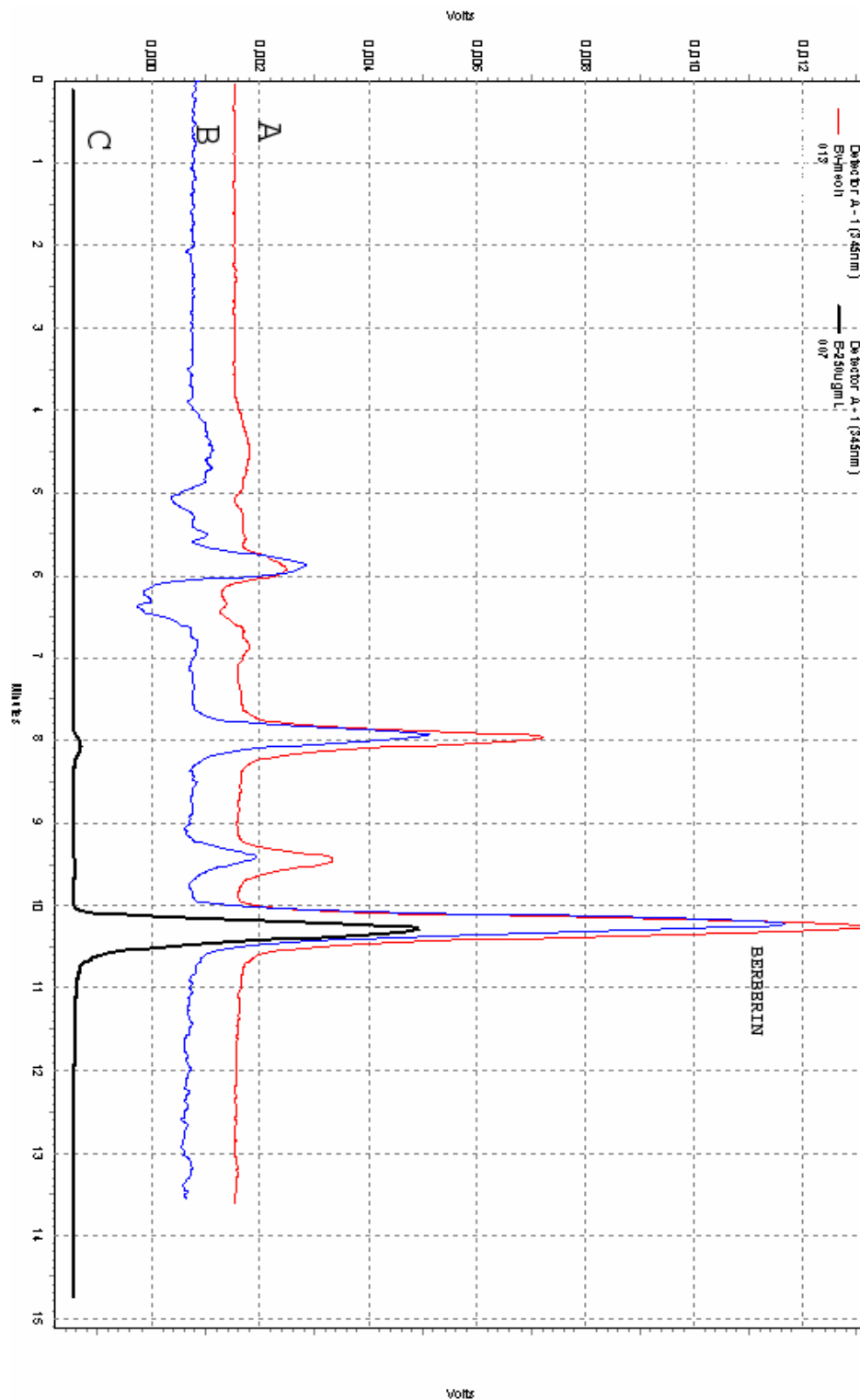
Metodom suhog ostatka određeno je da je koncentracija tinkture 31,82 mg/mL sa standardnom devijacijom 0,23.

### 5.2. HPLC analiza tinkture žutike

Iz jednadžbe regresijskog pravca (Slika 2) te odnosa koncentracije i površine pika u kromatogramu koji odgovara berberinu na dijagramu utvrđeno je da je koncentracija berberina u 20  $\mu$ L inicirane tinkture u kolonu iznosila 13,9786  $\mu$ g/mL. Iz toga je izračunato da je koncentracija berberina u tinkturi 1,5376 mg/mL. Koncentracija berberina u tinkturi iznosi 4,8%.



