

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Marija Z. Nenadić

ANTIMIKROBNI I ANTITUMORSKI POTENCIJAL
SEKRETA I MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA
ŽLEZDANIH STRUKTURA PIGIDIJALNIH ŽLEZDA
ODABRANIH VRSTA TRČULJAKA (COLEOPTERA:
CARABIDAE)

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

University of Belgrade

Faculty of Biology

Marija Z. Nenadić

ANTIMICROBIAL AND ANTITUMOR POTENTIAL OF
THE SECRETIONS AND MORPHOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF THE GLANDULAR
STRUCTURES OF THE PYGIDIAL GLANDS OF
SELECTED SPECIES OF GROUND BEETLES
(COLEOPTERA: CARABIDAE)

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

Dr Srećko Ćurčić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Ana Ćirić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Članovi komisije:

Dr Marina Soković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

Dr Dejan Pantelić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za fiziku

Dr Ivica Dimkić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: ____ . ____ . 2019.

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija nastala je jednim delom uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Ministarstva nauke i tehnologije Narodne Republike Kine, realizacijom projekta „Bio-inspirisani materijali za fotonske senzore i bezbednosne uređaje“ (evidencioni broj I-2), čiji su rukovodioci dopisni član SANU dr Branislav Jelenković i dr Žang Vang. Premda je potpisuje jedan autor, ona je proizašla iz predanog timskog rada kolega sa Katedre za zoologiju beskičmenjaka i entomologiju Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta, zatim, saradnika iz Mikološke laboratorije Odeljenja za fiziologiju biljaka Univerziteta u Beogradu - Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i kolega iz Centra za fotoniku Univerziteta u Beogradu - Instituta za fiziku, kao i iz nesebične saradnje sa kolegama sa drugih katedri Fakulteta i institucija. Stoga se zahvaljujem kolegama sa Katedre za mikrobiologiju i Katedre za algologiju, mikologiju i lihenologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta, na posvećenosti, kao i na divnoj saradnji i želji da učestvuju u ovom naučnom poduhvatu, čime je ova multidisciplinarna studija zadobila celovitu sliku. Takođe, zahvaljujem se Marini Todosijević sa Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, , kao i kolegama sa Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta na savetima i profesionalnom doprinosu tokom izrade eksperimentalnog dela ove disertacije. Zahvalnost dugujem i prof. dr Isabel C.F.R. Ferreira, kao i timu iz Mountain Research Centre (CIMO) Politehničkog instituta u Bragansi u Portugalu, na uspešnoj zajedničkoj saradnji.

Zahvaljujem dr Ivici Dimkiću sa Katedre za mikrobiologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta na nesebičnoj saradnji tokom zajedničkih istraživanja, kao i na pomoći, dragocenim sugestijama i podršci tokom izrade ove disertacije.

Posebnu zahvalnost i duboko poštovanje upućujem dr Dejanu Panteliću iz Centra za fotoniku Univerziteta u Beogradu - Instituta za fiziku, koji je podržao, i dan-danas podržava sve moje ideje i moj entuzijazam. Hvala na nesebično pruženom znanju i podršci u izradi velikog dela ove disertacije. Zajedničkim snagama smo ukazali na neraskidivu sponu fizike i biologije, što će naći još značajniju potvrdu u našoj budućoj saradnji.

Dr Marini Soković i dr Jasmini Glamočliji, mojim prvim mentorima u životu, želim da iskažem posebnu, veliku zahvalnost na ogromnoj podršci, zalaganju i postavljanju osnovnih

temelja za sva moja dosadašnja naučna istraživanja. Nihov uticaj je bio od velikog značaja u mojim prvim „naučnim koracima“.

Ogromnu i neizrecivu zahvalnost dugujem mojim mentorima prof. dr Srećku Ćurčiću i dr Ani Ćirić, na bezuslovnoj podršci, razumevanju, izuzetnoj stručnosti, posvećenosti i hrabrosti za nove naučne poduhvate na našem zajedničkom putu za sve ove godine predanog rada na ovoj tezi. Imala sam veliku privilegiju, čast i sreću da budem vođena ovakvim mentorima tokom doktorskih akademskih studija.

Zahvaljujem se svojoj matičnoj naučnoj kući, Univerzitetu u Beogradu - Biološkom fakultetu, kao i najbližem krugu saradnika sa Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta. Hvala vam na predivnoj saradnji i radnoj atmosferi, posvećenosti, savetima i znanju. Velika privilegija i zadovoljstvo je saradivati sa vama.

Takođe, želela bih da se zahvalim i profesorki Osme beogradske gimnazije i mom prijatelju Mirjani Unčanin, koja me je od ranih dana usmerila i sa ljubavlju pružila snažne temelje za moje današnje znanje iz oblasti biologije i zahvaljujući kojoj sam prvi put kročila na Biološki fakultet.

Naposletku, moji voljeni mama, sestra, kum i članovi uže i šire porodice, kao i moji dragi prijatelji su bili moja najveća podrška svih ovih godina. Beskrajno hvala na razumevanju, neizrecivoj ljubavi i prelepim željama.

Zahvaljujem se Leni, mojoj inspiraciji, podršci i saborcu.

Ovu disertaciju posvećujem tati i baki, mojim anđelima, koji su me uveli u svet biologije i naučili da se samo snažnom verom i poverenjem postižu veliki koraci u životu.

Svima onima koji podižu pogled ka zvezdama, pronalazeći odgovore izvan onoga što vide...

Autor

Antimikrobni i antitumorski potencijal sekreta i morfološka karakterizacija žlezdanih struktura pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka (Coleoptera: Carabidae)

~ REZIME ~

Ispitivanje pigidijalnog žlezdanog kompleksa nalazi značajno mesto u karabidologiji, prevažodno sa stanovišta morfologije i taksonomije, ali u novije vreme i ostalih aspekata koji se mogu odnositi na potencijalnu upotrebu primarnih produkata ovih žlezda u biomedicinskim istraživanjima. Ovaj kompleks predstavlja sistem egzokrinih žlezda koji se sastoji od sekretornih lobusa izgrađenih od sekretornih ćelija, gde se sekreti sintetišu, zatim radijalnih sabirnih kanala, glavnog sabirnog kanala, rezervoara, gde se sekreti skladište, i eferentnog kanala, čija je uloga transport sekreta iz rezervoara u spoljašnju sredinu. Primarna funkcija sekreta pigidijalnih žlezda jeste odbrana trčuljaka od potencijalnih predatora iz prirode. U hemijski sastav ovih sekreta ulazi čitav niz jedinjenja koja se uglavnom ubrajaju u aldehide, ketone i organske kiseline. U poslednje vreme postoji interesovanje za istraživanje antimikrobnog i antitumorskog potencijala navedenih smeša sekreta, s obzirom da je prethodno dokazan antimikrobni i antitumorski potencijal pojedinačnih jedinjenja koja se nalaze u njihovom sastavu.

Ciljevi ove doktorske disertacije su usmereni ka ispitivanju antimikrobnog i antitumorskog potencijala sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka, što može imati značaj u bazičnim biomedicinskim istraživanjima, kao i ka pronalaženju pozadine ovakvih bioloških aktivnosti u ekološkoj funkciji kod ovih insekata, koja bi podobnije bila približena detaljnijom opservacijom pigidijalnih žlezdanih struktura sa morfo-anatomskog aspekta, primenom elektronske i nelinearne mikroskopije, što bi doprinelo i boljem razumevanju fiziologije ovog sistema.

U prvom delu doktorske disertacije koji obuhvata biomedicinski aspekt, posmatrana je po prvi put antimikrobna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda 6 odabranih vrsta trčuljaka na humane patogene (osam laboratorijskih i kliničkih bakterijskih sojeva i osam patogenih mikromiceta), kao i citotoksičnost sekreta 4 odabrane vrste trčuljaka na netumorske (primarne ćelije jetre izolovane iz organizma svinje) i humane tumorske ćelijske linije (nesitnoćelijski karcinom pluća,

cervikalni karcinom, adenokarcinom dojke i hepatocelularni karcinom). Određivanjem minimalnih inhibitornih (MIK), minimalnih baktericidnih (MBK) i minimalnih fungicidnih koncentracija (MFK) je potvrđeno da sekreti pigidijalnih žlezda ispitivanih vrsta poseduju određen stepen antimikrobnog dejstva, koji se razlikovao od vrste do vrste, što je posledica različitog hemijskog sastava smeše sekreta kod odabranih vrsta. Najjači antibakterijski efekat je zabeležen nakon tretiranja većine patogenih sekreta vrste *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828), uz nešto veću rezistenciju sojeva *Micrococcus flavus* i *Escherichia coli*, što je bilo zanemarljivo u odnosu na sekrete ostalih testiranih vrsta. Sojevi *Listeria monocytogenes* i *Enterobacter cloacae* su pokazali određen stepen rezistentnosti u odnosu na sekret *L. (P.) punctatus* (MIK 0,022 mg/mL, MBK 0,045 mg/mL), koji je bio sličan stepenu rezistentnosti koji je postignut u odnosu na streptomycin (MIK 0,016 mg/mL, MBK 0,032 mg/mL). Najveća rezistentnost ispitivanih bakterijskih patogenih sojeva je zabeležena nakon tretmana sekreta vrste *Calosoma (Calosoma) sycophanta* (Linnaeus, 1758), koji je pokazao antibakterijski efekat samo pri tretiranju *E. coli*. Visok antimikrobni potencijal sekreta vrste *L. (P.) punctatus* se ogleda i u njegovom antifungalnom efektu, s obzirom da su MIK i MFK koncentracije pokazivale do 5 puta manje vrednosti u odnosu na sintetički antimikotik bifonazol. U slučaju testiranja pojedinih otpornijih mikromiceta (*Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma viride*), ovaj sekret je pokazao 20-50 puta jači efekat (MIK 0,022 mg/mL, MFK 0,044 mg/mL) u odnosu na komercijalni antimikotik ketokonazol, dok je pri testiranju mikromicete *Penicillium ochrochloron* antifungalno dejstvo ovog sekreta bilo 150-200 puta veće (MIK 0,012 mg/mL, MFK 0,022 mg/mL) od pozitivne kontrole (MIK 2,503 mg/mL, MFK 3,467 mg/mL). Sekret vrste *C. (C.) sycophanta* je pokazao približno isti antifungalni efekat u poređenju sa prethodno pomenutim sekretom.

U cilju potvrđivanja antimikrobne aktivnosti i ispitivanja potencijalnog antitumorskog dejstva sekreta, primenjen je Sulforodamin B test, kojim je utvrđen nizak stepen citotoksičnosti na netumorske ćelije svih testiranih sekreta, kao i nizak stepen citotoksičnosti na tumorske ćelijske linije, sa izuzetkom kada je u pitanju sekret pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus*, koji je dosegao približno 50% inhibicije ćelijske proliferacije MCF7 ćelijske linije (adenokarcinom dojke) pri najvećoj koncentraciji (0,1 µg/mL).

Kako je sekret pigidijalnih žlezda troglofilne vrste *L. (P.) punctatus* pokazao neuporedivo najviši stepen antimikrobnog dejstva u odnosu na sekrete svih ispitanih vrsta trčuljaka, kao i nizak citotoksični efekat na netumorske ćelije i zapažen stepen citotoksičnog dejstva na MCF7 ćelijsku liniju, pristupilo se ispitivanju njegovog antimikrobnog dejstva na patogene izolovane iz guana i sa zidova Ogoreličke pećine, koju ova vrsta trčuljaka nastanjuje. Dakle, ovaj deo studije se odnosi na ekološki aspekt, prilikom čega je primenom mikrodilucione metode testiran antibakterijski efekat ovog sekreta na bakterijske izolate iz guana, pri čemu je sekret vrste *L. (P.) punctatus* postigao značajan stepen antibakterijskog dejstva na izolat *Enterococcus eurekaensis*, sa najnižom zabeleženom MIK vrednošću od 0,007 mg/mL, koji je pokazao istovremeno rezistentnost prema antibiotiku streptomycinu pri najvišoj testiranoj koncentraciji. Izolat *Escherichia fergusonii* je pokazao izraženu osetljivost prema sekretu, gotovo duplo višu u poređenju sa testiranim antibiotikom streptomycinom. Takođe, ovaj sekret je postigao i određen stepen antifungalne aktivnosti u odnosu na guanofilne mikromicete. Sve ispitane vrste mikromiceta su pokazale sličan stepen senzibiliteta u odnosu na testirani sekret, a posebno treba uzeti u obzir antifungalno dejstvo sekreta na *Penicillium citrinum* (MIK 0,303 mg/mL, MFK 0,6 mg/mL) i *Trichoderma harzianum* (MIK 0,152 mg/mL, MFK 0,303 mg/mL), koje je bilo efikasnije od antimikotika nistatina (MIK 0,503 mg/mL, MFK 1,003 mg/mL za *P. citrinum*; MIK 0,252 mg/mL, MFK 0,757 mg/mL za *T. harzianum*).

Kada su u pitanju mikromicete, izolovane sa nižih delova zida pećine (neposredno u blizini guana) ustanovljeno je da se *Penicillium* sp. pokazao kao najsenzibilnija vrsta mikromiceta u odnosu na testirani sekret.

Poseban deo studije se odnosi na istraživanje morfo-anatomskog aspekta pigidijalnog žlezdanog kompleksa odabranih vrsta trčuljaka. Radi detaljne karakterizacije ispitivanih žlezda, primenjeni su SEM, kada je u pitanju ispitivanje morfologije (i), kao i NLM (TPEF modalitet), u cilju detaljnijeg ispitivanja morfologije i anatomije (ii), koristeći prednosti koje ove mikroskopske tehnike pružaju. Određena je adekvatna metodologija pripreme ovog tkiva za SEM i ustanovljeno je da se ovaj vid elektronske mikroskopije pokazao kao najpouzdanija i najpreciznija mikroskopska metoda kada je u pitanju proučavanje spoljašnje morfologije, dok je detaljniji uvid u unutrašnju morfologiju pružio TPEF modalitet NLM. Postignut je detaljan uvid u realnu formu struktura i registrovan je pravilan raspored i dijametar posmatranih

mikrostruktura (raspored intercelularnih lumena sekretornih lobusa, promer i unutrašnja struktuiranost sabirnih kanalića, debljina i struktura glavnog sabirnog i eferentnog kanala, raspored i debljina snopova mišićnih vlakana zida rezervoara). Zabeležena je pretpostavljena sličnost u morfologiji pigidijalnih žlezda analiziranih predstavnika roda *Carabus*, dok je na poprečnom preseku sekretornih lobusa jedinki vrste *L. (P.) punctatus* primećeno da ove strukture mogu zauzimati i elipsoidnu formu, pored već prethodno utvrđenog sferičnog i bubrežastog oblika. Kada su u pitanju rezervoari ovog žlezdanog sistema, ustanovljeno je da dimenzije rezervoara mogu varirati između jedinki iste vrste, kako veličina ovih struktura proporcionalno prati njihovu veličinu tela. Rezultati ispitivanja morfo-anatomskeg aspekta pigidijalnih žlezda umnogome doprinose otvaranju mogućnosti za dalja detaljnija istraživanja na ovom planu, a samim tim i za ispitivanja celokupnog posmatranog sistema na fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou.

Ispitivanje i korelacija aspekata posmatranih u ovoj disertaciji mogu zauzeti posebno mesto u daljim medicinskim istraživanjima i otvoriti važno poglavlje za pronalazak sintetičkih analoga, što može doprineti napretku terapija u budućnosti.

***Ključne reči:* Carabidae, pigidijalne žlezde, humani patogeni, antimikrobna aktivnost, mikrodiluciona metoda, citotoksični efekat, antitumorski potencijal, sulforodamin B esej, guano, SEM, TPEF, NLM.**

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, sistematika i filogenija životinja

**Antimicrobial and antitumor potential of the secretions and morphological
characterization of the glandular structures of the pygidial glands of selected species of
ground beetles (Coleoptera: Carabidae)**

~ **ABSTRACT** ~

Examination of pygidial glandular complex finds a significant place in carabidology, primarily from the point of view of morphology and taxonomy. This complex of exocrine glands consists of secretory lobes, containing secretory cells, where secretions are synthesized, then radial collecting canals, main collecting canal, reservoir, where secretions are stored, and efferent duct, which carries out secretion from reservoir outwards. Primary function of these secretions is to defend ground beetles against potential predators from nature. The secretions are chemically composed of a variety of compounds, such as aldehydes, ketones, organic acids and other chemicals. Investigations of antimicrobial and antitumor potential of the secretion mixtures are currently of a great interest, as it has been previously shown that such compounds individually possess antimicrobial and antitumor action.

The goals of this doctoral dissertation are focused on examining the antimicrobial and antitumor potential of the pygidial gland secretions of selected species of ground beetles, which can be important in basic biomedical research, as well as finding the ecological background of such biological activities of these insect secretions, with detailed observation of pygidial glandular structures from the morpho-anatomic aspect, by using electronic and non-linear microscopy, which contributes to a better comprehending of the physiology of this system.

Therefore, in the first part of the doctoral dissertation, which includes biomedical aspect, antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of six selected ground beetle species has been observed against human pathogens (eight laboratory and clinical bacterial strains and eight pathogenic micromycetes), as well as the cytotoxicity of the secretion of four selected ground beetle species on non-tumor (primary pork liver cells) and human tumor cell lines (non-small cell lung carcinoma, cervical cancer, breast adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma). Using microdilution method in order to determine minimum inhibitory (MICs), minimum bactericidal

(MBCs) and minimum fungicidal concentrations (MFCs), it has been confirmed that the secretions of pygidial glands of the tested ground beetle species have a certain level of antimicrobial activity, which differed between species, that is caused by the difference in chemical composition of the secretion mixtures. The highest antibacterial effect has been observed after treatment of most pathogens with secretion of *Laemostenus (Pristonychus) punctatus*, while strains of *Micrococcus flavus* and *Escherichia coli* showed slightly higher resistance to the secretion of the mentioned ground beetle species, which was insignificant compared to the secretions of other tested ground beetles. Bacterial strains *Listeria monocytogenes* and *Enterobacter cloacae* showed a certain degree of resistance in relation to secretion of *L. (P.) punctatus* (MIC 0.022 mg/mL, MBC 0.045 mg/mL), which was similar to the achieved resistance with respect to streptomycin (MIC 0.016 mg/mL, MBC 0.032 mg/mL). The highest resistance of tested pathogenic strains has been noticed after treatment of the secretion of *Calosoma (Calosoma) sycophanta*, which achieved antibacterial effect against *E. coli* only. A high antimicrobial potential of the secretion of *L. (P.) punctatus* is also reflected in its antifungal effect, as MIC and MFC were approximately up to five times less than the ones of synthetic antimycotic bifonazole. In the case of testing certain resistant micromycetes (*Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma viride*), this secretion showed 20-50 times higher effect (MIC 0.022 mg/mL, MFC 0.044 mg/mL) compared to commercial antimycotic ketoconazole, while regarding *Penicillium ochrochloron*, the antifungal effect of this secretion was between 150-200 times higher (MIC 0.012 mg/mL, MFC 0.022 mg/mL) compared to positive control (MIC 2.503 mg/mL, MFC 3.467 mg/mL). The secretion of *C. (C.) sycophanta* showed approximately the same antifungal effect compared to the above-mentioned secretion.

In order to confirm antimicrobial activity and investigate potential antitumor action of these secretions, Sulforhodamine B assay was applied. It has been established a low degree of cytotoxicity of all tested secretions on non-tumor cells, as well as a low degree of cytotoxicity on tumor cell lines, with the exception of pygidial secretion of *L. (P.) punctatus*, which caused approximately 50% of inhibition of MCF7 (breast adenocarcinoma) cell line proliferation at the highest concentration (0.1 µg/mL).

As the pygidial gland secretion of troglomorphic species *L. (P.) punctatus* showed significantly the highest level of antimicrobial activity compared to the secretions of all tested

ground beetle species, as well as a low cytotoxic effect on non-tumor cells and a noticeable degree of cytotoxic effect on the MCF7 cell line, its antimicrobial effect on pathogenic microorganisms isolated from guano and walls in the Ogorelička Pećina Cave, which represents a specific habitat of this species. Thus, the second part of this study is related to ecological aspect. Using microdilution method, the antibacterial effect of this secretion against bacterial isolates from guano was tested. The secretion of *L. (P.) punctatus* achieved an unbearable degree of antibacterial effect against *Enterococcus eurekaensis* (with the lowest MIC value of 0.007 mg/mL), which showed simultaneous resistance to streptomycin at the highest tested concentration. *Escherichia fergusonii* showed particular sensitivity to the secretion, almost twice higher compared to the tested antibiotic streptomycin.

Likewise, this secretion has achieved a certain degree of antifungal activity in relation to guanophilic micromycetes, which showed a similar sensitivity compared to the tested secretion. In particular, should be considered the antifungal effect of this secretion on *Penicillium citrinum* (MIC 0.303 mg/mL, MFC 0.6 mg/mL) and *Trichoderma harzianum* (MIC 0.152 mg/mL, MFC 0.303 mg/mL), which proved to be more efficient, compared to the antimycotic nystatin (MIC 0.503 mg/mL, MFC 1.003 mg/mL - *P. citrinum*; MIC 0.252 mg/mL, MFC 0.757 mg/mL - *T. harzianum*). Concerning micromycetes isolated from lower parts of walls in the Ogorelička Pećina Cave (near guano), *Penicillium* sp. proved to be the most sensitive isolate after treatment with this secretion.

A special part of this study comprises morpho-anatomical observation of pygidial glandular complexes of the selected ground beetle species. For a more detailed approach to the characterization of the examined glands SEM was applied to observe their morphology (i), while the TPEF modality of NLM was used for a more detailed insight into morpho-anatomy (ii). An adequate methodology for the preparation of this tissue for SEM has been established, and It has been noticed that SEM was the most appropriate microscopic method in investigating morphology of these glands, while a more detailed insight into internal morphology was provided by the TPEF modality of NLM microscopy. A detailed insight into the real form of structures has been achieved and the proper arrangements and diameters of the observed microstructures (the arrangement of intercellular lumen of the secretory lobes, the diameter and internal structure of the collecting channels, the thickness and structure of the main collecting

channels and efferent ducts, the arrangement and thickness of the muscle fibers within the wall of the reservoirs) have been observed. Previously assumed similarity in the morphology of pygidial glands of the analyzed species of the genus *Carabus* Linnaeus, 1758 was recorded. On the cross-sections of the secretory lobes of the *L. (P.) punctatus* species, it was noticed that these structures could have an ellipsoidal shape (In previous studies a spherical either kidney shape was detected). Regarding to reservoirs of this glandular system, it has been established that the dimensions of the reservoir can be variable among individuals of the same species, as these structures are proportional to the size of the body. Results of examinations of the morpho-anatomical aspect of these glands in large part contribute to opening up of possibilities for further detailed research in this field, and the possibilities for examining the entire observed system at the physiological, biochemical and molecular level.

Examination and correlation of aspects observed in this thesis could take a special place in further medical research, particularly in terms of invention of synthetic analogs, which can contribute to the progression of therapies in the future.

Key words: Carabidae, pygidial glands, human pathogens, antimicrobial activity, microdilution method, cytotoxic effect, antitumor potential, sulforhodamine B assay, guano, SEM, TPEF, NLM.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Animal Morphology, Systematics and Phylogeny

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opšte karakteristike porodice trčuljaka (Carabidae).....	2
1.1.1. Ontogenija, evolucija, distribucija i značaj porodice Carabidae.....	2
1.1.2. Morfo-anatomske karakteristike porodice Carabidae, sa posebnim osvrtom na pigidijalni žlezdani kompleks.....	6
<i>1.1.2.1. Morfo-anatomski i histološki aspekt pigidijalnih žlezda.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.2.2. Biosinteza i hemijski sastav organskih jedinjenja sekreta pigidijalnih žlezda; interspecijska varijabilnost u hemijskom sastavu sekreta pigidijalnih žlezda.....</i>	<i>13</i>
1.2. Biološka aktivnost izlučevina insekata, sa posebnim osvrtom na dejstvo sekreta pigidijalnih žlezda predstavnika porodice Carabidae.....	18
1.2.1. Antimikrobna aktivnost.....	22
<i>1.2.1.1. Mehanizam antibakterijskog dejstva.....</i>	<i>27</i>
<i>1.2.1.2. Mehanizam antifungalnog dejstva.....</i>	<i>28</i>
1.2.2. Antitumorski potencijal i citotoksična bioaktivnost; mehanizam antitumorskog dejstva	30
1.2.3. Potencijalna primena produkata insekata u različitim oblastima humane medicine.....	31
1.3. Ekološki principi i varijabilnost unutar porodice Carabidae.....	34
1.3.1. Ekološki odnosi trčuljaka i mikroorganizama pećinskih staništa.....	36
1.4. Metodološki pristup u opservaciji morfologije pigidijalnog žlezdanog sistema; uloga i primena skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i nelinearne mikroskopije (NLM) u karabidologiji.....	39

1.4.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija: opšti biofizički principi i instrumentacija.....	41
1.4.2. Dvofotonski eksitovana fluorescentna nelinearna mikroskopija: opšti biofizički principi i instrumentacija.....	45
2. CILJEVI.....	50
3. MATERIJAL I METODE.....	51
3.1. Sakupljanje i rukovanje primercima iz prirode.....	51
3.1.1. Prikupljanje jedinki trčuljaka iz prirode.....	51
<i>3.1.1.1. Opšte karakteristike ispitivanih vrsta trčuljaka.....</i>	<i>51</i>
<i>3.1.1.2. Lokaliteti.....</i>	<i>54</i>
3.1.2. Sakupljanje uzoraka bakterija i mikromiceta iz pećinskog staništa.....	55
<i>3.1.2.1. Prikupljanje i izolacija uzoraka mikromiceta sa zidova pećine.....</i>	<i>55</i>
<i>3.1.2.2. Prikupljanje uzoraka guana.....</i>	<i>56</i>
3.2. Izolovanje i merenje mase sekreta pigidijalnih žlezda sakupljenih trčuljaka.....	57
3.3. In vitro antimikrobna studija.....	57
3.3.1. Primenjeni biološki material.....	57
3.3.2. Sintetički antibiotici i antimikotici.....	58
3.3.3. Hranljivi medijumi.....	59
3.3.4. Priprema prekonocnih kultura bakterija.....	59
<i>3.3.4.1. Testirani sojevi bakterija.....</i>	<i>60</i>
<i>3.3.4.1.1. Humani patogeni.....</i>	<i>60</i>
<i>3.3.4.1.2. Izolati iz guana.....</i>	<i>60</i>
3.3.5. Priprema kultura mikromiceta.....	61
<i>3.3.5.1. Testirani sojevi mikromiceta.....</i>	<i>61</i>
<i>3.3.5.1.1. Humani patogeni.....</i>	<i>61</i>
<i>3.3.5.1.2. Pećinski izolati.....</i>	<i>61</i>
3.3.6. Mikrodiluciona metoda.....	62

3.3.6.1. <i>Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)</i>	63
3.3.6.2. <i>Određivanje minimalne baktericidne (MBK) i minimalne fungicidne (MFK) koncentracije</i>	64
3.3.7. Statistička analiza i kvantifikacija rezultata dobijenih antimikrobnim esejem	65
3.4. <i>In vitro</i> citotoksični test na netumorske i tumorske ćelijske linije	66
3.4.1. Primenjeni biološki material	66
3.4.2. Sintetički antikancerogeni lek	66
3.4.3. Testirana netumorska ćelijska kultura: priprema ćelijske kulture	66
3.4.4. Testirane tumorske ćelijske linije: priprema ćelijskih kultura	67
3.4.5. Sulforodamin B (SRB) esej	67
3.4.6. Statistička analiza i kvantifikacija rezultata dobijenih citotoksičnim esejem	68
3.5. Morfo-anatomska studija pigidijalnog žlezdanog kompleksa	68
3.5.1. Histološka izolacija pigidijalnog žlezdanog kompleksa	68
3.5.2. Primena skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM)	69
3.5.2.1. <i>Histološka priprema tkiva za SEM</i>	69
3.5.2.2. <i>Eksperimentalna postavka i primena SEM</i>	69
3.5.3. Primena TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije	70
3.5.3.1. <i>Histološka priprema tkiva za primenu TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije</i>	70
3.5.3.2. <i>Eksperimentalna postavka i primena TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije</i>	70
4. REZULTATI	72
4.1. Antimikrobna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka na humane patogene	72
4.1.1. Ukupna koncentracija ekstrahovanog sekreta pigidijalnih žlezda ispitivanih vrsta trčuljaka	72
4.1.2. Antibakterijski efekat na humane patogene	73

4.1.3. Antifungalni efekat na humane patogene.....	77
4.2. Antimikrobna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste <i>Laemostenus (Pristonychus) punctatus</i> (Dejean, 1828) na bakterije i mikromicete izolovane iz pećinskog staništa.....	82
4.2.1. Ukupna koncentracija izolovanog sekreta pigidijalnih žlezda vrste <i>L. (P.) punctatus</i>	83
4.2.2. Antibakterijska aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda vrste <i>L. (P.) punctatus</i> na bakterijske sojeve izolovane iz guana u Ogoreličkoj pećini.....	84
4.2.3. Antifungalna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda vrste <i>L. (P.) punctatus</i> na mikromicete izolovane iz Ogoreličke pećine.....	86
4.2.3.1. Selektivno identifikovani izolati mikromiceta sa zidova pećine.....	86
4.2.3.2. Antifungalna aktivnost sekreta vrste <i>L. (P.) punctatus</i>	87
4.2.3.2.1. Antifungalni efekat sekreta na mikromicete izolovane sa zidova pećine.....	87
4.2.3.2.2. Antifungalni efekat sekreta na mikromicete izolovane iz guana.....	88
4.3. Citotoksični potencijal sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka...	89
4.4. Morfo-anatomski aspekti pigidijalnog žlezdanog kompleksa odabranih vrsta trčuljaka; uvid u spoljašnju i unutrašnju morfologiju i anatomiju.....	91
4.4.1. Primena SEM u analizi spoljašnje morfologije pigidijalnog žlezdanog sistema odabranih vrsta.....	91
4.4.1.1. Spoljašnji morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste <i>Abax (Abax) parallelepipedus</i> (Piller & Mitterpacher, 1783).....	91
4.4.1.2. Spoljašnji morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste <i>Carabus (Procrustes) coriaceus</i> (Linnaeus, 1758).....	93
4.4.1.3. Spoljašnji morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste <i>Laemostenus (Pristonychus) punctatus</i> (Dejean, 1828).....	96

4.4.2. Primena TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije u analizi morfologije i anatomije pigidijalnog žlezdanog sistema odabranih vrsta.....	101
4.4.2.1. <i>Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste Abax (Abax) parallelepipedus (Piller & Mitterpacher, 1783).....</i>	101
4.4.2.2. <i>Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste Carabus (Tomocarabus) convexus Fabricius, 1775.....</i>	104
4.4.2.3. <i>Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste Carabus (Procrustes) coriaceus Linnaeus, 1758.....</i>	105
4.4.2.4. <i>Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste Carabus (Eucarabus) ullrichii Germar, 1824.....</i>	108
4.4.2.5. <i>Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste Laemostenus (Pristonychus) punctatus (Dejean, 1828).....</i>	111
5. DISKUSIJA.....	113
5.1. Antimikrobna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka na humane patogene.....	113
5.1.1. Antibakterijsko dejstvo sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka.....	115
5.1.2. Antifungalno dejstvo sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka.....	117
5.2. Antitumorski i citotoksični potencijal sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka i drugih produkata tvrdokrilaca.....	118
5.3. Korelacija između antimikrobne aktivnosti i antitumorskog i citotoksičnog potencijala jedinjenja sekreta pigidijalnih žlezda trčuljaka.....	121
5.4. Ekološki odnosi trčuljaka i mikroorganizama iz njihovih staništa.....	124
5.4.1. Antibakterijska aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste <i>L. (P.) punctatus</i> na izolate iz guana.....	127

5.4.2. Antifungalna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste <i>L. (P.) punctatus</i> na mikromicete izolovane sa zidova pećine i iz guana.....	129
5.5. Morfo-anatomska karakterizacija i histološka analiza pigidijalnog žlezdanog kompleksa odabranih vrsta trčuljaka; primena skenirajuće elektronske i dvofotonski pobuđene nelinearne mikroskopije.....	131
5.5.1. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste <i>A. (A.) parallelepipedus</i>	132
5.5.2. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste <i>C. (T.) convexus</i>	134
5.5.3. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste <i>C. (P.) coriaceus</i>	134
5.5.4. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste <i>C. (E.) ullrichii</i>	135
5.5.5. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste <i>L. (P.) punctatus</i>	136
5.5.6. Komparacija morfoloških struktura pigidijalnog žlezdanog kompleksa između posmatranih vrsta trčuljaka i poredenje različitih mikroskopskih tehnika.....	138
6. ZAKLJUČCI.....	141
7. PRILOZI.....	145
<i>Lista skraćenica stručnih pojmova</i>	151
8. LITERATURA.....	153
Internet adrese.....	183
9. BIOGRAFIJA.....	184
10. SPISAK RADOVA PROISTEKLIH IZ DOKTORSKE DISERTACIJE.....	185

1. UVOD

„Zagledajte se nešto dublje u prirodu, tek onda ćete sve razumeti bolje.“

Albert Ajnštajn

Pojedina istraživanja u oblasti karabidologije, ne tako davno, ukazala su na pronalaženje jasne spona između pojave određenih odbrambenih mehanizama predstavnika porodice trčuljaka (Carabidae) kao adaptabilnih odgovora ove grupe tvrdokrilaca i potencijalne sekundarne primene produkata procesa ovakve odbrane, što može biti od potencijalnog značaja za čoveka.

Kako polako nastupa era u kojoj se javlja sve veća rezistencija patogena na dejstvo sintetičkih antibiotika i antimikotika, uključujući i iste šireg spektra, nauka se usmerava ka traganju za jedinstvenim sa antimikrobnim svojstvima, poreklom iz prirode. Korelacija ovakvih efekata i ispitivanja citotoksičnosti potencijalnih antimikrobnih agenasa je nezaobilazna, što ukazuje na moguću primenu istih, sa aspekta medicine u nekoj daljoj budućnosti. Ovakva činjenica upućuje na ideju da se pored ispitivanja nivoa toksičnosti na normalno proliferišuće ćelije, testira i ista biološka aktivnost na tumorske ćelijske linije, kako *in vitro*, tako i *in vivo*, kako postoji neosporna koherentnost antimikrobne i antitumorske aktivnosti. Takođe, neophodno je napomenuti da se ključna pojašnjenja bilo kakvih fizioloških procesa i bioloških aktivnosti mogu pronaći u bazičnim studijama, koje se tiču morfoloških i anatomskih aspekata bioloških struktura ovih insekata. Kako bismo istražili podobnije određene biohemijske puteve i fiziološke mehanizme, važno je detaljno izučiti morfologiju i anatomiju strukture od interesa u celosti. Time se morfologija može smatrati jednom zasebnom celinom koja pruža kompletnu sliku u ovakvim istraživanjima.

Važnost i značaj istraživanja na poljima pomenutih bioloških naučnih oblasti ogledaju se u primeni postignutih saznanja u različitim granama nauke, poput biologije, fizike, hemije i biomedicine, koristeći multidisciplinarni pristup. U vezi sa pomenutim aspektima, porodica Carabidae predstavlja nedovoljno istraženu grupu insekata. Stoga je veoma značajno istražiti

podesno sve nivoe, kako bi ovakva saznanja mogla naći iskonsku svrhu i primenu u budućnosti, ne samo sa stanovišta humane medicine, već i sa ekološkog aspekta.