Slika 2. Regresijski pravac za HPLC analizu berberina



Slika 3. Kromatogram dobiven HPLC analizom tinkture korijena žutike uz standard berberina: A) kromatogram uzorka snimljen na 345 nm, B) kromatogram uzorka snimljen na 325 nm, C) kromatogram standarda berberina

### 5.3. Utvrđivanje MIK i MFK vrijednosti

U tablici 1. prikazani su usporedni rezultati vrijednosti MIK-ova i MFK za etanolnu tinkturu korijena žutike i berberina na veći broj različitih vrsta roda *Candida*. Može se uočiti da se MIK vrijednost za tinkturu kreću između 7,8 i 994,4 µg/mL, dok je ta vrijednost za berberin značajno niža i iznosi između 6 i 48,1 µg/mL, ovisno o gljivičnoj vrsti. Berberin pokazuje vrlo niske MIK vrijednosti na vrste *C. pulcherina*, *C. tropicalis* i *C. albicans*, dok su vrste *C. parapsilosis* i *C. guilliermondii* najotpornije s Mik vrijednostima 48,1 µg/mL (Tablica 1).

Tablica 1. Usporedba MIK i MFK tinkture i berberina za laboratorijske sojeve vrsta roda *Candida*

Vrste roda <i>Candida</i>	Tinktura žutike		Berberin	
	MIK	MFK	MIK	MFK
	µg/mL			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	944,4	1988,8	12	24
<i>C. dubliniensis</i> MFBF 501	497,2	994,4	24	24
<i>C. glabrata</i> MFBF 10806	124,3	497,2	24	24
<i>C. guilliermondii</i> MFBF 10824	994,4	1988,8	48,1	48,1
<i>C. krusei</i> ATCC 14243	7,8	15,6	24	24
<i>C. parapsilosis</i> MFBF 10381	497,2	1988,8	48,1	48,1
<i>C. pulcherina</i> MFBF 10836	248,6	497,2	6	6
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	15,6	31,1	6	6

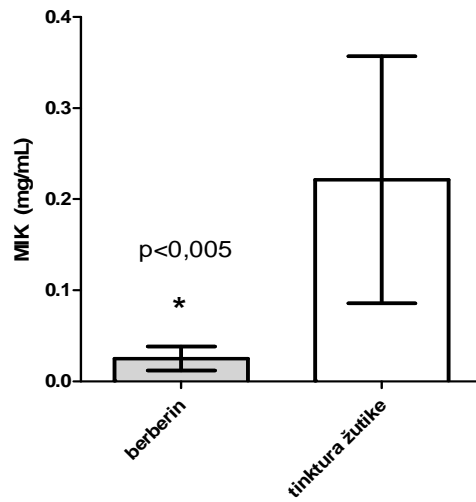
**Legenda:** ATCC=American Type Culture Collection, SAD; MFBF=Zbirka mikroorganizama Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Hrvatska

Tablica 2. Usporedba MIK i MFK vrijednosti tinkture žutike i berberina za kliničke izolate vrste *Candida albicans* iz stolice (N=10)

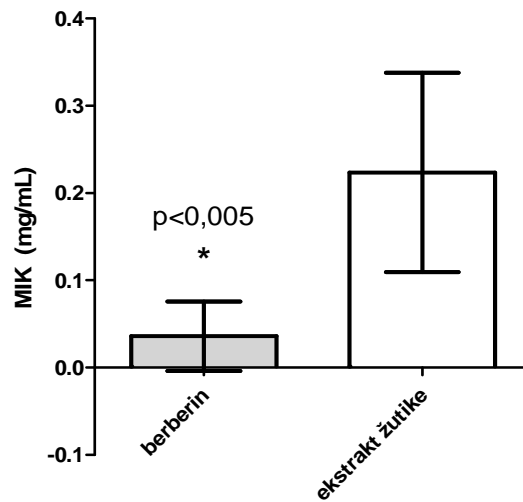
Sojevi <i>C. albicans</i> vrste - izolati iz stolice	Tinktura žutike		Berberin	
	MIK	MFK	MIK	MFK
	µg/mL			
MFBF 10424	248,6	497,2	24	96,1
MFBF 10422	248,6	988,8	48,1	96,1
MFBF 10423	248,6	497,2	24	96,1
MFBF 10425	497,2	977,5	48,1	96,1
MFBF 10348	124,3	248,6	12	24
MFBF 10349	248,6	994,4	24	96,1
MFBF 10350	248,6	994,4	24	48,1
MFBF 10351	248,6	497,2	12	96,1
MFBF 10352	248,6	497,2	24	48,1
MFBF 10353	124,3	497,2	12	24