1.1. Opšte karakteristike porodice trčuljaka (Carabidae)

Carabidae predstavljaju široko distribuiranu porodicu insekata, najbrojniju u okviru podreda Adephaga, koji zajedno sa podredovima Archostemata, Myxophaga i Polyphaga danas sačinjavaju red Coleoptera (tvrdokrilaca). Brojnost i bogatstvo taksona, diverzitet i intra- i interspecijska varijabilnost, prevashodno u obojenosti jedinki, doprineli su da ova grupa insekata bude u fokusu mnogih entomologa u poslednjih nekoliko decenija (Lövei & Sunderland, 1996). Trenutno broje preko 40000 opisanih vrsta, klasifikovanih u 86 tribusa i veći broj potporodica poput Anthiinae, Apotominae, Brachininae, Broscinae, Carabinae, Cicindelinae, Ctenodactylinae, Dryptinae, Elaphrinae, Gineminae, Harpalinae, Hiletinae, Lebiinae, Licininae, Loricarinae, Melaeninae, Migadopinae, Nebriinae, Nototylinae, Omophroninae, Orthogoniinae, Panagaeinae, Paussinae, Platyninae, Promecognathinae, Protorabinae, Pseudomorphinae, Psydriinae, Pterostichinae, Rhysodinae, Scaritinae, Siagoninae, Trechinae i Xenaroswellianinae. Postojeće zabeležene cifre o brojnosti vrsta u okviru porodice nisu nešto što možemo uzeti u obzir *a priori*, kako se broj otkrivenih vrsta rapidno povećava na godišnjem nivou (Erwin, 1985; Kotze et al., 2011).

Predstavnici ove mnogobrojne porodice naseljavaju varijabilna staništa i podnose drastične fluktuacije abiotičkih i biotičkih faktora, te se mogu detektovati u različitim kopnenim ekosistemima, uključujući travnate, šumske, ali i agroekosisteme. Pored epigejskih taksona, identifikovan je i značajan broj troglobilnih i troglobiontnih vrsta (Kotze et al., 2011).

1.1.1. Ontogenija, evolucija, distribucija i značaj porodice Carabidae

U ontogenetskom smislu, trčuljci predstavljaju holometabolne insekte, odnosno insekte sa potpunim razvićem koji prolaze kroz 4 stadijuma, uključujući i stadijum lutke (*pupa*). Većinom preferiraju da polažu jaja pojedinačno. Ženke pažljivo biraju mesto za ovipoziciju, a

katkad kopaju posebna udubljenja u zemlji za polaganje jaja. Za neke predstavnike tribusa Pterostichini je karakteristična priprema kokona, u koje se čitava grupa od nekoliko jajašaca sigurno skladišti. Kod ove grupe tvrdokrilaca je zabeležen i jedan vid parentalnog ponašanja, odnosno zaštite potomstva, kako pokazuju određen stepen sposobnosti za očuvanje jaja (Brandmayr & Zetto-Brandmayr, 1979). Poseduju pokretan i slobodan kampodeidni tip larve (Crowson, 1981). Najčešće kod ovih insekata postoje tri larvalna stupnja pre stadijuma lutke. Na primer, neke vrste rodova *Harpalus* Latreille, 1802 i *Amara* Bonelli, 1810, pak, poseduju samo dva larvalna stupnja. Međutim, kod predstavnika pojedinih tribusa možemo uočiti i do deset larvalnih stupnjeva, od kojih oni poslednji su slabo mobilni (Lövei & Sunderland, 1996).

Kada posmatramo distribuciju trčuljaka, danas je zabeleženo ukupno 44 tribusa na području Palearktika, dok su samo na prostoru srednje Evrope evidentirana 32 tribusa. Na isključivo evropskom kontinentu, najviši stepen varijabilnosti je zastupljen u južnim regionima, te je najveći broj vrsta identifikovan na području Italije (Turin et al., 2003; Kotze et al., 2011). Slična brojnost je zabeležena na Balkanskom poluostrvu, dok je konkretno u našoj zemlji prisutna izrazito visoka stopa diverziteta. Samo unutar Specijalnog rezervata prirode „Zasavica“, koji se nalazi na području južne Vojvodine, identifikovane su čak 72 vrste trčuljaka, klasifikovane u 15 tribusa (Ćurčić & Stanković, 2011). Prema publikovanim podacima (Ćurčić et al., 2007), na području Srbije je do sada zabeleženo 576 vrsta trčuljaka, a trenutno našu zemlju naseljava 610 vrsta, premda se taj broj svakodnevno uvećava (Ćurčić, pers. comm.).

Nastanak novih vrsta, odnosno specijacija, zatim pravci distribucije populacija, kao i fenotipska i genetička varijabilnost umnogome razjašnjavaju studije koje se dotiču aspekta evolucione istorije ove taksonomske grupe. Kako interspecijska varijabilnost, tako i varijabilnost populacija unutar vrsta ove interesantne i mnogobrojne grupe tvrdokrilaca jeste posledica dugog evolutivnog razvoja čiji počeci datiraju iz doba ranog mezozoika. Do prve pojave trčuljaka u ranom tercijaru došlo je u uslovima vlažne klime u tropskim biotopima, kada se nije ni slutilo da će ovi dominantni predatori adaptivnom radijacijom u juri zauzeti i najekstremnije klimatske oblasti (Beutel, 1997). Naime, smatra se da Carabidae predstavljaju jedinstvenu evolutivnu granu, poput porodice Trachypachidae, te da su potekle paralelno od zajedničkog kopnenog “karabidoidnog” pretka koji se razvio krajem paleozoika. Nešto kasnije će ova grupa doživeti

adaptivnu radijaciju prema suvim staništima, u severnoj hemisferi, što je u usko povezano sa evolucijom angiospermi. Fenomen koji je karakterističan u nastanku široko disperznih vrsta porodice Carabidae jeste alopatrička specijacija, odnosno alopatrička paralelna evolucija. Ovaj vid specijacije podrazumeva slučaj u kome se kod više od tri vrste beleži vrlo visoki stepen morfološke podudarnosti, premda svaka od navedenih pripada različitim nezavisnim filogenetskim linijama. Tako kod ove porodice često dolazi do diskontinuiteta morfoloških promena. Na primer, taksoni roda *Carabus* Linnaeus, 1758 su distribuirani u Evroaziji i Severnoj Americi i odvojeni su u tri nezavisna specijska kompleksa. Međutim, sa morfološkog aspekta, primerci svih intraspecijskih populacija su objedinjeni u jednu vrstu, zbog ne tako značajnih međusobnih razlika između sebe. Značajan impakt na specijaciju unutar ove porodice su imali i glacijalni periodi u kasnom pleistocenu, čija se smena događala na svakih 100000 godina, a samo dostizanje vrhunca u Fraserskoj glacijaciji je zadesilo Zemlju pre oko 25000-15000 godina. Ovakvi geološki procesi su naročito definisali današnju biogeografiju Severne Amerike, pogađajući i menjajući sastav i distribuciju vrsta trčuljaka. U razdoblju smena glacijalnih i interglacijalnih perioda su nastajali refugijumi, čija je glavna uloga bila očuvanje diverziteta vrsta (Homburg et al., 2013). Ova mesta su se odlikovala očuvanim uslovima života, gde su se vrste kojima je pretilo izumiranje pod vrlo surovim uslovima klime u toku ledenih doba mogle skrivati i razmnožavati. Refugijumi su dosta doprineli raznovrsnosti živog sveta na prostoru Severne Amerike, uključujući i trčuljke. Još uvek postoje debate o doprinosu obalskih refugijuma u specijaciji različitih taksonomskih grupa. (Beutel, 1997; Clarke et al., 2011).

Kao što je pomenuto, visoki stepen varijabilnosti, ali i adaptabilnosti trčuljaka u odnosu na česta kolebanja sredinskih faktora su posledica dugotrajne evolucione istorije ove taksonomske grupe. Ovakve osobine nalaze značajan doprinos u ekološkim istraživanjima i rešavanju ekoloških pitanja, kao i u poljoprivrednom domenu. Dakle, kako je porodica Carabidae dobro proučena sa aspekta taksonomije, sa relativno stabilnom sistematikom i izraženom varijabilnošću u morfologiji, kao i strategijama za preživljavanje u različitim abiotičkim i biotičkim uslovima, njihovoj bioindikatorskoj ulozi se daje veliki primat. Naročito su učestali predmet istraživanja u vezi ispitivanja kolebanja ekoloških faktora, fragmentacije i zagađivanja zemljišta, te se neretko upotrebljavaju kao bioindikator za procenu kvaliteta zemljišta (Avgin &

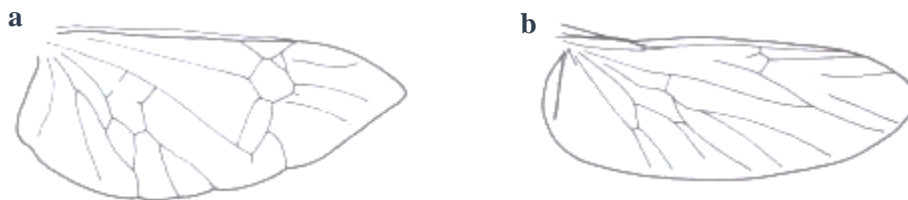
Luff, 2010; Koivula, 2011). Pomenuto se ne može uzeti u obzir kada je u pitanju određivanje kontaminacije sredine teškim metalima, kako je zapažena slaba akumulacija istih od strane pripadnika ove porodice. Međutim, monitoring stepena zagađenosti sredine je od presudnog značaja kada je u pitanju konzervacija celokupne taksonomske grupe, naročito kada se osvrnemo na potencijalni negativni uticaj teških metala na fiziologiju, ponašanje i reproduktivni učinak ovih jedinki. Između ostalog, od velikog značaja jeste posmatranje i praćenje negativnog uticaja faktora urbanizacije na diverzitet i bogatstvo vrsta karabida, prevashodno u šumskim ekosistemima. Međutim, ukoliko bi se očuvala staništa koja su esencijalna za ove vrste, kao što su vlažna mikrostaništa u trulom drvetu i zemljištu, moguće je održati ekvilibrijum po pitanju diverziteta ove grupe (Venn et al., 2003).

Očuvanje trčuljaka je veoma značajno zbog njihove primene, prevashodno u agronomiji, kako pojedine vrste sa krupnijim jedinkama, poput *Carabus* (*Carabus*) *granulatus* Linnaeus, 1758 i *C. (Morphocarabus) scheidleri* Panzer, 1799, preferiraju prelazne zajednice (ekotone) i središta agroekosistema, što je značajno u biološkoj kontroli štetočina i zaštiti useva, ali i očuvanju prirode (Gongalsky & Cividanes, 2008). Dakle, ne samo da se ova grupa tvrdokrilaca označava korisnom po pitanju očuvanja agroekosistema, već i po pitanju konzervacije prirode na nekultivisanim površinama, kao što su šumski ekosistemi, kako postoje vrste koje se hrane gubarom i drugim štetočinama drveća. Prethodno se odnosi prevashodno na vrstu *Calosoma* (*Calosoma*) *sycophanta* (Linnaeus, 1758) (Kanat & Özboilat, 2006). Pored značaja u ekologiji i agronomiji, trčuljci se mogu koristiti i u biomimeticima u svrhu konstruisanja različitih sistema i materijala u tehnologiji i industriji (Beheshti & McIntosh, 2006; McIntosh & Prongidis, 2010; McIntosh & Lawrence, 2018).

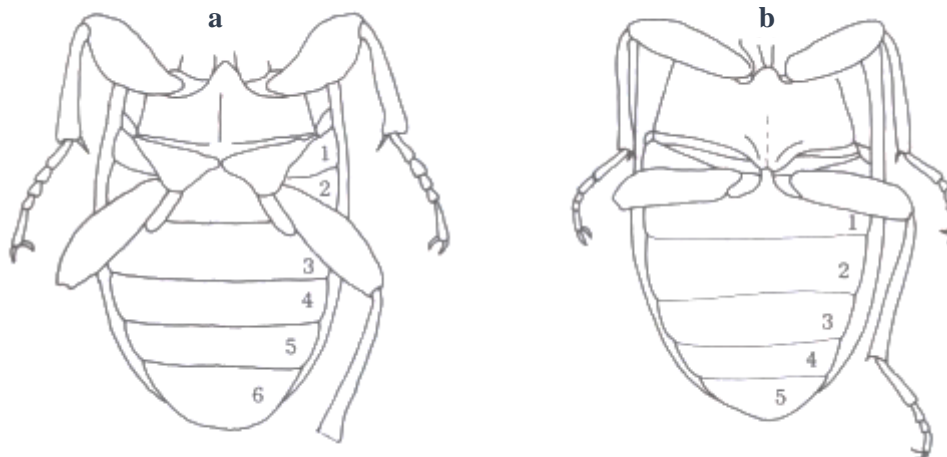
Neosporna je činjenica da je konzervacija vrsta unutar porodice Carabidae uslovljena evolutivnim i ekološkim aspektima koji podrazumevaju ključno poznavanje različitih oblasti poput morfologije, fiziologije, biohemije i molekularne biologije, ali i biologije ponašanja. Stoga je u karabidologiji veoma važno osnuti se na više aspekata i više nivoa, odnosno pristupiti multidisciplinarnom istraživanju u cilju boljeg i detaljnijeg studiranja same grupe, prevashodno zbog njenog udela u oblastima koje mogu biti značajne za čoveka.

1.1.2. Morfo-anatomske karakteristike porodice Carabidae, sa posebnim osvrtom na pigidijalni žlezdani kompleks

Evolucija porodice Carabidae sa morfo-anatomskog aspekta je išla definitivno u pravcu nastanka tri različite morfološke forme tela. Naime, uprkos strukturnoj varijabilnosti, ovi insekti su prilično uniformni u morfološkom smislu (Thiele, 1977). Kao i ostali insekti, trčuljci poseduju tri para ekstremiteta za kretanje na toraksu, pri čemu svaki torakalni segment nosi po par ekstremiteta koji se pojedinačno sastoje od pet segmenata. Sa telom su ekstremiteti povezani putem koksi (*coxa*), na koju se nastavlja butni valjak (*trochanter*) i femur, zatim tibia, dok se na distalnom kraju nalazi tarsus sa po pet tarzomera. Na petoj tarzomeri se nalaze parne kandžice. Metakokse kod trčuljaka su drugačije u odnosu na iste kod akvatičnih Adephaga i mogu rotirati slobodno oko pleuralnog i sternalnog zgloba. Poseduju elite (pokrilca, prva krila) kojima je prekriven drugi par krila. Nervatura krila je kod ove grupe, takođe, vrlo specifična, i kao takva veoma značajna za identifikaciju na višim taksonomskim nivoima. Zapravo, ovakva nervatura je karakteristična za celokupni podred Adephaga i označava se kao “adefagni tip” nervature (**Slika 1a**) (Desender et al., 1994). Isto tako, broj abdominalnih segmenata Adephaga (**Slika 2a**) se razlikuje od istog kod prestavnika Polyphaga (**Slika 2b**).



Slika 1. Prikaz razlike u nervaturi krila kod (a) Adephaga i (b) Polyphaga (preuzeto iz Trautner & Geigenmüller, 1987).



**Slika 2. Prikaz ventralne strane abdomena (a) Adephegini
i (b) Polyphagini (preuzeto iz Trautner & Geigenmüller,
1987).**

Međutim, u osnovi, evolucioni trend se kod trčuljaka razlikovao u odnosu na druge insekte, a ogledao se prevashodno u postepenom povećanju glave i pronotuma u odnosu na abdomen. Naime, kod njih se javljaju sledeće morfološke forme: cihroidan, proceroidni i abakoidan tip. Kod cihroidnog tipa postoji uska glava, a pronotum i suženje između toraksa i abdomena povećavaju pokretljivost. Kod proceroidnog tipa su uvećani glava i pronotum, ali i dalje postoji suženje između grudi i abdomena. Kod abakoidnog tipa postoje robusni pronotum i glava, ali nema suženja između toraksa i abdomena. Posebno je izražena spljoštenost u dorzoventralnom pravcu. Takođe, morfološki karakteri su se oblikovali i prema načinu lokomocije. Naime, kada bi se osvrnuli na ancestralni morfološki tip građe, uočili bismo formu tela i različite strukture prilagođene na trčanje. Ovakva adaptacija je umnogome uticala i na njihovu današnju morfologiju, prevashodno kada su u pitanju zadnji par ekstremiteta i veličina metatrohantera. Ovi trohanteri sadrže femoralni muskularni rotator, čime je omogućena rotacija femura oko trohantera. Danas se razlikuju tri tipa lokomocije kod ove grupe insekata. Kod prvog tipa postoji adaptacija na brzo trčanje, što se morfološki ogleda u kraćem metatrohanteru,

dugačkim segmentima ekstremiteta i manjoj masi tela. Ovaj morfološki tip poseduju predstavnici rodova *Cicindela* Linnaeus, 1758, *Nebria* Latreille, 1802, *Leistus* Frölich, 1799, *Notiophilus* Duméril, 1806, *Loricera* Latreille, 1802 i *Elaphrus* Fabricius, 1775. Drugi tip se odnosi na lokomociju koja se zasniva na snažnom guranju i probijanju tela ka napred, što podrazumeva duge metatrohantere i varijabilne forme tela (npr. vrste rodova *Harpalus* Latreille, 1802 i *Amara* Bonelli, 1810). Treća grupa obuhvata vrste čija se lokomocija zasniva na snažnom horizontalnom potiskivanju tela u pravcu kretanja. Oni poseduju kratke i uske zadnje ekstremitete, dok su prednji ekstremiteti specijalizovani za kopanje. Tu spadaju najsporije vrste trčuljaka (npr. vrste rodova *Clivina* Latreille, 1802, *Scarites* Fabricius, 1775 i *Dyschirius* Bonelli, 1810) (Evans, 1977; Ribera et al., 1999).