Tablica 3. Usporedba MIK i MFK vrijednosti tinkture žutike i berberina za kliničke izolate vrste *Candida albicans* iz rodnice (N=10)

Sojevi <i>C. albicans</i> vrste - izolati iz rodnice	Tinktura žutike		Berberin	
	MIK	MFK	MIK	MFK
	µg/mL			
MFBF 10774	124,3	248,6	6	12
MFBF 10784	124,3	497,2	6	48,1
MFBF 10781	124,3	497,2	6	24
MFBF 10775	124,3	497,2	24	48,1
MFBF 10790	248,6	497,2	24	48,1
MFBF 10780	248,6	994,4	96,1	192,2
MFBF 10777	248,6	994,4	6	24
MFBF 10778	497,2	1988,8	96,1	768,8
MFBF 10776	248,6	497,2	24	48,1
MFBF 10773	248,6	994,4	48,1	768,8



Slika 4. Usporedba MIK vrijednosti sojeva *C. albicans* (N=10) izoliranih iz stolice i osjetljivosti na tinkturu žutike i berberin. Značajno niže MIK vrijednosti ( $p < 0,005$ ) utvrđene su za berberin

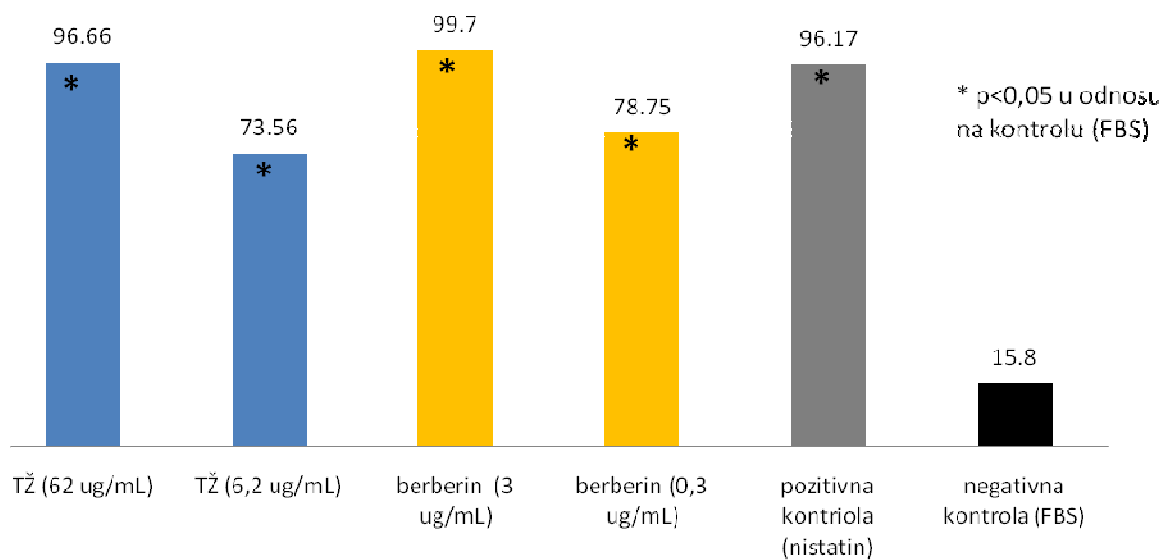


Slika 5. Usporedba MIK vrijednosti sojeva *C. albicans* (N=10) izoliranih iz rodnice i osjetljivosti na tinkturu žutike i berberin. Značajno niže MIK vrijednosti ( $p < 0,005$ ) utvrđene su za berberin

Usporedbom MIK vrijednosti tinkture (ekstrakta) žutike i berberina na 20 sojeva vrste *C. albicans* izoliranih iz dva sijela, stolica i rodnica (Tablica 2 i 3) utvrđeno je slijedeće. U oba slučaja, berberin dominira sa statistički značajno nižom MIK vrijednosti ( $p < 0,005$ ) u odnosu na MIK vrijednosti tinkture žutike, što će reći da je berberin potentniji antimikotik u uvjetima *in vitro*. Ista statistička značajnost između sojeva vrsta *C. albicans* izoliranih iz dva sijela ukazuje da ne postoje razlike u osjetljivosti između sojeva *C. albicans* (Slika 4 i 5.). Barem što se tiče ove metode utvrđivanja MIK i MFK vrijednosti, ne postoji razlika u osjetljivosti sojeva vrste *C. albicans*, no vjerovatno primjenom nekih drugih metoda u uvjetima *in vitro*, kao što je inhibicija vanstaničnih hidrolitičkih enzima iz klase preteaza, fosfolipaza i hemolizina, može se očekivati razlika u tvorbi i posljedična razlika u inhbiciji navedenih enzima.

#### **5.4. Inhibicija germinacije blastospora *C. albicans***

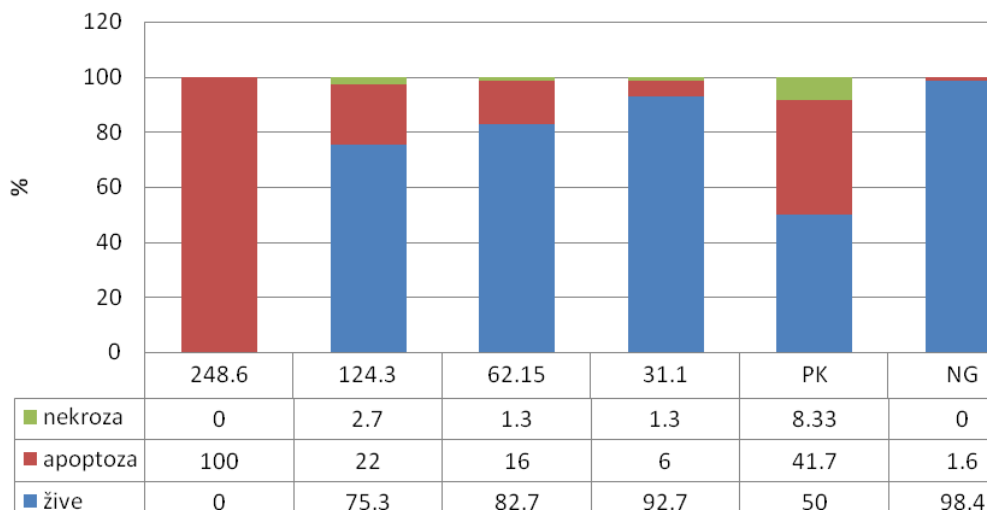
Na Slici 6. prikazani su rezultati inhibicije germinacije blastospora vrste *C. albicans* u goveđem fetalnom serumu (FBS) nakon 5h inkubacije na 37°C. Uočeno je da samo 15,8% blastospora nije germiniralo u FBS-u, koji je izrazito jaki *trigger* za germinaciju blastospora *C. albicans*. Nistatin u koncentraciji od 5 mg/mL izrazito jako inhibira germinaciju *C. albicans* kao jednog od virulentnih čimbenika polimorfne vrste *C. albicans*. U koncentracijama ispod MIK vrijednosti, za ekstrakta žutike u koncentracijama 62 i 6,2 µg/mL utvrđen je snažan inhibirajući učinak na germinaciju blastospora *C. albicans*. Inhibicija višom koncentracijom ekstrakta (62 µg/mL) usporediva je s inhibicijom germinacije nistatinom. Slično se može zaključiti i usporedbom inhibicije germinacije dviju koncentracija berberina. No, kao i slučaju utvrđivanja MIK i MFK koncentracija, berberin u puno nižoj koncentraciji od tinkture žutike iskazuje fungicidni i inhibitorski učinak iz čega se može zaključiti da je berberin potentnija (učinkovitija) tvar od smjese različitih tvari kao što je to tinktura žutike.



Slika 6. Prikaz rezultata inhibicije germinacije blastospora *C. albicans* tretiranih s tinkturom žutike (TŽ) i berberinom, uz pozitivnu (nistatin 0,5 mg/mL) i negativnu kontrolu (FBS)

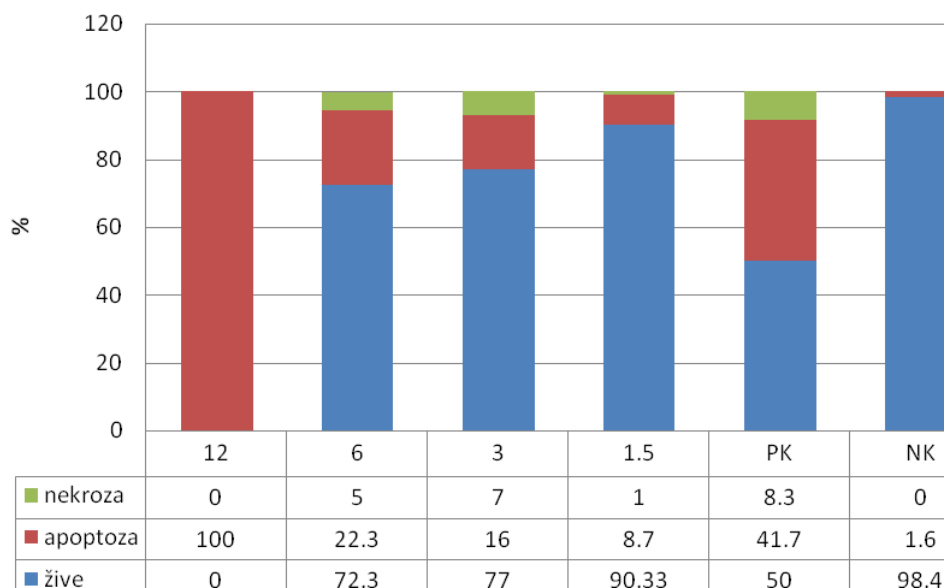
### 5.5. Vijabilnost blastokonidija (apoptoza i nekroza)