Osim adaptacija koje omogućavaju bežanje, trčuljci su razvili i druge načine, odnosno mehanizme, u odbrani od potencijalnih predatora (Giglio et al., 2011). Naime, svi pripadnici porodice Carabidae poseduju par odbrambenih egzokrinih pigidijalnih žlezda, koje po poreklu predstavljaju parne dorzalne kutikularne invaginacije telesnog zida (Kanehisa & Shiraga, 1978). Ove anatomske simetrične strukture su pozicionirane u posteriornom delu abdomena, u nivou gonada i čine žlezdani sistem karakterističan za čitav podred Adephaga (Dettner, 1987). Pigidijalni žlezdani sistem sadrži u svom sastavu tri međusobno povezane funkcionalne celine, različite sa morfološkog aspekta. Ove celine podrazumevaju, redom: sekretorni deo, izgrađen u od većeg broja sekretornih lobusa (acinusa), najčešće sferične do elipsaste forme, koji sadrže sekretorne ćelije, grupisane oko centralnog sabirnog lumena, a u kojima se odbrambeni sekret sintetiše (i), transporni deo, koji podrazumeva strukture koje omogućavaju izlivanje sekreta iz sekretornog dela u druge delove ovog sistema (te strukture su predstavljene većim brojem sabirnih kanalića, uglavnom radijalno raspoređenih, a koji se grupišu u glavni sabirni kanal, koji zajedno sa njima upotpunjuje ovu funkcionalnu celinu) (ii) i sabirni deo, u koji se uliva glavni sabirni kanal, a koga čini sabirni (kolektorski) rezervoar, u kome se sekret skladišti do izlučivanja (iii). Sekret ispunjava lumen rezervoara koji je obložen glatkom muskulaturom, čija kontrakcija omogućava potiskivanje sekreta iz rezervoara kroz eferentni kanal u spoljašnju sredinu. Eferentni kanal se izliva u spoljašnju sredinu u nivou osmog abdominalnog segmenta sa ventralne strane (Bonacci et al., 2011). Ovako opisane pigidijalne strukture su uglavnom prisutne

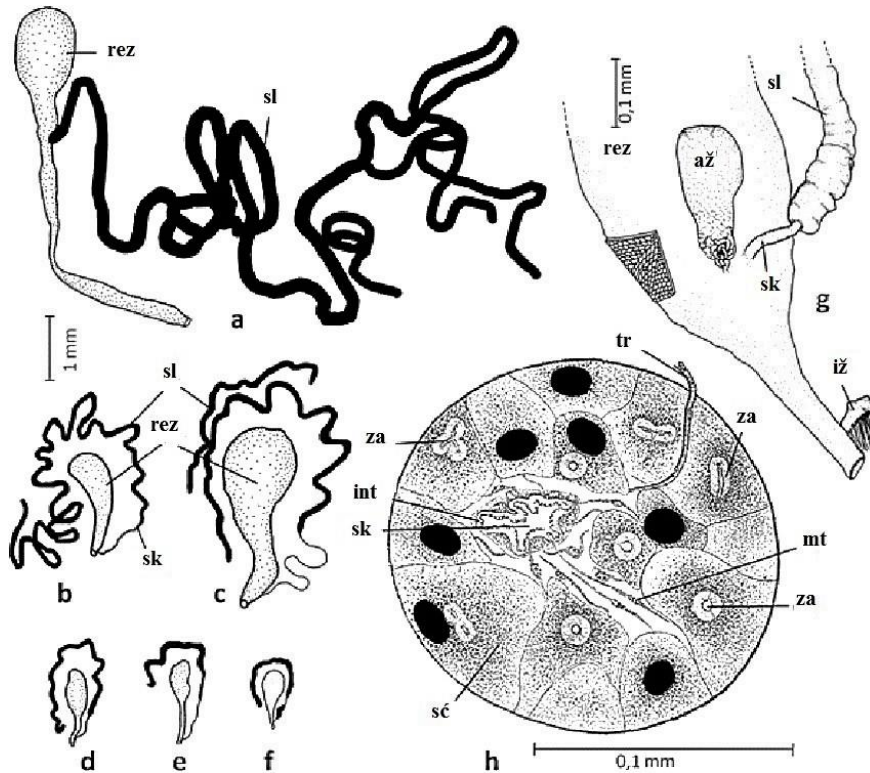
kod evolutivno starijih žlezdanih aparata. Ove žlezde su varijabilne po strukturi i hemijskom sastavu sekreta koji se produkuje od strane sekretornih ćelija i izbacuje u spoljašnju sredinu pod uticajem stresa. Postoje tri načina izbacivanja ovih sekreta: izlučivanje u vidu kapljica, prskanje u vidu spreja i kreptacija. Najjednostavniji mehanizam izlučivanja sekreta, a koji se često sreće unutar porodice Carabidae, je najverovatnije plejotropnog karaktera (Forsyth, 1970; Balestrazzi et al., 1985; Will et al., 2000). Međutim, predstavnici tribusa Brachinini poseduju kompleksniju strukturu ovog sistema, pa samim tim je nešto složeniji i način izlučivanja. U ovom slučaju, mehanizam podrazumeva raspršivanje sekreta u vidu spreja zahvaljujući reakcijama serijskih eksplozija koje se dešavaju unutar ovog sistema usled prisustva specifičnih hemijskih jedinjenja, prevashodno kinona (Arndt et al., 2015). Posledično dolazi do izlučivanja sekreta u pulsacijama. Npr. kod vrste *Pheropsophus (Stenaptinus) insignis* Boheman, 1848 postoji oko 500 pulsacija u sekundi (Dean et al., 1999).

Sa stanovišta morfologije i hemijskog sastava odbrambenih sekreta koje produkuju, pigidijalne žlezde se razlikuju od grupe do grupe u okviru porodice Carabidae (potporodice Anthiinae, Brachininae, Broscinae, Carabinae, Cicindelinae, Dryptinae, Elaphrinae, Harpalinae, Lebiinae, Licininae, Loricarinae, Nebriinae, Paussinae, Platyninae, Pseudomorphinae, Psydrinae, Pterostichinae, Scaritinae, Trechinae i dr) (Pavan 1968; Blum 1981; Kanehisa & Kawazu 1982; Balestrazzi et al. 1985; Eisner et al., 2000, 2001; Will et al., 2000; Attygalle et al., 2009; Bonacci et al., 2011; Lečić et al., 2014). Važno je napomenuti da polni dimorfizam u morfologiji ovih struktura nije zapažen do danas u nekom značajnijem smislu (Forsyth, 1972), ali hemijski sastav sekreta može varirati između polova (Attygalle et al., 1991).

1.1.2.1. Morfo-anatomski i histološki aspekt pigidijalnih žlezda

Generalno posmatrano, pigidijalne žlezde predstavljaju tip egzokrinih žlezda ektodermalnog porekla, a sam zid kanala i rezervoara gradi sloj glatke muskulature, koja je dobro aerisana putem traheja i traheola respiratornog sistema. Pored mišićnog sistema, u sastav ovih žlezda ulaze i vezivno i epitelijalno tkivo, te osim miozina, prisustvo kolagena u ovom tkivu je podjednako dominantno. Sekretorni lobusi se sastoje od gusto pakovanih sekretornih ćelija (**Slika 3**), koje su takođe aerisane putem traheola, čime se potvrđuje visoka vaskularizovanost

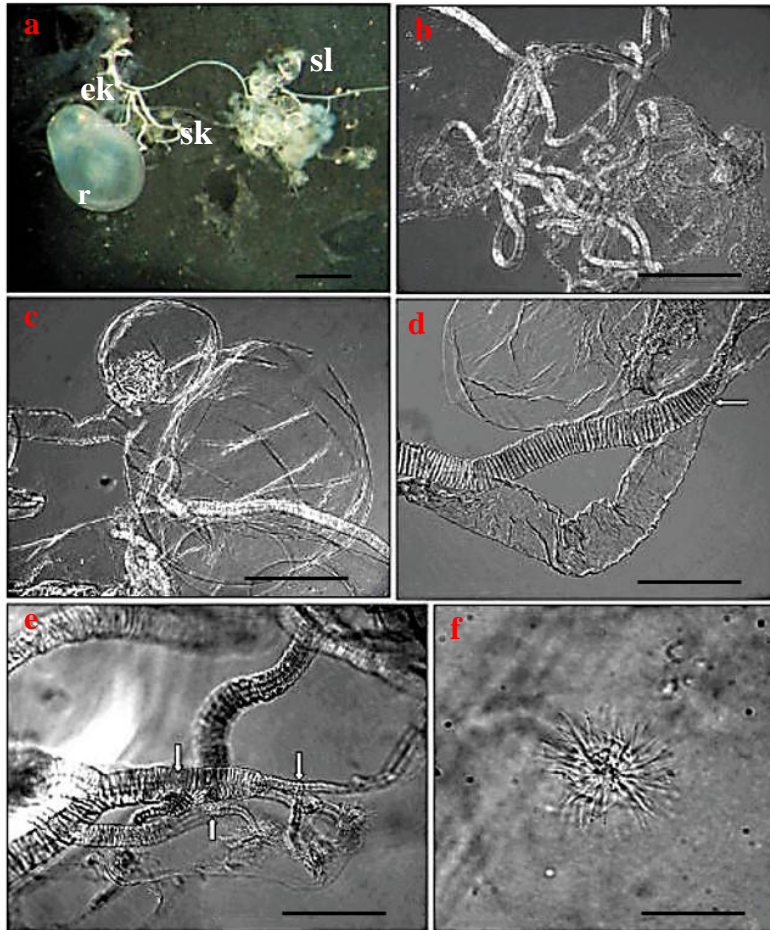
ovog sistema (Dettner, 2014). Sekretorni lobusi najčešće variraju u dijametrima i gustini pakovanja (Giglio et al., 2009).



Slika 3. Struktura pigidijalnog žlezdanog sistema na primeru različitih vrsta Adepaga iz porodice Dytiscidae. (a) *Dytiscus marginalis* Linnaeus, 1758; (b) *Acilius sulcatus* Linnaeus, 1758; (c) *Colymbetes fuscus* (Linnaeus, 1758); (d) *Copelatus (Liopterus) haemorrhoidalis* Fabricius, 1787; (e) *Laccophilus minutus* Linnaeus, 1758; (f) *Nebrioporus depressus* Fabricius, 1775; (g) *Hyphydrus ovatus* Linnaeus, 1761 (posteriorni deo sistema, uvećano); (h) *D. marginalis* (presek sekretornog lobusa). až - akcesorna žlezda; sk - sabirni kanal; za - završetak aparata; sc - sekretorne ćelije; iž - integumentalne žlezde; int - integument; rez - rezervoar; sl - sekretorni lobus; tr - traheja; mt - mikrotubule. Nukleusi su označeni crnom bojom (preuzeto iz Dettner, 2014).

Interesantan je podatak da je sama citoplazma sekretornih ćelija bogata endoplazmatičnim retikulumima, granulama glikogena i dobro razvijenim Goldžijevim kompleksom koji produkuje guste sekretorne granule, ali i mnogobrojnim izduženim mitohondrijama većih dijametara, što upućuje na energetski zahtevan proces koji se održava u ovom sistemu (Giglio et al., 2009).

Celokupni pigidijalni sistem se može detaljno pojasniti na primeru vrste *Anchomenus dorsalis* (Pontoppidan, 1763), kod koje ove žlezde predstavljaju kutikularne invaginacije telesnog zida, čiji se otvor nalazi odmah iza osmog abdominalnog tergita. Svaka žlezda se sastoji od agregacija sekretornih ćelija, sabirnog kanala, rezervoara i eferentnog kanala (**Slika 4a**). Agregacije sekretornih ćelija su radijalno raspoređene oko centralnog lumena sabirnog kanala (Forsyth, 1970), koji održava sekret duž sabirnog kanala. Celokupna struktura sekretornih lobusa i sabirnog kanala ima formu grozda, odnosno, zapaža se njihovo grupisanje u klastere (**Slike 4a i 4b**). U sam reniformni rezervoar (**Slika 4c**) se ulivaju radijalni sabirni kanali, koji dopiru od sekretornih lobusa, preko jednog glavnog sabirnog kanala (Forsyth, 1970) cilindričnog oblika, čija dužina odgovara dvostrukoj dužini samog tela trčuljka, u slučaju *A. dorsalis*. Sam lumen zauzima jednu trećinu dijametra rezervoara. Eisner et al. (2001) su na primeru vrsta roda *Crepidogaster* Boheman, 1848 označili kutikularne tvorevine unutar sekretornog sistema kao mikrotubule i tzv. florete. Mikrotubule su definisane kao intracelularne organele (Rossini et al., 1997) i grupisane su u konvergentne klastere u cilju formiranja sitnog, individualnog floreta koji transportuje sekret iz lumena sekretornog lobusa do nešto većih kanala i finalno do glavnog sabirnog kanala (**Slike 4e i 4f**). Od rezervoara do spoljašnje sredine se sekret sprovodi putem eferentnog kanala (**Slika 4d**), kod koga se primećuje tendencija ka apikalnom grananju (Bonacci et al., 2011).



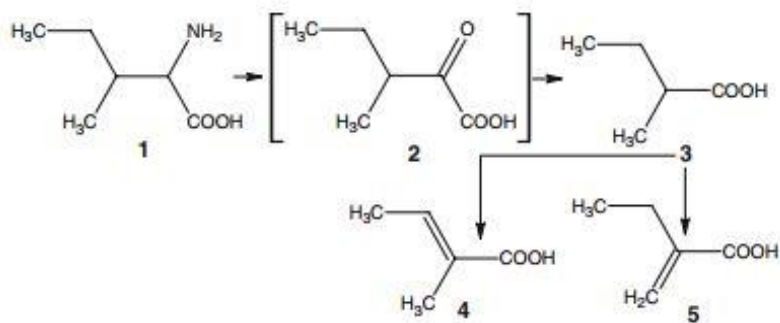
Slika 4. Mikrografije dobijene svetlosnom mikroskopijom. (a) Dorzalni aspekt pigidijalne žlezde: ek - eferentni kanal, r - rezervoar, sk - sabirni kanal, sl - sekretorni lobusi; (b) sabirni kanal; (c) rezervoar; (d) eferentni kanal (bela strelica); (e) sabirni kanal sa apikalnim ramifikacijama (bele strelice); (f) floret (prema Eisner et al., 2001). Skale: 0,5 mm (a), 0,125 mm (b i c), 0,05 mm (d i e), 0,015 mm (f) (preuzeto iz Bonacci et al., 2011).

1.1.2.2. Biosinteza i hemijski sastav organskih jedinjenja sekreta pigidijalnih žlezda; interspecijska varijabilnost u hemijskom sastavu sekreta pigidijalnih žlezda

Evoluciju porodice Carabidae je nepobitno pratio trend povećanja diverziteta grupe i varijabilnosti morfologije i fiziologije egzokrinih abdominalnih žlezda, ali i sastava smeša jedinjenja koje se u njima produkuju. Sama hemijska analiza sekreta egzokrinih pigidijalnih žlezda ukazuje na postojanje smeše organskih molekula malih težina, poput terpena, zatim, aldehida, ketona, estara, alkohola, kao i karboksilnih kiselina. Kombinacija ovih organskih jedinjenja je kako kod adulta, tako i kod larve namenjena isključivo svrsi odbrane od potencijalnih predatora, dok su ostale uloge u središtu razmatranja (Moore, 1979; Blum, 1981; Giglio et al., 2007, 2009).

Komparativna analiza sekreta pigidijalnih žlezda različitih vrsta trčuljaka ukazuje na nekoliko zajedničkih klasa jedinjenja koja se mogu detektovati kod njih: ugljovodonicu, alifatični ketoni, saturisani estri, mravlja kiselina, visoko zasićene kiseline, nezasićene karboksilne kiseline, fenoli (*m*-krezol), aromatični aldehidi (salicilaldehid) i kinoni. Kod većine trčuljaka, najveći procenat u smeši sekreta pigidijalnih žlezda zauzima metakrilna kiselina, dok je prema procentu zastupljenosti tiglinska kiselina na drugom mestu (Blum, 1981; Lečić et al., 2014). Ustanovljeno je da se L-valin nalazi u osnovi strukture metakrilne, ali i izobutirične kiseline kod vrste *Scarites subterraneus* Fabricius, 1775 (Attygalle et al., 1991, citirano u Giglio et al., 2011). Naime, premeštanjem svih atoma vodonika na ugljenik valina obeleženog deuterijumom eksperimentalno dolazi do sinteze izobutirične i metakrilne kiseline (Morgan, 2004).

Međutim, kod vrste *Pterostichus (Hypherpes) californicus* (Dejean, 1828), kao prekursor za biosintezu tiglinske i metakrilne kiseline putem metabolizma 2-metilbutirične kiseline je detektovan izoleucin (Attygalle et al., 2007) (**Slika 5**).



Slika 5. Biosinteza tiglinske i metakrilne kiseline (preuzeto iz Attygalle et al., 2007).

Masne kiseline su često zastupljene u sastavu sekreta među različitim tribusima trčuljaka (Kanehisa & Kawazu 1982), a jedna od kratkolančanih masnih kiselina, butirična kiselina, je nedavno po prvi put identifikovana kod potporodice Carabinae (Lečić et al., 2014).

Sinteza masnih kiselina kod insekata, generalno, odvija se uz pomoć enzimskog kompleksa masno-kiselinske sintetaze, koju čine svi mogući enzimi koji učestvuju u ovom procesu. Tokom svih faza rastući lanac kiselina je spojen za ovaj kompleks, prelazeći sa jedne enzimske jedinice kompleksa do sledeće. Kada lanac dostigne 16. ili 18. C atom, dolazi do razdvajanja od enzimskog kompleksa. Kako bi se manolil grupa dobila od acetata, prirodno se koristi N-karboksibiotin kao nosač CO₂ grupe. Karboksilna grupa se sa biotina premešta na acetil koenzim A, čime se ovaj molekul konvertuje u malonil koenzim A, koji je mnogo reaktivniji molekul. Acetilna grupa se premešta sa koenzima A na acil noseći protein (acyl carrier protein, engl.) (ACP), i dalje na β-ketosintazu. Nakon toga sledi kondenzacija između acetata i malonata, što je praćeno redukcijom keto grupe (C=O ^{NADPH} → CHOH) i dehidratacijom alkohola. Potom nastaje butiril grupa, koja se pomera na β-ketosintazu, i dalje premešta putem drugog molekula malonata na ACP. Zatim se iznova događa kondenzacija i ciklus se nastavlja dalje. Bitno je

napomenuti da su ovi procesi prostorno razdvojeni. Naime, sama sinteza se dešava u citoplazmi, dok se degradacija odvija u mitohondrijama (Morgan, 2004).