Tijekom jednosatne aerobne inkubacije svježih blastospora *C. albicans* MFBF 10781 sa četiri različite koncentracije tinkture žutike uočeno je da pri 2 x većoj koncentraciji od MIK vrijednosti (248,6 µg/mL) dominantan oblik smrti blastospore jest apoptoza (100%). I MIK vrijednosti (koncentracija tinkture žutike iznosi 124,3 µg/mL), broj apoptotičnih stanica iznosi 22%, a nekrotičnih 2,7%. U ½ vrijednosti MIK-a, broj apoptotičnih stanica jest 16%, što je značajno više u odnosu na negativnu kontrolu. U vrijednosti MIK-a od 1/4, koncentracija tinkture žutike iznosi 31,1 µg/mL sa 6% apoptotičnih stanica i 1,3 % nekrotičnih.



Slika 7. Prikaz rezultata vijabilnosti tretiranih blastokonidija vrste *C. albicans* tijekom 1h sa tinkturom žutike u 4 koncentracije (oko MIK vrijednosti), PK = pozitivan kontrola (15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), NG= negativna kontrola (RPMI 1640)





Slika 8. Prikaz rezultata vijabilnosti tretiranih blastokonidija vrste *C. albicans* tijekom 1h sa berberinom u 4 koncentracije (oko MIK vrijednosti), PK = pozitivan kontrola (15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), NG= negativna kontrola (RPMI 1640)

Kao i u slučaju tinkture žutike, dominantan mehanizam uginuća blastospore vrste *C. albicans* jest apoptoza. U vrijednostima 2x višim od MIK vrijednosti, nakon 1h inkubacije gotovo sve blastospore su apoptotične. U vrijednosti MIK-a za berberin (6 μg/mL), 22,3% stanica je u apoptozi sa samo 5% njih u nekrozi. Padom koncentracije berberina, smanjuje se i apoptotičnih inekrotičnih u odnosu na žive blastospore, odnosno točnije na one blastospore kojima je stanična stjenka intaktna. U koncentraciji berberina od ½ vrijednosti MIK-a (3 μg/mL) još uvijek je uočeno apoptotičko djelovanje berberina, značajnije od kontrole.

Iz ovog pokusa se mogu proizvesti zaključci. Naime, tijekom samo 1-satne aerobne inkubacije na 37°C, berberin učinkovito oštećuje staničnu stjenku vrste *C. albicans*, što je vidljivo pojavom 22,3% apoptotičkih stanica, odnosno ulaskom etidij-bromida kroz stjenku i njegovo vezivanje na DNA gljivice. Ovaj podatak otvara nove mogućnosti istraživanja berberina prije svega kao sinergističke molekule uz poznate antimikotike iz klase azola, ili čak otvara mogućnost istraživanja inhibicije eflux pumpi koje su jedan od mehanizama otpornosti gljivica na klinički primjenjenjenjem antimikotike.

Iako mala molekula, berberin je mogući slijedeći kandidat za utvrđivanje preciznijih mehanizam autjecaja na staničnu stjenku kvasaca iz roda *Candida*.

## 7. Zaključak

Na osnovu provedenih istraživanja te statističke obrade podataka može se zaključiti slijedeće:

- a) berberin kao i etanolni ekstrakt korijena žutike (sa 4,8% berberina utvrđenog HPLC postupkom) ispoljavaju širok spektar fungicidnog učinka na vrste roda *Candida*, ali berberin pokazuje značajno niže MIK vrijednosti od ekstrakta,
- b) berberin dominira kao potentniji antimikotik na sojeve vrste *C. albicans* iz različitih sijela sa nižim MIK vrijednostima,
- c) berberin u značajnije nižim koncentracijama od ekstrakta žutike uzrokuje inhibiciju germinacije *C. albicans* kao značajnog virulentnog čimbenika ovog oportunističkog patogena,
- d) berberin dovodi blastosporu vrste *C. albicans* u apoptozu već nakon 1-satne inkubacije oko MIK i 2 x više vrijednosti od MIK-a, što ukazuje na njegov izraziti fungicidni učinak oštećenjem stanične stjenke kvasca .