Sa druge strane, bube bombarderi (npr. *Brachinus* spp., *Metrius* spp., *Stenaptinus* spp.) su vrlo karakteristična i evolutivno najizvedenija potporodica (Brachininae), ne samo po strukturi abdominalnog žlezdanog kompleksa, već i prema hemijskom sastavu sekreta koji se u tim žlezdama sintetiše. Naime, sekretorni lobusi izlučuju vodonik-peroksid i hidrokinone, koji se čuvaju u znatnoj količini u rezervoarima. Kada se jedinka oseti ugroženom, dolazi do kontrahovanja rezervoara, pomerajući vodonik-peroksid i hidrokinone u reakcionu komoru kroz poseban sistem otvora sa zaliscima. Unutrašnji sloj reakcione komore čine ćelije koje sintetišu enzime poput peroksidaza i katalaza. Kada se vodonik-peroksid i hidrokinoni nađu u kontaktu sa navedenim enzimima dolazi do eksplozivne reakcije, pri čemu se stvaraju voda, kinoni, gasoviti kiseonik i toplota. Pritisak slobodnog gasovitog kiseonika potiskuje smešu iz reakcione komore kroz mlaznicu koja je usmerena ka meti (potencijalnom predatoru) pod preciznim uglom, i to putem specifičnog oboda (tribus Paussini), ili putem linijskih žljebova (tribus Metriini) ili deflektorima za raspršivanje (tribus Brachinini) (Eisner et al., 2001; Giglio et al., 2011).

Karboksilne kiseline koje su prisutne u sastavu sekreta pigidijalnih žlezda mogu se smatrati derivatima pentafluorobenzila. Sintetisanje mravlje kiseline naročito je proučeno kod vrste *Galerita lecontei* Dejean, 1831, kod koje je ova kiselina zastupljena do 3% ukupne telesne mase. Za prekursore ove kiseline se smatraju l-serin i glicin, od kojih se putem N5-formil-tetrahidrofolata vrši sinteza (Giglio et al., 2011).

Interesantno je da se u produktima metabolizma većine insekata danas identifikuju jedinjenja koja su detektovana i kod biljaka, a koja mogu imati potencijalni antimikrobni efekat, kao što su monoterpeni (Veith et al, 1994). Ovde trčuljci nisu izuzetak, pa se tako, na primer, linalool sintetiše kao glavno hemijsko jedinjenje u sastavu sekreta vrste *Carabus lefebvrei* Dejean, 1826, u stadijumu lutke (Giglio et al., 2009).

Kada su u pitanju odabrane vrste trčuljaka koje su ispitane u ovoj studiji, prethodno je već ustanovljen hemijski sastav sekreta njihovih pigidijalnih žlezda primenom metode gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (gas chromatography with mass spectrometry,

engl.) (GC-MS), što je predstavljeno **Tabelom 1**. Kao dominantna jedinjenja u sastavu sekreta većine vrsta su evidentirane metakrilna i tiglinska kiselina, sa izuzetkom vrste *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828), kod koje ova jedinjenja nisu identifikovana. Prevažodno se zapaža visok relativni procentualni udeo metakrilne kiseline kod pet vrsta, i to *Abax (Abax) parallelepipedus* (Piller & Mitterpacher, 1783) (76,5%), *Carabus (Eucarabus) ullrichii* Germar, 1824 (78,7%) (Schildknecht & Weis, 1962; Lečić et al., 2014; Nenadić et al., 2016a), *C. (Tomocarabus) convexus* Fabricius, 1775 (83,8%) i *C. (Procrustes) coriaceus* Linnaeus, 1758 (79,2%) (Vesović et al., 2015) i *Calosoma (Calosoma) sycophanta* (Linnaeus, 1758) (44,8%) (Lečić et al., 2014; Nenadić et al., 2017b). Takođe, prisustvo kratkolančanih masnih kiselina je po prvi put identifikovano kod određenih vrsta. Tako je prisustvo izobutirične kiseline ustanovljeno kod *A. (A.) parallelepipedus*, *C. (E.) ullrichii* i *C. (C.) sycophanta*, dok je butirična kiselina prisutna kod poslednje dve pomenute vrste. Sekret vrste *C. (E.) ullrichii* se po hemijskom sastavu bitno razlikuje od sekreta ostalih šest vrsta, naročito po prisustvu angelinske kiseline (Schildknecht & Weis; 1962; Lečić et al., 2014; Nenadić et al., 2016a). Sekret vrste *L. (P.) punctatus* je specifičnog hemijskog sastava u poređenju sa ostalim vrstama, a naročito je interesantan visok procentualni udeo unidekana (40,4%) i dodecil acetata (34,2%) (Vesović et al., 2015). Prisustvo salicilaldehida u visokom procentualnom udelu (42,7%) kod vrste *C. (C.) sycophanta* posebno izdvaja ovu vrstu od ostalih pomenutih predstavnika porodice Carabidae, međutim, interesantno je napomenuti da postoji sličnost u hemijskom sastavu sekreta *C. (C.) sycophanta* u poređenju sa vrstom *A. (A.) parallelepipedus*, naročito zbog prisustva senecioiske i krotanske kiseline, koje nisu zabeležene kod ostalih predstavnika (Lečić et al., 2014; Nenadić et al., 2017b). Kada je u pitanju vrsta *Carabus (Chaetocarabus) intricatus* Linnaeus, 1760, Schildknecht & Weis (1962) su zabeležili jedino prisustvo metakrilne i tiglinske kiseline u smeši sekreta.

Tabela 1. Hemijski sastav i relativni procentualni udeo jedinjenja u sastavu sekreta pigidijalnih žlezda vrsta *C. ullrichii*, *C. coriaceus*, *A. parallelepipedus*, *L. punctatus*, *C. intricatus*, *C. sycophanta* i *Carabus convexus* Fabricius, 1775, dobijen primenom GC-MS (modifikovano prema Schildknecht & Weis 1962; Schildnecht et al., 1968; Lečić et al., 2014; Vesović et al., 2015; Nenadić et al., 2017b).

Hemijska jedinjenja	Relativni procentualni udeo hemijskih jedinjenja u sekretima (%) ^a						
	<i>C. ullrichii</i>	<i>C. coriaceus</i>	<i>A. parallelepipedus</i>	<i>L. punctatus</i>	<i>C. intricatus</i>	<i>C. sycophanta</i>	<i>C. convexus</i>
Propanska kiselina			T			T	
Izobutirična kiselina	0,3		0,4			0,3	
Butirična kiselina	0,2					1,5	
2-Metil butirična kiselina	0,2					0,1	
Metakrilna kiselina	78,7	79,2	76,5		*	44,8	83,8
Angelinska kiselina	17,7						
Krotonska kiselina			0,1			0,1	
Senecioiska kiselina			0,1			2,1	
Tiglinska kiselina	2,5	20,8	22,9		*	5,6	15,9
Benzoeva kiselina	0,4	T				2,8	0,3
Undekan				40,4			
Sirćetna kiselina				0,6			
Mravlja kiselina				19,4			
Decil acetat				0,2			
Undecil acetat				0,2			

Nastavak Tabele 1.

Dodekan-1		
-ol	1,2	
Kaprnska kiselina	T	
Dodecil acetat		
	34,2	
7-		
Heksildokozan	0,5	
9-Metil tetrakozan	2,6	
Palmitinska kiselina	0,5	
Stearinska kiselina	0,1	
Oleinska kiselina	0,1	
Salicilaldehid		42,7

^a- Dobijeni podaci putem GC-MS na INNOWax kapilarnoj koloni; ^T-identifikovana jedinjenja u tragovima (<0,1%); *- nije ustanovljen relativni procentualni udeo jedinjenja

1.2. Biološka aktivnost izlučevina insekata, sa posebnim osvrtom na dejstvo sekreta pigidijalnih žlezda predstavnika porodice Carabidae

Veliki diverzitet jedinjenja koja ulaze u sastav izlučevina određenih insekata je ustanovljen još 80-ih godina prošlog veka, dok ispitivanje njihove uloge postaje glavna tema današnjice u primenjenoj entomologiji. Primarno je ustanovljeno da je sinteza ovih produkata uslovljena tendencijom odbrane od potencijalnih predatora, prevashodno u stacionarnom stadijumu tokom ontogenetskog razvića, ali su se vremenom naslućivale i druge namene. Prethodno se osobito odnosi na njihovo potencijalno antimikrobno dejstvo, međutim, ova tematika je slabo istražena u okviru podreda Adephaga (Dettner, 1985). Stoga je apsolutno razumljivo što su odbrambeni sekreti trčuljaka, kao značajne porodice u okviru ovog podreda, u fokusu istraživanja poslednjih 50 godina (Will et al., 2000; Bonacci et al., 2011; Di Giulio et al., 2015).

Generalno posmatrano, sekreti insekata se mogu neformalno razvrstati u nekoliko tipova u zavisnosti od mesta sinteze ovih jedinjenja, kao i načina sekrecije, te tako možemo razlikovati oralne, analne i žlezdane sekrete (Hoback et al., 2004). Tako, na primer, kada su tvrdokrilci u pitanju, potporodicu Nicrophorinae iz porodice Silphidae (*Nicrophorus marginatus* Fabricius, 1801) karakteriše izlučivanje oralnih sekreta, koji sadrže u svom sastavu određene enzime. Pokazano je da ove izlučevine poseduju antibakterijski potencijal, odnosno utiču na inhibiranje rasta bakterijskih kolonija iz njihovih staništa (Rana et al., 1997; Hoback et al., 2004).

Kada govorimo o sekretima unutar porodice Carabidae, to se prevashodno odnosi na egzokrine izlučevine. Naime, sekreti ovog tipa predstavljaju produkte egzokrinog sistema žlezda trčuljaka, koji se u osnovi dele na feromone i alomone. Ovakva jedinjenja igraju ulogu u intra- i interspecijskoj komunikaciji. U svetu insekata ovakvi tipovi žlezdanih sistema imaju značajnu funkciju u reproduktivnom ponašanju. Daljim evolucionim procesom, sa tendencijom poboljšanja komunikacije sa okolnim staništem i potencijalnim predatorima, dolazi do značajnih izmena u biohemijskim putevima, te i do same sinteze jedinjenja čija će osnovna uloga biti zaštita od potencijalnih prirodnih neprijatelja, ali i potencijalnih patogenih mikroorganizama, barem kada su u pitanju pigidijalni žlezdani sistemi (Blum, 1996; Giglio et al., 2011; Kotze et al., 2011). Biološka aktivnost ovih produkata je prevashodno uslovljena hemijskim sastavom unutar navedenih smeša sekreta. Naročito su u fokusu razmatranja masnih kiselina kao glavnih agenasa u antimikrobnoj aktivnosti, ali i u antitumorskom potencijalu. Naime, interakcija ovih jedinjenja sa unutrašnjom membranom bakterija može da utiče neposredno na proces oksidativne fosforilacije i umanju znatno produkciju adenzin trifosfata (ATP). Prethodni događaj je prouzrokovan sposobnošću ovih kiselina (kako zasićenih, tako i nezasićenih) da se direktno vežu za ATP sintazu, čime se remeti funkcionalnost ovog enzima. Takođe, funkcija ATP sintaza se može remetiti porastom permeabilnosti membrane za protone, što je posledica aktivnosti uglavnom nezasićenih kratkolančanih masnih kiselina (Debois et al., 2010).

Kao što je već ranije pomenuto, interesantno je da se u sastavu izlučevina insekata mogu naći jedinjenja poput terpena, karakterističnih za biljke, tačnije konstituenti etarskih ulja velikog broja biljaka, čija biološka aktivnost je već utvrđena. Kada su Carabidae u pitanju, monoterpeni, naročito linalool, se mogu identifikovati kod stadijuma lutke vrste *C. lefebvrei*. Osim odbrane od

predatora, sugeriše se i profilaktička funkcija ovih jedinjenja u cilju odbrane od patogena u stacionarnoj fazi ontogenetskog razvića (Giglio et al., 2009). Takođe, slične primere nalazimo i kod drugih vrsta trčuljaka, poput *Chlaenius cordicollis* Kirby, 1837, kod kojih se beleži sekrecija odbrambenih jedinjenja poput hidrokinona i benzokinona, koji se izdvajaju kao značajna jedinjenja u odbrani larvalnog stadijuma (Holliday et al., 2015). Ovakvi fenomeni su zastupljeni i u okviru drugih porodica tvrdokrilaca, te se tako kod larvi predstavnika Chrysomelidae u svrsi odbrane beleži sinteza derivata izoksazolinona, salicina, benzaldehida, konjugovanih acetata, ali i ciklopentanoičnih monoterpena, plagiodijala i hrizomelidijala. Ova jedinjenja produkuje i izlučuje par egzokrinih žlezda na dorzalnoj strani torakalnih i abdominalnih segmenata (Burse et al., 2008).

Pored egzokrinih izlučevina specifičnih bioloških potencijala, koje ostvaruju toksično, antimikrobno, antiinflamatorno, antioksidativno i antikancerogeno dejstvo, insekti poseduju specifične polipeptide u sklopu imunog sistema, a u sastavu hemolimfe, koji kriju u sebi varijabilne potencijale. Poslednjih dvadeset godina se značajan akcenat stavlja na ispitivanje tzv. antimikrobnih polipeptida (AMP) ili peptidnih fragmenata poreklom iz mikroorganizama, biljaka i životinja (vertebrata i invertebrata, naročito insekata), a koji predstavljaju evolutivno visoko konzervirane molekule humoralnog imunog sistema. Najčešće se radi o katjonskim vrstama, ali postoje i anjonske, amfipatične i hidrofilne vrste ovih molekula, koji se sintetišu od strane masnog i epitelijalnog tkiva kod holometabolnih insekata, a potom transportuju do hemolimfe. Ovi molekuli poseduju širok dijapazon aktivnosti kao što je antibakterijsko, antifungalno, antiviralno, antioksidativno antitumorsko i imunomodulatorno dejstvo (Bulet et al., 1999; Bulet & Stöcklin, 2005; Keehnen et al., 2017; Yi et al., 2014; Mylonakis et al., 2016). Identifikovani su kod predstavnika Diptera, Hymenoptera, Odonata, Hemiptera, ali i Coleoptera (**Tabela 2**) (Chernysh et al., 2002; Wang et al., 2009; Yi et al., 2014). Prvi antimikrobni peptid koji je identifikovan kod insekata je bio cekropin, poreklom iz hemolimfe predstavnika reda Lepidoptera, odnosno vrste *Hyalophora cecropia* (Linnaeus, 1758) (Steiner et al., 1981, citirano u Yi et al., 2014; Keehnen et al., 2017). Antibakterijska aktivnost ovih peptida je po prvi put detektovana upravo kod jedinki ove vrste, ali i kod još jednog predstavnika Lepidoptera [*Samia cynthia* (Drury, 1773)], pri čemu su ova jedinjenja prethodno izolovana iz bakterijski

imunizovanih jedinki u stadijumu lutke (Faye et al., 1975, citirano u Yi et al., 2014). Kasnije je ova biološka aktivnost bila potvrđena kod vrste *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830, u adultnom stadijumu (Robertson & Postlethwait, 1986, citirano u Yi et al., 2014). Od 80-ih godina prošlog veka do danas je izolovano preko 150 drugih antimikrobnih proteina iz insekata (Yi et al., 2014).

Tabela 2. Prikaz pojedinih antimikrobnih peptida izolovanih iz hemolimfe insekata različitih redova i osnovni mehanizmi njihove aktivnosti (modifikovano prema Chernysh et al., 2002; Wang et al., 2009; Yi et al., 2014).

Peptid	Vrsta	Porodica	Red	Aktivnost i potencijalna aplikacija	Referenca
Aloferon 1, 2	<i>Calliphora vicina</i> Robineau-Desvoidy, 1830	Calliphoridae	Diptera	Indukcija NK i IFN-imunske modulacije (leukemija)	Chernysh et al. (2002)
Cekropin	<i>Hyalophora cecropia</i> (Linnaeus, 1758)	Saturniidae	Lepidoptera	Membranska disrupcija (leukemija, kancer bešike)	Steiner et al. (1981); Chen et al. (1997)
Melitin	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	Apidae	Hymenoptera	Influks Ca ²⁺ (humani hepatocelularni karcinom)	Wang et al. (2009)
Defenzin A	<i>Phormia terranova</i> Robineau-Desvoidy, 1830	Calliphoridae	Diptera	Antimikrobno dejstvo na G-(+) bakterije	Lambert et al. (1989)
Tenecin-1	<i>Tenebrio molitor</i> Linnaeus, 1758	Tenebrionidae	Coleoptera	Antimikrobno dejstvo na G-(+) bakterije	Moon et al. (1994)
Holotricin-1	<i>Holotrichia diomphalia</i> (Bates, 1888)	Scarabaeidae	Coleoptera	Antimikrobno dejstvo na G-(-) bakterije	Lee et al. (1995)
Koprisin	<i>Copris tripartitus</i> Waterhouse, 1875	Scarabaeidae	Coleoptera	Antimikrobno dejstvo na G-(+) i G-(-) bakterije i mikromicete	Hwang et al. (2009)
Defenzin	<i>Aeshna cyanea</i> (Müller, 1764)	Aeshnidae	Odonata	Antimikrobno dejstvo na G-(+) i G-(-) bakterije	Bulet et al. (1992)
Defenzin, galerimicin	<i>Galleria mellonella</i> (Linnaeus, 1758)	Pyralidae	Lepidoptera	Antifungalno dejstvo	Schuhmann et al. (2003); Lee et al. (2004)

1.2.1. Antimikrobna aktivnost

Sposobnost agenasa da inhibiraju i zaustave u potpunosti rast i razvoj bakterija i mikromiceta se definiše kao antimikrobna aktivnost, koja obuhvata antibakterijsko i antifungalno dejstvo. Mnogi agensi deluju mikrobiostatički, odnosno inhibitorno (inhibicija rasta) ili mikrobicidno (potpuno uništavanje i ubijanje mikroorganizama). Patogenost mikroorganizama, bilo obligatorna ili fakultativna, generalno se može definisati kao njihova sposobnost da kolonizuju organizam domaćina i tu obavljaju svoj životni ciklus, održavajući svoj vijabilitet, što posledično uzrokuje infektivna oboljenja domaćina (Brooks et al., 2007).