## 8. Literatura

- Chen, Y., Wang, Y., Zhang, J., Sun, C. i Lopez, A., (2011), *Berberine* Improves Glucose Homeostasis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats in Association with Multiple Factors of Insulin Resistance, International Scholarly Research Network Endocrinology, 2011, 1 – 8.
- European Pharmacopoeia, 6th Ed, EDQM, Strasbourg, Council of Europe, 2006.
- Fatehi, M., Saleh, T.M., Hassanabad, Z. F., Farrokhfal, K., Jafarzadeh, M. i Davodi, S., A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract, Journal of Ethnopharmacology 102, 46 – 52.
- Fujibayashi, T., Nakamaru, M., Tominaga, A., Satoh, N., Kawarai, T., Narisawa, N., Shinozuka, O., Watanbe, H., Yamazaki, T. i Senpuku, H., (2009), Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida spp.* Adherence and Biofilm Formation, Japanese Journal of Infectious Diseases, 62, 337 – 342.
- Hajzadeh, M.A.R., Rajaei, Z., Shafiee, S., Alavinejhad, A., Samarghandian, S. i Ahmadi, M., (2011), Effect of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) on serum glucose and lipids in streptozocin-diabetic rats, Pharmacologyonline 1, 809 – 817.
- Hanachi, P., Kua, S.H., Asmah, R., Motalleb, G. i Fauziah, O., (2006), Cytotoxic Effect of *Berberis vulgaris* Fruit extract on the Proliferation of Human Liver Cancer Cell Line (HepG2) and its Antioxidant Properties, International Journal of Cancer Research, 2(1), 1 – 9.
- Hanachi, P., Othman, F. i Motalleb, G., (2008), Effect of *Berberis vulgaris* Aqueous Extract on the Apoptosis, Sodium and Potassium in Hepatocarcinogenic Rats, Iranian Journal of Basic Medicinal Sciences, 1(2), 62 – 69.
- Hentges, D.J., (1995), Microbiology & Immunology second edition, Little Brown & Co
- Horn, F., Heinekamp, T., Kniemeyer, O., Pollmächer, J., Valiante, V. i Brakhage, A, (2012), Systems biology of fungal infection, Frontiers in Microbiology, 3, 1 - 20
- Kalenić, S., Mlinarić – Missoni, E. i sur., (2005), Medicinska bakteriologija i mikologija, Zagreb, MERKUR A.B.D.

- Katzung, B.G., Masters, S.B. i Trevor, A.J., (2011), Temeljna i klinička farmakologija, Medicinska naklada, Zagreb
- Kolář, D., Wimmerová, L. i Kádek, R., (2010), Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase inhibitory activities of *Berberis vulgaris*, *Phytopharmacology*, 1(1), 7 – 11.
- Kosalec I., Gregurek B, Kremer D, Zovko M, Sanković S, Karlović L., Croatian barberry ( *Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine—analysis and antimicrobial activity, *World journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (2009) 145-150
- Kullberg, B.J., Verweij, P.E., Akova, M., Arendrup, M.C., Bille, J., Calandra, T., Curenca – Estrella, M., Herbrecht, R., Jacobs, F., Kalin, M., Kibbler, C.C., Lortholary, O., Martino, P., Meis, J.F., Munoz, P., Odds, F.C., De Pauw, B.E., Rex, J.H., Roilides, E., Rogers, T.R., Ruhnke, M., Ullmann, A.J., Uzun, O., Vandewoude, K., Vincent, J.-L. i Donnelly, J.P., (2011), European expert opinion on the management of invasive *candidiasis* in adults, *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1 – 12.
- Mahata, S., Bharti, A.C., Shukla, S., Tyagi, A., Husain, S.A. i Das B.C., (2011), *Berberine* modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells, *Molecular Cancer*, 10, 1 - 14.
- Mantena, S.K., Sharma, S.D. i Katiyar, S.K., (2006), *Berberine* inhibits growth, induces G1 arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk1–Cdk-cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP, *Carcinogenesis*, 27(10), 2018 – 2027.
- Meliani, N., Dib, M.D., Allali, H. i Tabti, B., (2011), Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 468 – 471.
- Minaiyana, M., Ghannadib, A., Mahzounic, P. i Jaffari-Shirazid, E., (2011), Comparative Study of *Berberis vulgaris* Fruit Extract and *Berberine* Chloride Effects on Acetic Acid-Induced Colitis in Rats, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), 97 – 104.
- Motalleb, G., Hanachi, P., Fauziah, O. I., Asmah, R., (2008), Effect of *Berberis vulgaris* fruit extract on alpha-fetoprotein gene expression and chemical

- carcinogen metabolizing enzymes activities in hepatocarcinogenesis rats, Iranian Journal of Cancer Prevention, 1(1), 33 – 44.
- Park, K.S., Kang, K.C., Kim, J.H., Adams, D. J., Johng, T.N. i Paik, Y.K., (1999), Differential inhibitory effects of protoberberines on sterol and chitin biosyntheses in *Candida albicans*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43, 667 – 674.
- Park, K.S., Kim, J.B., Bae, J., Park, S.J., Jee, H.G., Lee, K.E. i Youn, Y.K., (2012), *Berberine* Inhibited the Growth of Thyroid Cancer Cell Lines 8505C and TPC1, Yonsei Medical Journal, 53(2), 346 – 351.
- Parsaee, H., Shafei, M.N. i Boskabady, M.H., (2006), Effects of hydro-ethanolic extract of *Berberis vulgaris* fruit on rabbit isolated heart, DARU Journal of Pharmaceutical science, 14(4), 208 – 213.
- Prescot, L.M., Harley, J.P., Klein, A.D., (1993), Microbiology (2nd Ed) second edition, Wm. C. Brown
- Quan, H., Cao, Y.Y., Xu, Z., Zhao, J.X., Gao, P.H., Qin, X.F. i Jiang, Y.Y., (2006), Potent In Vitro Synergism of Fluconazole and *Berberine* Chloride against Clinical Isolates of *Candida albicans* Resistant to Fluconazole, Antimicrobial agents and chemotherapy, 50(3), 1096 – 1099.
- Rao, G.X., Zhang, S., Wang, H.M., Li, Z.M., Gao, S., i Xu, G.L., (2008), *Antifungal* alkaloids from the fresh rattan stem of *Fibraurea recisa* Pierre, Journal of Ethnopharmacology, 123, 1 – 5.
- Sakagami, H., Kobayashi, M., Chien, C.H., Kanegae, H. i Kawase, M., (2007), Selective Toxicity and Type of Cell Death Induced by Various Natural and Synthetic Compounds in Oral Squamous Cell Carcinoma, In vivo, 21, 311 – 320.
- Senjković, R., Osnove oblikovanja lijekova, Zagreb, Školska knjiga, 2003.
- Shamsa, F., Ahmadiani, A. i Khosrokhavar, R., (1999), Antihistaminic and anticholinergic activity of barberry fruit (*Berberis vulgaris*) in the guinea-pig ileum, Journal of Ethnopharmacology, 64, 161 – 166.
- Tan, W., Li, Y., Chen, M. i Wang Y., (2011), *Berberine* hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system, International Journal of Nanomedicine, 6, 1773 – 1777.
- EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of *antifungal* agents for fermentative yeasts, Clin Microbiol Infect

2008; 14: 398–405,  
([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID\\_Library/3Publications/EUCAST\\_Documents/Publications/EUCAST\\_def\\_document\\_in\\_CMI\\_v14\\_MICs\\_yeasts.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/3Publications/EUCAST_Documents/Publications/EUCAST_def_document_in_CMI_v14_MICs_yeasts.pdf), pristupljeno travnja 2012.)

- Wang, Z., Lu, F., Xu, L., Dong, H., (2010), *Berberine* reduces endoplasmic reticulum stress and improves insulin signal transduction in Hep G2 cells, *Acta Pharmacologica Sinica* 31, 578 – 584.
- Wei, G.X., Xu, X. i Wu, C.D., (2011), In vitro synergism between *berberine* and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures, *Archives of oral biology* 56, 565 – 572.
- Yang, J., Yin, J., Gao, H., Xu, L., Wang, Y., Xu, L. i Li., M., (2012), *Berberine* Improves Insulin Sensitivity by Inhibiting Fat Store and Adjusting Adipokines Profile in Human Preadipocytes and Metabolic Syndrome Patients, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1 – 9.
- Yongmoon Han, Y. i Lee, H. J., (2004), *Berberine* Synergy with Amphotericin B against Disseminated Candidiasis in Mice, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(3), 541 – 544.
- Yu, F.S., Yang, J.S., Lin, H.J., Yu, C.S., Tan, T.W., Lin, Y.T., Lin, C.C., Lu, H.F. i Chung, J.G., (2007), *Berberine* Inhibits WEHI-3 Leukemia Cells *In Vivo*, *In vivo*, 21, 407 - 412 .