Današnjica je sa sobom donela posledicu evolucije mikroorganizama koji su oduvek predstavljali pretnju višećelijskim visokoorganizovanim sistemima, čiji se specifični imunski odgovor oblikovao kao adaptacija na njihovo prisustvo. Sada, kada njihov diverzitet i specijacija dostižu vrhunac, efektivnost mnogih dosadašnjih antimikrobnih agenasa je pod znakom pitanja, kao što je i rečeno na početku uvodnog dela. Kako su bakterije razvile izvestan stepen rezistencije na antibiotike (Wanger et al., 2017), od 1970-ih godina se intenzivno istražuju produkti prirodnog porekla koji bi predstavljali buduće antibakterijske agense (Karuppusamy & Rajasekaran, 2009). Interesantno je da paradigma leži upravo u uverenju da jedna vrsta bakterije izaziva specifično određenu infekciju, međutim, danas su sve učestalije u fokusu polimikrobne infekcije, čije je praćenje omogućeno sekvenciranjem metagenoma i metatranskriptoma mikrobioloških zajednica asociranih sa datim oboljenjem (Ventola, 2015; Gilbert et al., 2016).

U tom smislu, predstavnici redova Bacillales (Bacillaceae, Listeriaceae, Staphylococcaceae), Pseudomonadales (Pseudomonadaceae), Enterobacteriales (Enterobacteriaceae), koji su u fokusu ove studije, poseduju veliki biomedicinski značaj kako predstavljaju uzročnike najrazličitijih kliničkih infekcija i oboljenja. U ove predstavnike se ubrajaju *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivne bakterije), kao i *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativne bakterije).

Tako je *B. cereus* poznat po produkciji snažnog emetičkog toksina i enterotoksina, koji izazivaju klinički i epidemiološki različite forme alimentarne intoksikacije ili emetički sindrom,

kao i toksičnu infekciju, odnosno dijarealni sindrom. Kod poslednjeg navedenog sindroma, uzročnike svakako treba tražiti među citotoksinima kao što su hemolizin BL (Hbl), nehemolitički enterotoksin (Nhe) i citotoksin K (Drobniewski, 1993; Arnesen et al., 2008; Bottone, 2010). Iz sveže hrane i prehrambenih proizvoda, mesa, povrća i morskih plodova se često može izolovati *L. monocytogenes*, koja predstavlja uzročnika oboljenja listerioze, ali može izazvati kliničke simptome poput meningoencefalitisa ili septikemije kod novorođenčadi. Osim navedenog, može se manifestovati i u vidu sindroma febrilnog gastroenteritisa (Vázquez-Boland, 2001). Sa stanovišta patogeneze, *S. aureus* eksprimira različite potencijalne faktore virulencije, kao što su određeni površinski proteini koji promovišu kolonijalizaciju tkiva domaćina (i), faktori koji verovatno inhibiraju fagocitozu (kapsula, imunoglobulin-vezujući protein A) (ii) i toksini koji izazivaju oštećenje tkiva domaćina pospešivanjem dalje inflamacije (leukocidini, hemolizini i epidermolitični toksini koji se odnose na hemolitične, citotoksične, dermonekrotične i letalne aktivnosti) (iii) (Baron, 1996). Sa kliničkog aspekta, ova bakterija izaziva oboljenja koja skupa potpadaju pod isti naziv, odnosno stafilokokoze. Mogu izazvati razne epidemiološke bolesti, kao i tonzilofaringitis, sinuzitis, stafilokokni akutni enteritis, septikemiju i Kawasaki akutno oboljenje u ranom detinjstvu (manifestuje se groznicom, inflamacijom mukozne membrane, polimorfnim osipom kože i cervikalnom limfadenopatijom) (Habib et al., 2015). Pored prethodno pomenutih vrsta Gram-pozitivnih bakterija, u istraživanjima se ističe značaj vrste *Micrococcus flavus* (Actinomycetales: Micrococcaceae), koja nije patogena za čoveka i životinje, ali se učestalo koristi u eksperimentima. Može se izolovati sa ljudske kože, sa mesta lučenja žlezda, iz mleka i mlečnih proizvoda (Breed et al., 1957).

Kada se osvrnemo na Gram-negativne bakterije, *E. coli* se ističe kao univerzalan stanovnik intestinalnog trakta čoveka i toplokrvnih životinja, tj. čini normalnu floru creva, u kojima dominira i učestvuje u sintezi vitamina. Sojevi su ređe patogeni, uglavnom u situacijama smanjene otpornosti organizma čoveka, kada izazivaju infekcije urinarnog trakta kod starijih osoba i dijareju kod dece i odraslih. *E. coli* je poznata i kao indikator zagađenja namirnica (Breed et al., 1957). Jedan od primarnih virulentnih faktora kod ove bakterije jeste toplotno-labilan enterotoksin (LT), koji ima približno sličnu strukturu kao i toksin *Vibrio cholerae* Pacini 1854 (Sixma et al., 1991; Spangler, 1992). Ovakvi toksini izazivaju kaskadu događaja koji vode ka

aktivaciji Cl⁻ kanala intoksikovane ćelije, što uzrokuje pojačano izbacivanje hloridnih jona u intestinalni lumen, kao i opadanje nivoa apsorpcije hlorida i natrijuma. Ukupan rezultat se odnosi na poremećaj osmotskog gradijenta intestinuma, što izaziva gubitak vode u lumenu (Welch, 2006). Još jedan fakultativni intracelularni patogen koji pripada Gram-negativnim bakterijama jeste vrsta *S. typhimurium*. Kod ove vrste se, kao i kod ostalih predstavnika roda Salmonella, infekcije najčešće šire putem kontaminirane hrane (Breed et al., 1957; Fàbrega & Vila, 2013). Još jedna gorenavedena klinički značajna Gram-negativna bakterija jeste *E. cloacae*, koja se nalazi u sastavu mikroflore intestinuma, međutim, samo pod određenim uslovima postaje patogena. Time su mnogi sojevi označeni kao jedni od glavnih uzročnika infekcija respiratornog i urinarnog trakta, prevashodno kod imunokompromitovanih pacijenata (nozokomijalne infekcije) (Barnes et al., 2003; Wisplinghoff et al., 2004). Takođe, problem kod imunokompromitovanih pacijenata učestalo izaziva i opotrunistički patogen *P. aeruginosa*. Ova bakterija izaziva brojna oboljenja kao što su plućne, urinarne i kožne infekcije, bronhopneumoniju, infekcije mekih tkiva i rana. Skup humanih oboljenja čiji je uzročnik ova vrsta je označen pod nazivom pseudomonijaza (Breed et al., 1957).

Pored bakterijskih infekcija, oboljenja koja su uzrokovana mikromicetama danas predstavljaju najveći izazov sa aspekta mogućih humanih oboljenja, kao što su površinske (superficijalne mikoze) i sistemske mikoze (mikoze unutrašnjih organa). Superficijalne infekcije su karakteristično dugotrajne, a uglavnom mogu zahvatiti kožne površine, kao i područje oko keratinoznog tkiva, dok sistemske mikoze nastupaju akutno, ali su po prirodi hronične bolesti celog tela. Uzročnici sistemskih mikoza su najčešće endogeni i egzogeni sojevi gljiva koje nisu tako često zastupljene na evropskom području (Muntañola-Cvetković, 1987). Ne samo da mikromicete izazivaju oboljenja kod zdravih ljudi, već su neretko na meti ljudi sa hroničnim oboljenjima i narušenog imuniteta. Konkretno, kada je kancer u pitanju, efikasnost i dejstvo mnogih unapređenih terapija je odloženo usled pojave baš ovakvih infekcija. Osim kod tumorskih terapija, mikromicete se često javljaju i prilikom oporavka pacijenata na intenzivnoj nezi, nakon transplatacije organa i hematopoetskih stem ćelija, kao i različitih drugih operacija, zatim kod terapija koje se primenjuju kod lečenja od autoimunih oboljenja, ali mogu biti i uzročnici komplikacija u neonatalnoj medicini (Lee & Lee, 2018). Osim patogenih vrsta, mnoge

mikromicete, predstavnici rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* i *Fusarium* su potencijalni producenti sekundarnih metabolita koji imaju toksično dejstvo na ljude, životinje (mikotoksini) i biljke (fitotoksini) (Gravesen, 1979; Vukojević, 2000). U ovoj studiji se izdvajaju predstavnici redova Eurotiales (Trichocomaceae) poput *Aspergillus niger* van Tieghem 1867, *Aspergillus versicolor* (Vuillemin 1903) Tiraboschi 1908, *Aspergillus ochraceus* Wilhelm 1877, *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1863, *Penicillium ochrocloron* Biourge 1923, *Penicillium funiculosum* Thom 1910, *Penicillium verrucosum* Dierckx (1901), ali i predstavnik reda Hypocreales (Hypocreaceae), *Trichoderma viride* Pers. 1794, kako predstavljaju uzročnike značajnih oboljenja u humanoj medicini. Konkretno, vrsta *A. niger* je poznata po proizvodnji mikotoksina, malformina C i naftokinona, koji su izuzetno toksični (Gravesen et al., 1979). Sa aspekta medicine, veoma je značajna vrsta jer često uzrokuje infekcije očiju i različite alergijske reakcije kod ljudi (Diba et al., 2007). Produkcija mikotoksina je karakteristična i za *A. versicolor*. Ova spororastuća filamentozna vrsta mikromiceta je poznata po proizvodnji sekundarnog metabolita sterigmatocistina, koji predstavlja hepatotoksični i visokopotentni kancerogeni mikotoksin (Muntañola-Cvetković, 1987), ali i nidulotoksina i aflatoksina B1, koji se sintetišu u veoma niskim koncentracijama. Kao takvi, mikotoksini mogu delovati i kao imunosupresanti. Sa medicinskog aspekta, kao oportunistički patogen, ova vrsta uzrokuje oboljenja koja su objedinjena pod nazivom aspergiloze. Ovaj patogen je veoma otporan na tretmane antimikoticima, međutim, kao i kod ostalih pripadnika roda *Aspergillus*, zapaža se visok senzitivitet na terbinafin, koji je pokazao fungicidnu aktivnost *in vitro* (Gravesen et al., 1979). U skorije vreme je ustanovljeno preko 20 alergena izolovanih iz *A. versicolor* (Benndorf et al., 2008). Biomedicinski značaj *A. ochraceus* se ogleda u produkciji mikotoksina ohratoksin A, koji izaziva kvarenje hrane i oštećenje jetre kod domaćih životinja i ljudi, kao i ksantomignena, koji oštećuje bubrege i jetru (Gravesen et al., 1979; Muntañola-Cvetković, 1987). Uzročnik invazivnih mikoza kod ljudi i životinja je najčešće vrsta *A. fumigatus* (Kwon-Chung & Sugui, 2013). Ove mikromicete poseduju konidije izrazito sitnih dimenzija kojima se izazivaju alergijske reakcije kože i alergijska astma (Paulussen et al., 2016). Kod osoba kod kojih se beleži izmenjena funkcija pluća zbog cistične fibroze i astme, uz prisustvo ovog patogena može doći do pojave alergijske bronhopulmonalne aspergiloze. Najrizičnija grupa ljudi,

koja podleže potencijalnoj zaraženosti ovom mikromicetom, odnosi se na osobe sa hematološkim malignitetom poput leukemije, zatim na pacijente koji su podvrgnuti dugotrajnoj terapiji kortikosteroidima, osobe sa transplantovanom koštanom srži, osobe sa genetskim imunodeficijencijama, kao i na osobe koje su zaražene virusom humane imunodeficijencije (Dagenis & Keller, 2009). Značajnu vrstu u istraživanjima predstavlja *P. funiculosum*, za koju je karakteristična proizvodnja mikotoksina luteoskatina i ciklohlrorina kao sekundarnih metabolita, koji mogu izazvati oštećenje jetre kod eksperimentalnih životinja (Muntañola-Cvetković, 1987; Walsh et al., 2012). Sa druge strane, postoje predstavnici roda *Penicillium*, kao što je *P. verrucosum*, koji kontaminiraju voće, povrće, žitarice i proizvode bazirane na žitaricama i mogu proizvesti neurotoksične, kancerogene, teratogene i imunotoksične metabolite, među kojima se ubrajaju ohratoksin A i B, kao i penitrem (indol-diterpenoid) (Berntsen et al., 2017) koji je karakterističan za vrstu *P. ochrochloron*. Stoga, prisustvo toksičnih mikromiceta u žitaricama i voću predstavljaju indirektnu potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi (Samson et al., 2004; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Limay-Rios et al., 2017; Perrone & Susca, 2017).

U sekundarne metabolite koje produkuje vrsta *T. viride* se ubrajaju mikotoksini trikotodermin i trikotoksin A (Muntañola-Cvetković, 1987). Sa medicinskog aspekta, reč je o veoma značajnoj mikromiceti, koja izaziva alergiju tipa 1 (Hou et al., 1972; Gravesen et al., 1979), ali i određen broj humanih infekcija (Hatvani et al., 2013).

Uprkos postojanju tolikog broja različitih humanih oboljenja, današnja nedavna otkrića na poljima evolucije gljiva, filogenije, genomike, razvića i patogeneze ukazuju na moguć napredak u terapijama. Kako je rezistentnost mikromiceta na komercijalne antimikotike drastično porasla u današnje vreme, raste interesovanje za prirodnim formulama, koje mogu zameniti njihovu ulogu u terapijama (Soković et al., 2007; Ristivojević et al., 2016; Lee & Lee, 2018).

Osim biomedicinskog aspekta, brojni mikroorganizami nalaze značaj u različitim ekološkim zajednicama i interakciji sa različitim vrstama invertebrata i vertebrata (Douglas, 2011), što će biti opisano kasnije u potpoglavlju **1.4.1**.

1.2.1.1. Mehanizam antibakterijskog dejstva

Sa biohemijskog aspekta postoji nekoliko procesa koji rezultuju u inhibiranju aktivnosti bakterijskih kolonija od strane antibakterijskog agensa, što može dovesti i do konačne smrti prokariotskih ćelija. Taksativno se mogu izdvojiti sledeći najvažniji procesi (Liwa & Jaka, 2015):

1. Inhibicija sinteze proteina i enzimske aktivnosti bakterija
2. Inhibicija sinteze mikrobne DNK
3. Inhibicija mikrobne RNK
4. Disrupcija membrane i transportnog lanca elektrona
5. Ometanje sinteze ćelijskog zida bakterija
6. Ćelijska liza

Za neke od antimikrobnih peptida, pomenutih u prethodnim poglavljima, poznato je da mogu ostvariti svoju aktivnost putem više različitih mehanizama, ali, kada su pitanju različiti ekskreti insekata, ova problematika je nedovoljno ispitana. Naime, AMP proteini mogu imati značajnu funkciju na različitim nivoima, uključujući inhibiciju genske ekspresije proteina. Kao ciljne molekule obično uzimaju ribozomalne proteine, RNK polimerazu, ili se, pak, direktno vezuju za DNK. Takođe, imaju sposobnost inhibicije sinteze ćelijskog zida, pri čemu ciljne molekule predstavljaju odgovarajući enzimi ili lipidni fosfatidiletanolamini (Mylonakis et al., 2016). Naime, prednost ovih proteina leži u ukupnom pozitivnom naelektrisanju, čemu doprinosi prisustvo velikog broja katjonskih aminokiselina u njihovoj strukturi, poput arginina, histidina, i/ili lizina. Preovladavajuće negativno naelektrisanje bakterijskih membrana igra presudnu ulogu u interakciji sa katjonskim AMP proteinima. Sa druge strane, AMP se vezuju za anjonske ostatke spoljašnjeg bakterijskog omotača, koji uključuju lipopolisaharide Gram-negativnih bakterija i lipoteihonske kiseline Gram-pozitivnih sojeva. Za razliku od antibiotika, vezivanje za spoljašnju bakterijsku ćelijsku membranu ovde ne uključuje specifične receptore za AMP, tako da je drastično umanjena mogućnost pojave mutiranja bakterija i razvijanja rezistencije prema AMP proteinima. Ovo vezivanje dovodi do disrupcije i permeabilizacije spoljašnje bakterijske ćelijske

membrane, što dovodi do ćelijske lize i finalno do smrti prokariotske ćelije (Ratcliffe et al., 2014).

Kada je u pitanju mehanizam koji je vezan za inhibiciju sinteze ćelijskog zida, važno je naglasiti da presudnu ulogu ima direktna inhibicija bakterijskih transpeptidaza, koje su odgovorne u formiranju zrelog peptidoglikana u formi rešetke, koji kao takav obezbeđuje osmotsku stabilnost i oblik prokariotske ćeliji. Mnogi antimikrobni agensi deluju kao inhibitori transpeptidaze i tako blokiraju konverziju nezrelih u zrele peptidoglikane. Tako, na primer, u prisustvu leka na bazi penicilina, transpeptidaze formiraju letalni kompleks sa penicilinazom, čija je funkcija blokiranje normalne transpeptidacije. Finalno, slabo unakrsno povezivanje peptidoglikana čini bakterije koje rastu visoko osetljivim na lizu ćelije i ćelijsku smrt (Liwa & Jaka, 2015).