## 9. Zahvale

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Ivanu Kosalcu na savjetima i pomoći u izradi ovog rada, doc. dr. sc. Marijani Zovko Končić na analizi suhog ostatka, dr. sc. Nevenki Kopjar na fluorescentnoj mikroskopiji te firmi Suban d.o.o. na donaciji biljne droge.

## 10. Sažetak na hrvatskom jeziku

Tanja Jović

### Antifungalni učinci berberina u uvjetima

#### *in vitro*

Vrste roda *Candida* su endogeni oportunistički kvasci. U zdravih osoba, gdje nalazimo ravnotežu između mikrobioma i makroorganizma, ne uzrokuju infekciju. No, narušavanjem ravnoteže, komenzalizam prelazi u infekciju s kliničkom manifestacijom. Cilj ovog rada je utvrditi i usporediti antifungalni učinak alkaloida berberina te iscrpine kore korjena žutike (*Berberidis radic cortex*) na kliničke izolate sojeva i vrsta roda *Candida*. Izokratnom HPLC metodom utvrđeno je da iscrpina sadrži 1,5376 mg/mL berberina. Mikrodulucijom u *in vitro* uvjetima je utvrđeno da MIK vrijednosti za iscrpinu iznose između 7,8 i 944,4 µg/mL, dok za berberin MIK vrijednosti su značajno niže i iznose između 6 i 48,1 µg/mL ovisno o kandida vrsti. Nadalje, utvrđeno je da berberin u značajano nižim koncentracijama od iscrpine korjenba žutike inhibira germinaciju vrste *C. albicans* (već od 3 do 0,3 µg/mL). Berberin također dovodi blastosporu vrste *C. albicans* do apoptoze u MIK i 2 x višim koncentracijama od MIK vrijednosti (12 odnosno 6 µg/mL) već nakon 1-satne aerobne inkubacije na 37°C. Iz dobivenih podataka se može zaključiti da je berberin izrazito interesantna molekula za daljnja istraživanja mehanizama antifungalnog učinka, ali i mogućeg sinergističkog učinka s antimikoticima.

**Ključne riječi:** antifungalni učinak, *Candida* spp., berberin

## 11. Summary

Tanja Jović

### Antifungal activity of berberin *in vitro*

Species of the gender *Candida* are domestic opportunistic yeasts. In healthy people, where we can find balance between microbiome and macroorganism, they don't cause infection. But, by disrupting the balance, commensalism turns into infection with clinical manifestation. The aim of this study was to investigate and compare the antifungal effect of the ethanolic extract of *Berberis radice* cortex and berberine on clinical isolates of strains and species of the gender *Candida*. With the isocratic HPLC method it was determined that the concentration of berberine in the extract was 1,5376 mg/mL. The MIC values were determined *in vitro* using the microdilution method. They ranged from 7,8 to 944,4 µg/mL for the extract and from 6 to 48,1 µg/mL for berberine depending on the *Candida* species and strain. The MIC values for berberine were significantly lower when compared with the extract. Furthermore, the concentrations of berberine that inhibit germination of *C. albicans* were considerably lower (from 3 to 0,3 µg/mL) than those of the extract. Berberine also induced apoptosis in *C. albicans* blastoconidia in MIC and twofold greater concentrations (12 and 6 µg/mL) after aerobic incubation at 37°C in duration of only one hour. From the data we have collected it can be concluded that berberine is an interesting molecule for further research about the mechanism of antifungal activity and eventual synergism with other antimicrobics.

Key words: antifungal activity, *Candida* spp., berberine

## 12. Životopis

Rođena sam 30.03.1991. u Hagenu, Stadtteil Boele, Njemačka. Osnovnu školu sam pohađala u Jovićima i Ražancu (Osnovna škola Jurja Barakovića), a srednju u Zadru (matematičko-prirodoslovni smjer Gimnazije Franje Petrića). Maturirala sam 2009. godine. Zahvaljujući odličnom uspjehu tijekom sve četiri godine srednjoškolskog obrazovanja bila sam oslobođena od polaganja mature. Sudjelovala sam na natjecanjim iz predmeta matematika i kemija. Najveći uspjeh mi je bio sudjelovanje



na državnom natjecanju iz kemije 2009. godine. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, smjer farmacija, upisala sam 2009. i trenutačno sam redoviti student treće godine.