1.2.1.2. Mehanizam antifungalnog dejstva

Nezaobilazno je danas napraviti korelaciju mehanizma antifungalnog dejstva sa bakterijskom rezistentnošću. Naime, u osnovi postoje četiri mehanizma antifungalne aktivnosti (Ghannoum & Rice, 1999), koji se odnose na:

1. Disrupciju ćelijske membrane
2. Inhibiciju sinteze glukana u ćelijskoj membrani
3. Inhibiciju sinteze β -glukana/hitina ćelijskog zida
4. Inhibiranje ćelijske deobe (ciljni protein mikrotubulin)

Kada su u pitanju antifungalni agensi, generalno mogu biti grupisani u tri klase u odnosu na mehanizam dejstva: azoli, koji inhibiraju sintezu ergosterola (i), polieni, koji stupaju u fizičko-hemijske reakcije sa sterolima membrane gljiva (ii) i 5-fluorocitozini, koji inhibiraju sintezu na nivou makromolekula (iii) (Ghannoum & Rice, 1999).

Naime, disrupcija, odnosno disfunkcija ćelijske membrane nalazi neraskidivu korelaciju sa prethodnom inhibicijom sinteze ergosterola, koji je vodeći učesnik u bioregulaciji asimetričnosti, fluidnosti i integriteta ćelijske membrane gljiva. Pomenuti azoli, koji su inhibitori sinteze sterola, za ciljni protein imaju hemeprotein koji katalizuje citohrom P450 zavisnu 14α -

demetilaciju lanosterola. Inhibicija 14 α -demetilaze dovodi do razgradnje ergosterola i akumulacije sterolnih prekursora, uključujući i 14 α -metilovane sterole (lanosterol, 4,14-dimetilzimosterol i 24-metilendihidrolanosterol), a na kraju rezultuje u formiranju ćelijske membrane izmenjene strukture i funkcije (Ghannoum & Rice, 1999).

Određene komponente etarskih ulja velikog broja biljaka poseduju već gotovo jasno determinisan mehanizam antifungalne aktivnosti, za razliku od ekstrakata izolovanih iz životinjskog sveta, prevashodno insekata. Brojna fenolna jedinjenja koja se nalaze u sastavu etarskih ulja, kao i njihovi derivati, poznati su najčešće po mehanizmu antifungalne aktivnosti koji se odnosi na disrupciju membrane, a koji vodi uglavnom apoptotičkoj ćelijskoj smrti. Tako, na primer, terpenoidni fenol, karvakrol, koji se u znatnom procentu nalazi u sklopu smeše ekstrakta origana, utiče na razaranje membrane patogenih mikromiceta, menjajući inluks Ca⁺², što rezultira apoptozom ćelije. Kurkumin, takođe fenolno jedinjenje, dovodi do apoptotičke smrti ćelija mikromiceta, prevashodno kod vrste *Candida albicans* (C.-P. Robin) Berkhout (1923), putem izazivanja porasta reaktivnih kiseoničnih vrsta (Reactive Oxygen Species, engl.) (ROS) i putem pojačane ekspresije CaMCA1 gena, koji kodira za sintezu kaspaza (Dai et al., 2012). Monoterpeni takođe igraju značajnu ulogu kod ovakve biološke aktivnosti. Miron et al. (2014) su ispitivali efekat istih na konzistentnost ćelijskog zida gljiva uz upotrebu osmotskog protektanta sorbitola, koji stabilizuje protoplast ćelije gljiva. Rezultati ove studije, kako je bilo očekivano, su pokazali da su vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) supstanci koje oštećuju ćelijski zid znatno veće u prisustvu protektanata ovog tipa.

Međutim sa druge strane, poznati su delimično mehanizmi antifungalnog dejstva i AMP proteina izolovanih iz pojedinih insekata. Tako jedna klasa cekropina koji su izolovani iz Lepidoptera (cekropin A), a koji imaju stabilnu α -heliksnu strukturu, indukuju kaskadu apoptotskih događaja unutar ćelije. Naime, značajno redukuju NADPH i nivo glutaciona, čime se postiže oksidativni stres formiranjem ROS. U pretpostavci je da se dimeri cekropinskih peptida mogu NH₂ terminusima vezati za ćelijsku membranu. Ovakav mehanizam predstavlja vrlo obećavajuću strategiju odbrane kada govorimo o antifungalnom dejstvu na vrstu *Beauveria bassiana*, koja parazitira na larvama svilene bube (Wu et al., 2018).

Različiti komercijalni antimikotici predstavljaju agense koji se direktno vezuju za proteine na ćelijskoj membrani ireverzibilno, poput poliena. Alteracija permeabilnosti ovih struktura doprinosi takođe metaboličkoj disrupciji i ćelijskoj smrti. Derivati imidazola inhibiraju sintezu ergosterola kao osnovne sterolne komponente membrane gljiva. Osim navedenog, ovi agensi deluju kao inhibitori sinteze triglicerida i fosfolipida. Kod pojedinih mehanizama inhibicije, agensi direktno ometaju sintezu ključnih proteina, poput flucitozina, koji se deaminizuje do 5-fluorouracila, koji se dalje fosforilizuje i direktno inkorporira u RNK (Ansari et al., 2013).

1.2.2. Antitumorski potencijal i citotoksična bioaktivnost; mehanizam antitumorskog dejstva

Istraživanje antitumorskog efekta predstavlja nezaobilazan nastavak istraživanja na polju antimikrobne aktivnosti i citotoksičnog efekta s obzirom da je ispitivanje toksičnosti važno u proceni i potvrđivanju antimikrobnog svojstva nekog prirodnog agensa. Sa druge strane, putevi samih mehanizama antimikrobne i antitumorske aktivnosti određenih agenasa mogu biti međusobno korelisani (Koh et al., 2016).

Antitumorski potencijal odbrambenih sekreta Coleoptera je nedovoljno istražen, međutim, mehanizam aktivnosti pojedinih odbrambenih jedinjenja koja pripadaju klasi terpenoida, kao što je kantaridin, je jasno definisan. Naime, monoterpen kantaridin (anhidrid ekso, ekso-2,3-dimetil-7-oksabiciklo[2.2.1]heptan-2,3-dikarboksilne kiseline), izolovan iz porodice Meloidae Gyllenhal, 1810, poseduje širok spektar primene u medicinskim naukama i potencijalnim terapijama. Poznato je da ovo jedinjenje može indukovati apoptozu i zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazi. Primarni mehanizam obuhvata inhibiciju protein fosfataze 1 (PP1) i protein fosfataze 2A (PP2A), enzima koji su uključeni u gore spomenute ćelijske procese. Slični mehanizmi koji vode u apoptozu su demonstrirani *in vitro* testovima na ćelijama humanog karcinoma kože i digestivnog trakta. Dejstvo ovog monoterpena je zabeleženo kod nekoliko tipova kancera. Kada je u pitanju kolorektalni karcinom, aktivnost kantaridina se ogleda u redukovanju aktivnosti CDK1 kinaze, što dovodi do neuspešnog prelaska iz G2 u M fazu

ćelijskog ciklusa, kao i do indukcije apoptoze putem aktivacije kaspaza 8, 9 i 3. Na primeru karcinoma bešike, zaustavlja aktivnosti matriksne metaloproteinaze-2 (MMP-2) i/ili MMP-9, što kao rezultat ima antimetastatički efekat. U slučaju hepatocelularnog karcinoma, njegov efekat se ostvaruje zahvaljujući mogućnosti inhibicije PP2A (Ratcliffe et al., 2014; Roy et al., 2015).

Osim u slučaju terpenoida, sličan mehanizam dejstva je ustanovljen i kada su u pitanju antimikrobni peptidi Coleoptera. Tako je iz jednog predstavnika porodice Staphylinidae (*Paederus fuscipes* Curtis, 1840) izolovan pedrin, odnosno AMP protein koji u malim količinama blokira sintezu DNK i proteina. Dosadašnja istraživanja su potvrdila da ovo jedinjenje ima antiproliferativni efekat kod određenih tipova kancera, a postoji pretpostavka i da ovo jedinjenje štiti ćelije od oštećenja prouzrokovanih jonizujućim zračenjem (Samani et al., 2014).

Generalno posmatrano, rapidan efekat AMP proteina koji indukuju smrt tumorskih ćelija se ogleda u načinu delovanja koje nije posredovano receptorima. Naime, za razliku od normalnih ćelija, tumorske ćelije se lako prepoznaju po negativnom naelektrisanju prisutnom na površini membrane poreklom od anjonskih molekula poput fosfatidilserina, glikoproteina, glikozaminoglikana, heparan sulfata i *O*-glikozilatnih mucina. Zahvaljujući ovakvom kontrastu, omogućene su elektrostatičke interakcije između katjonskih peptida i anjonskih komponenti membrane tumorskih ćelija (Giuliani et al., 2007).

Takođe, membranolitičke aktivnosti koje podrazumevaju permeabilizaciju i disrupciju mitohondrija, vode do oslobađanja citohroma C iz međumembranskog prostora, indukujući finalno kaskadu apoptotskih događaja (Tonk et al., 2016).

1.2.3. Potencijalna primena produkata insekata u različitim oblastima humane medicine

Od početka razvoja humane medicine pa do danas priroda je predstavljala inspiraciju za pronalaženje mnogobrojnih hemijskih formula i medikamenata. Današnjica je sa sobom donela rezistentnost patogena na komercijalne antibiotike širokog spektra, kao i visoku učestalost

kompleksnih autoimunih oboljenja i kancera. Stoga se može lako zaključiti da se čovečanstvo mora okrenuti detaljnijem istraživanju medikamenata iz prirode. Zahvaljujući velikom diverzitetu jedinjenja i smeša jedinjenja u prirodi, danas su unapređene brojne terapije i otvaraju se mogućnosti ka novim ispitivanjima i primenama na tom planu. Naime, u tradicionalnoj i alternativnoj medicini drevnih naroda koristili su se određeni prirodni produkti i njihovi derivati koji danas nalaze primenu u brojnim terapijama (Ratcliffe et al., 2014).

Sa aspekta produkcije organskih jedinjenja, insekti predstavljaju čitavu biohemijsku laboratoriju. Biološke aktivnosti opisane u prethodnim potpoglavljima nalazile su svoju potvrdu vekovima unazad u praksi. Naime, u toku istorijskog razvoja farmacije i humane medicine, naročito je beležena njihova primena u kineskoj medicini. Izolacija i identifikacija biološki aktivnih molekula i hemijskih smeša su posebno aktuelni poslednjih dvadeset godina. Entomoterapija je vrlo zastupljena u poslednje vreme, naročito u zemljama poput Kine, Južne Koreje, Meksika, Brazila, Indije, itd. Na ovom planu su posebno ispitivani predstavnici redova Coleoptera (Tenebrionidae, Scarabaeidae, Meloidae, Staphylinidae), Hymenoptera (Formicidae, Vespidae, Apidae, Halictidae), Lepidoptera (Bombycidae, Gracillariidae), Diptera (Calliphoridae, Muscidae), Dictyoptera (Blattidae, Corydiidae), Hemiptera (Dactylopiidae) i Orthoptera (Acrididae, Gryllidae) (Seabrooks & Hu, 2017).

Porodica Carabidae je gotovo u potpunosti neispitana kada je reč o primeni njihovih produkata u humanoj medicini, što se ne može reći za druge predstavnike reda Coleoptera. Tako, na primer, jedna vrsta porodice Tenebrionidae (*Blaps rynchopetera* Fairmaire, 1886) je čuvena u kineskoj medicini po upotrebi u lečenju od groznice, reumatizma, kancera i inflamatornih poremećaja zahvaljujući dimernim jedinjenjima, blapsolima i dopaminskim dimerima. Njihovo dejstvo se ogleda u inhibiciji ciklooksigenaznih enzima COKS-1 i COKS-290, koji se konstituišu u humanom tkivu. Ciklooksigenaze su odgovorne za katalizaciju pretvaranja arahidonske kiseline u prostaglandine, važne medijatore bolova, groznice i različitih inflamatornih procesa. COKS-1 predstavlja izoformu koja je odgovorna za održavanje homeostatske koncentracije prostaglandina (Seabrooks & Hu, 2017). Xiao et al. (2017) su nedavno ispitali istu vrstu i pokazali kako hidrokinoni i benzokinoni imaju značajnu ulogu u antiproliferativnom efektu sekreta ove vrste na humane ćelije karcinoma.

AMP peptidi ponajviše nalaze primenu u kliničkom i terapijskom smislu. Dosadašnja ispitivanja njihovog biološkog dejstva širokog spektra upućuju na veliki potencijal za razvoj nove klase antibiotika, kao i antitumorskih agenasa usled zabeleženog značajnog efekta na patogene mikroorganizme, ali i ćelije karcinoma. Druga važna činjenica se odnosi na njihovo vezivanje za ciljne molekule koje se označava kao nespecifično, te je veoma ograničena sposobnost povećanja rezistencije kod bakterija na ove agense. Bitno je napomenuti i da je vremenski period dejstva ovih peptida kraći u odnosu na konvencionalne antibiotike, što ih čini efikasnijim u aktivnosti. Zapažen je i efekat na bakterije otporne na antibiotike, a njihova antimikrobna aktivnost se ostvaruje i u niskim mikromolarnim koncentracijama. Pored navedenog, mogu dejstvovati i kao imunomodulatori (Ratcliffe et al., 2014).

Tako, potencijalna primena cekropina pruža obećavajuću prognozu kada govorimo o antikancerogenom efektu s obzirom da je ovaj protein selektivno citotoksičan za tumorske ćelije, čime se inhibira njihova proliferacija kod kancera bešike. Mnogobrojni defenzini pokazuju hemotaktičku aktivnost, pri čemu se monociti, dendritske ćelije i T ćelije regrutuju na mestu infekcije. Pojedini humani β -defenzini i katelicidin LL-37 imaju značajnu potencijalnu funkciju kod alergijskih reakcija (Ntwasa et al., 2011; Wu et al., 2018).

Sumirajući dosadašnja saznanja, antimikrobni peptidi nalaze poseban značaj u kliničkoj medicini, kako u terapiji bakterijskih i fungalnih infekcija, virusa i parazita, tako i u procesu imunomodulacije i tumorogenezi. Danas se mnogobrojni potencijalni peptidni lekovi, poput polimiksina B i gramicidina, koriste u tretmanima infekcija prouzrokovanim Gram-negativnim bakterijama, dok su pojedini peptidi, kao npr. derivat indolistina CLOS001, dostigli treću fazu u kliničkom ispitivanju, što je vrlo obećavajuće sa aspekta biomedicine (Ntwasa et al., 2011).

Klinički značaj pojedinih odbrambenih jedinjenja kao što je već pomenuti kantaridin, se ogleda u inhibitornom dejstvu na ćelije humanog karcinoma pluća putem povećanja ROS i povećanjem koncentracije Ca^{+2} , što vodi do destrukcije mitohondrijske membrane ili inhibicije fosfatidilinozitol 3-kinaznog/Akt signalnog puta. Ovo dovodi do selektivnog slabljenja funkcije matriksne metaloproteinaze (MMP)-2, koja može degradirati komponente ekstracelularnog matriksa i sprečiti migraciju i invaziju ćelija karcinoma pluća kod ljudi. Takođe, nedavno je

otkriveno da kantaridin suprimira sve markere angiogeneze koji su neophodni faktori za visoku proliferaciju i rast tumorskih ćelija (Cherniack, 2010).

Svakako, jedinjenja izolovana iz insekata pored pozitivnih efekata mogu imati i određen stepen citotoksičnosti, što je zabeleženo upravo u slučaju kantaridina, i to prevashodno na ćelije bubrega, gastrointestinalni trakt i reproduktivni sistem. Tako, sintetisanje hemijskih analoga u zamenu za agense izolovane iz prirode može predstavljati krucijalno rešenje u biomedicinskim istraživanjima. Konkretno, u slučaju primene kantaridina je predložena zamena analogom norkantaridinom, kao i njegovim derivatima, koji su sličnog nivoa aktivnosti, ali manjeg citotoksičnog rizika (Seabrooks & Hu, 2017).

1.3. Ekološki principi i varijabilnost unutar porodice Carabidae

Porodica Carabidae obuhvata uglavnom predatorske vrste, koje su deklarirane kao generalisti, sa najvećim diverzitetom u tropskim biotopima, gde su vrlo zavisni od vlažnih uslova. Time se može zaključiti da po brojnosti predstavljaju dominantnu grupu u tim klimatskim zonama. U okviru ove porodice prepoznamo, kako vrste otvorenih travnatih staništa, šumskih staništa i agroekosistema, tako i troglobne vrste i troglobionte. Dakle, kada se posmatraju fiziološke i bihevioralne adaptacije, uviđa se da je distribucija trčuljaka jedino ograničena kada su u pitanju pustinjnski ekosistemi, i to na oaze (Lövei & Sunderland, 1996).

Distribucija u okviru staništa i mikrostaništa trčuljaka može biti uslovljena sledećim faktorima (Lövei & Sunderland, 1996; Kotze et al., 2011):

1. Temperatura ili ekstremna vlažnost su važni ekološki faktori, u odnosu na koje se primećuje da pripadnici ove grupe insekata favorizuju dobro aerisana zimska prebivališta, gde se beleži relativno visoka minimalna temperatura u toku zimskog perioda.

2. Uslovi ishrane takođe igraju važnu ulogu u distribuciji, što se ogleda naročito na primeru vrsta *Poecilus cupreus* (Linnaeus, 1758) i *Pterostichus melanarius* (Illiger, 1798), koje migriraju iz agroekosistema sa pšenicom u toku zime prema površinama na kojima rastu korovi,

gde su uslovi ishrane u zimskom periodu bolji. Ovakve migracije su mnogo frekventnije od migracija u suprotnom smeru.

3. Prisustvo i distribucija kompetitora utiču na kretanje pojedinih vrsta. Tako, na primer, neke šumske vrste trčuljaka su pod uticajem distribucije vrsta iz porodice Formicidae.

4. Distribucija može biti određena i životnom istorijom i sezonskim faktorima. Naime, trčuljci preleću određene distance u proleće i u jesen kako bi promenili stanište. Muskulatura koja pokreće krila je privremeno autolizirana u periodu u kome ne dolazi do ovih migratornih aktivnosti, a potom biva kompletno rekonstruisana kada nastupi period letenja. U jesen migriraju ka granicama šumskih ekosistema, što je uočljivo kod vrste *Amara plebeja* (Gyllenhal, 1810), kod koje je proces hibernacije striktno vezan za šumske ekosisteme, dok se proces reprodukcije odvija u otvorenim staništima travnatih ekosistema.

Dakle, ovako česta promena staništa, veliki disperzioni potencijal, kao i učestala fluktuacija spoljnih faktora doprinose da se trčuljci odlikuju visokom intraspecijskom varijabilnošću koja je zastupljena unutar samih populacija. Jedinstven primer za to jeste varijabilnost u oblasti Grčke, što je posledica klime, razuđenosti tla i raznolikih tipova staništa, te je ustanovljeno preko 1000 vrsta i 138 rodova na ovom području. Grčka je zasigurno jedna od vrućih tačaka diverziteta faune ove grupe u Evropi i svetu, međutim, izražena specijska raznovrsnost se beleži generalno na evropskom kontinentu, što se prevashodno odnosi na genus *Carabus* Linnaeus, 1758, unutar koga je ustanovljeno oko 56,3% endemičnih vrsta na Iberijskom poluostrvu, kao i 30,4% endemita u zapadnoj i centralnoj Evropi. U istočnoj Evropi dominantna je zonalna distribuiranost, gde se najveće bogatstvo vrsta može zapaziti u mešovitim i šumsko-stepskim zonama (Kotze et al., 2011).

Generalno, kada govorimo o velikoj disperzionoj moći, posebno moramo izdvojiti vrstu *Pterostichus niger* (Schaller, 1783), koja predstavlja tipičan primer obrasca populacione fluktuacije, za razliku od vrsta sa limitiranom disperzionom sposobnošću, poput *Poecilus lepidus* (Leske, 1785) (Osawa et al., 2002).

Već je ranije u uvodu pomenuto da ovi insekti pokazuju izuzetne reakcije na izlaganje bilo kom tipu stresora, što bi značilo da se mogu označiti kao potencijalno vrlo korisni indikatori sredinskih uslova. Prethodna istraživanja su pokazala da se trčuljci mogu ponašati kao indikatori biodiverziteta jer dolazi do promena u njihovom broju i sastavu prilikom reakcije drugih invertebrata na promene u staništu. Npr., odgovor trčuljaka na izmenjene uslove sredine unutar staništa paralelno prati odgovore paukova, iako je osnovni faktor promene umnogome različit (Niemelä et al., 1996; Rainio & Niemelä, 2003).

Trčuljci spadaju većinski u nokturalne insekte. Pustinjske vrste dostižu maksimalnu aktivnost za vreme minimalnih temperatura, dok su troglobilne vrste vrlo aktivne u kratkim naletima pauza između neaktivnih delova dana. Različite individue u okviru iste vrste mogu imati različite cirkadijalne ritmove. Na primer, u okviru vrste *Carabus auratus* Linnaeus, 1761 srećemo kako nokturalne, tako i dnevno aktivne jedinke (Lövei & Sunderland, 1996).

Sezonska ritmika, kada je reč o ovoj porodici, uključuje dormantne periode tokom zime (hibernacija), ali i toku letnjeg doba (estivacija). Aktivnosti kod tipičnih predstavnika dostižu maksimum u proleće i u jesen, i obično se podudaraju sa reproduktivnim periodom (Lövei & Sunderland, 1996). Pojedine vrste preživljavaju zimski period unutar travnatih areala, koji se graniče sa poljima žitarica, da bi u proleće migrirale u ovakve agroekosisteme (French & Elliot, 1999). U okviru agroekosistema mogu naći značajnu ulogu u biološkoj regulaciji štetočina, poput biljnih vaši, čija brojnost doseže do nivoa koji mogu prouzrokovati značajan ekonomski problem (Potts & Vickerman, 1974; Ekbom et al. 1992; French & Elliot, 1999).

Generalno posmatrano, distribicioni okvir trčuljaka se menja intenzivno pod uticajem globalnih klimatskih promena i faktora urbanizacije, što se posebno beleži i izučava od 1860-ih godina (Kotze et al., 2011).

1.3.1. Ekološki odnosi trčuljaka i mikroorganizama pećinskih staništa

Troglobilne i troglobiontne vrste insekata se u svakom trenutku susreću sa specifičnim uslovima mikrostaništa unutar pećina koje odlikuje kompleksan sastav, barem kada govorimo o

mikrobiološkom aspektu. Vlažna mikroklima, relativno stabilna temperatura, zanemarujuće amplitude i osvetljenost, koja se menja sa dužinom i dubinom pećine, do potpunog mraka u najzabačenijim prostorijama, stvorili su specifične uslove u kojima se održava visok diverzitet bakterija i mikromiceta (De Leon et al., 2018).

Guano, kao finalni metabolički produkt slepih miševa, predstavlja specifično mikrostanište koje se odlikuje visokim diverzitetom mikroorganizama koji se mogu naći u intestinumu ovih životinja, uključujući bakterije, mikromicete, ali i viruse. Asociiran je sa podlogom neorganskog porekla u pećinama i većina vrsta pećinskih insekata je u neprestalnom kontaktu sa ovim medijumom. Kada su bakterije u pitanju, u guanu se susrećemo sa predstavnicima porodica Enterococcaceae, Bacillaceae, Enterobacteriaceae (pretežno *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia* spp. i *Yersinia* spp.) (De Leon et al., 2018).

Značaj guana se ogleda u njegovoj primeni u poljoprivredi, jer ima značajnu ulogu u fertilizaciji zemljišta, naročito kada je u pitanju obogaćivanje istog azotom, ugljenikom, kalijumom, i fosforom. Takođe, predstavlja glavni energetski izvor organizmima koji obitavaju u pećinama (Zapata & Hera, 1995; White & Culver, 2012).

Kada govorimo o odnosu mikroorganizama i insekata, generalno posmatrano, najčešće se susrećemo sa nekim vidom simbioze među pomenutim organizmima. Tako je najveći broj predstavnika filuma Proteobacteria i Firmicutes identifikovan uglavnom u intestinumu insekata. Interesantno je da 10-20% vrsta insekata sadrži intracelularne mikroorganizme u posebnim ćelijama, koje su označene kao bakteriocite, a čija je uloga održavanje ovih mikroorganizama vijabilnim unutar domaćina. Najčešće se ovakve interakcije javljaju kod predstavnika redova Coleoptera, Hemiptera i Hymenoptera (uglavnom porodica Formicidae) (Douglas, 2011).

Ključnu ulogu u ovakvim interakcijama definitivno igra signalni put imunodeficijencije (IMD) kod insekata, koji obezbeđuje perzistenciju na prisustvo simbiotskog mikroorganizma. IMD put se pokreće vezivanjem bakterijskog peptidoglikana (PGN) za peptidoglikan-prepoznavajući protein (PGRP-LC), što rezultuje u aktivaciji NF- κ B faktora transkripcije, čime se reguliše ekspresija gena koji kodiraju za AMP peptide. Ovakav primer je pojašnjen kada je u pitanju vrsta *D. melanogaster*. U slučaju IMD puta kod bakteriocita koje sadrže intracelularne

mikrobe, mehanizam se zasniva na visokoj ekspresiji IMD-responzivnih gena poput PGRP-LB (PGN-amidaza, koja dezintegriše PGN ligand), čime se postiže supresija imunološkog odgovora domaćina (Douglas, 2011).

Predstavnici porodice Carabidae, poput vrsta *Harpalus pensylvanicus* (DeGeer, 1774) i *Anisodactylus sanctaecrucis* (Fabricius, 1798), u sastavu mikroflore digestivnog trakta sadrže neke predstavnike bakterija sa kojima ostvaruju prethodno pomenuti vid simbioze, od kojih pojedini sojevi nisu identifikovani kod drugih insekata (*Serratia* spp., *Paraburkholderia fungorum*, *Phenylbacterium* spp., *Caedibacter* spp., *Spiroplasma* spp., *Enterobacter* spp., *Weissella viridescens*) (Lundgren et al., 2007).

Danas postoji mali broj studija o direktnoj interakciji troglofilnih insekata, konkretno Coleoptera, i zajednica mikroorganizama koje ih okružuju (Paoletti et al., 2013). Svakako, mikroorganizmi koji specifično kolonizuju digestivni trakt insekata predstavljaju važne aktere u fiziološkom procesu ovih organizama, kao što je to slučaj sa vrstom *Cansiliella servadeii* Paoletti, 1980 (Leiodidae: Leptodirini). Naime, ova endemična troglofilna vrsta, koja nastanjuje krečnjačke pećine severoistočnog dela Italije, preferira delove unutar pećine koji su kolonizovani pretežno Gram-pozitivnim bakterijama. Međutim, Paoletti et al. (2013) nisu zabeležili podudarnost sastava zajednica mikroorganizama unutar intestinuma ovog insekta i zajednica mikroba koje kolonizuju stanište ove vrste insekata.

Svakako, mikroorganizmi, uzimajući u obzir i bakterije i mikromicete, koji se razvijaju na detritusu unetom iz spoljašnje sredine u pećinsko stanište, obezbeđuju nutrijente vrstama životinja koje ga nastanjuju, te je otuda njihov značaj za insekte neprocenjiv (Hubbard, 1898).

1.4. Metodološki pristup u opservaciji morfologije pigidijalnog žlezdanog sistema; uloga i primena skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i nelinearne mikroskopije (NLM) u karabidologiji

Generalno posmatrano, morfo-anatomski aspekt insekata i njihovih struktura su do danas ispitani značajno u pogledu primene konvencionalne svetlosne mikroskopije. Međutim, za detaljnija istraživanja potrebno je koristiti drugačije vidove mikroskopiranja. Tako je uloga SEM u ispitivanju insekata veoma značajna i u današnje vreme ova tehnika je veoma učestala u opservaciji njihove spoljašnje morfologije. Kada govorimo o egzokrinom pigidijalnom sistemu, ova tehnika je doprinela boljoj karakterizaciji i podesnijem istraživanju ultrastrukture, konkretno na primeru potporodice Brachininae (Giglio et al., 2015). Tako su Iyyappan et al. (2016) primenom SEM ispitali detaljnije odbrambeni žlezdani sistem kod *Pheropsophus hilaris* (Fabricius, 1798), što je omogućilo preciznije izučavanje mehanizma izlučivanja sekreta iz ovih struktura u spoljašnju sredinu. Osim u morfologiji i fiziologiji, upotreba SEM može doprineti i istraživanjima na polju evolucije i filogenije tvrdokrilaca, generalno. Schierling & Dettner (2013) su ovom tehnikom ustanovili postojanje značajne redukcije jednog seta u okviru parnih struktura pigidijalnih žlezda kod Steninnae (Coleoptera: Staphylinidae). Naime, za ovu potporodicu je karakteristično postojanje dva seta pigidijalnih struktura, pri čemu je rezervoar seta koji je povezan sa sekretornim lobusima gde se sintetišu terpenoidi manji u odnosu na rezervoar koji je konektovan sa sekretornim delom u kome se sintetišu alkaloidi. Redukcija seta u kome se sintetišu terpenoidi se može u pretpostavci povezati sa smanjenjem količine terpena u sastavu izlučevine, kako sugerišu autori, što može biti značajno u filogenetskim studijama kada je u pitanju ova taksonomska grupa.

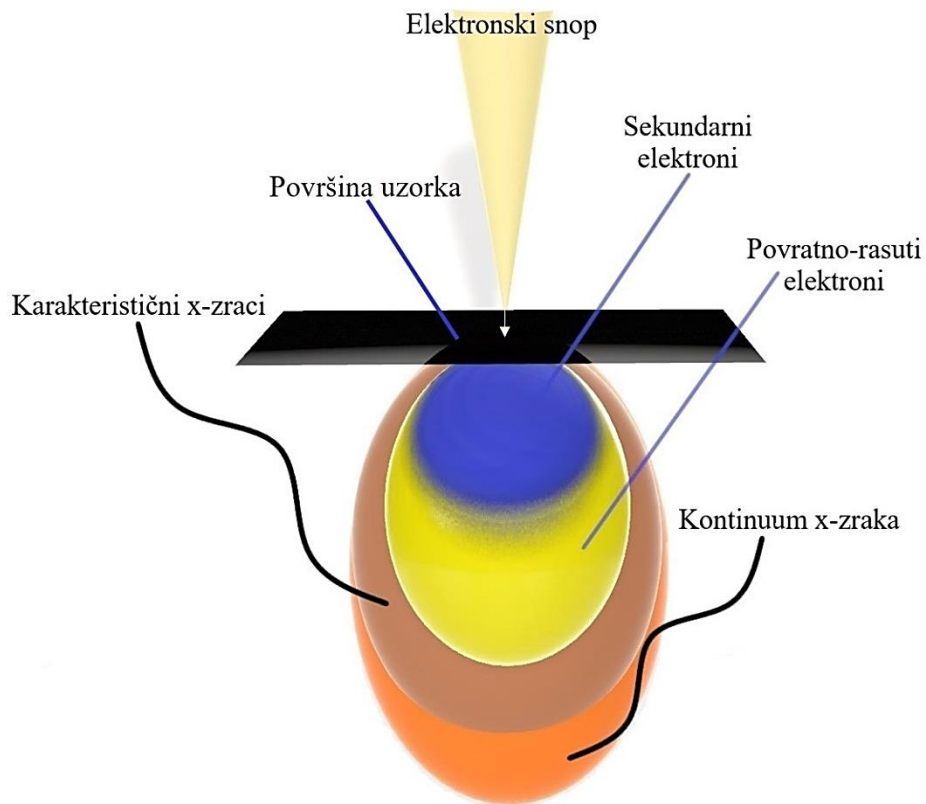
Ne tako često se možemo sresti i sa radovima koji upućuju na prednosti upotrebe konfokalne fluorescentne mikroskopije u oblasti entomologije (Zill et al., 2000; Klaus et al., 2003; Lee et al., 2009; Grzywacz et al., 2014). Kada govorimo o pigidijalnim žlezdama trčuljaka, Rork et al. (2019) su ovu tehniku upotrebili u detaljnijoj morfološkoj karakterizaciji sekretornih lobusa na primeru jedne vrste *Harpalus pensylvanicus* (Degeer, 1774). Zahvaljujući ovoj tehnici ustanovljeno je da sekretorni lobusi sadrže egzokrine ćelije tipa III, kao i da su zapravo ove

strukture bogate rezilinom. Autori su prepostavili da bi visoki sadržaj rezilina u sabirnim kanalčićima mogao biti ključna evoluciona adaptacija u cilju sprečavanja oštećenja uzrokovanih fizičkim ili hemijskim stresom koji mogu nastati u egzokrinim žlezdama insekata.

Za razliku od prethodno pomenutih tipova mikroskopije, samo nekolicina radova svedoči o primeni dvofotonske fluorescentne mikroskopije u karabidologiji, čija je prednost u jednostavnijoj pripremi uzoraka koja ne zahteva obradu, sečenje tkiva i bojenje struktura insekata za razliku od konfokalne i tradicionalne svetlosne mikroskopije (Rabasović et al., 2015). Primena dvofotonski ekscitovane fluorescentne nelinearne mikroskopije je omogućena prevashodno zbog prisustva hitina u kutikuli insekata, koji predstavlja glavnu komponentu kutikule, sa dodatkom proteina (kao što su rezilin, sklerotin i artropodin), zatim voskova, lipida, minerala i različitih pigmenata (npr. melanini i flavonoidi). Konkretnije, primena laserske mikroskopije na hitinskim strukturama je moguća zahvaljujući autofluorescentnom svojstvu hitina (Koch et al., 2000; Rabasović et al., 2015). Danas se možemo susresti sa publikacijama koje se tiču ispitivanja hitinskih struktura pojedinih taksona pećinskih trčuljaka (npr. *Pheggomisetes globiceps ninae* S. Ćurčić, Schönmann, Brajković, B. Ćurčić & Tomić, 2004) (Rabasović et al., 2015; Vrbica et al., 2018). Rabasović et al. (2015) su primenom nelinearne mikroskopije postigli detaljniji uvid u delove struktura kao što je kopulatorni organ mužjaka (aedeagus) vrste *P. ninae*, koji predstavlja važan taksonomski karakter. U poređenju sa rezultatima koji se postižu tradicionalno korišćenom svetlosnom mikroskopijom, kao i konfokalnom mikroskopijom, u ovoj studiji su opaženi određeni morfološki detalji na pomenutoj strukturi, poput finih reljefa na površini strukture, zatim, kompleksna zubolika struktura kopulatornog dela, unutrašnja vreća i snažno sklerotizovana područja kopulatornog organa. Dakle, zahvaljujući nelinearnoj mikroskopiji, opisi morfoloških struktura insekata, koje su taksonomski značajne, bi se na ovaj način obavljali brže i preciznije, što daje veliku prednost primeni ovog vida mikroskopije u taksonomiji trčuljaka (Rabasović et al., 2015). Takođe, ne samo u taksonomiji, već velika prednost ove tehnike se beleži i kada su u pitanju fiziološke studije kod pojedinih insekata (Paoli & Haase, 2018). Do danas nije evidentirana upotreba elektronske i nelinearne mikroskopije kada je u pitanju proučavanje pigidijalnog žlezdanog kompleksa vrsta trčuljaka koje su ispitivane u ovoj studiji.

1.4.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija: opšti biofizički principi i instrumentacija

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je tehnika pri kojoj signal nastaje kao rezultat interakcije **elektronskog snopa** sa atomima uzorka, preko čije površine se elektronski snop skenira u rasterskom obliku. Tako dobijen signal se se digitalizuje i prezentira kao slika (Egerton, 2005). Dakle, čitav princip ove mikroskopije leži u interakciji elektrona sa površinom uzorka, što je predstavljeno na **Slici 6**.



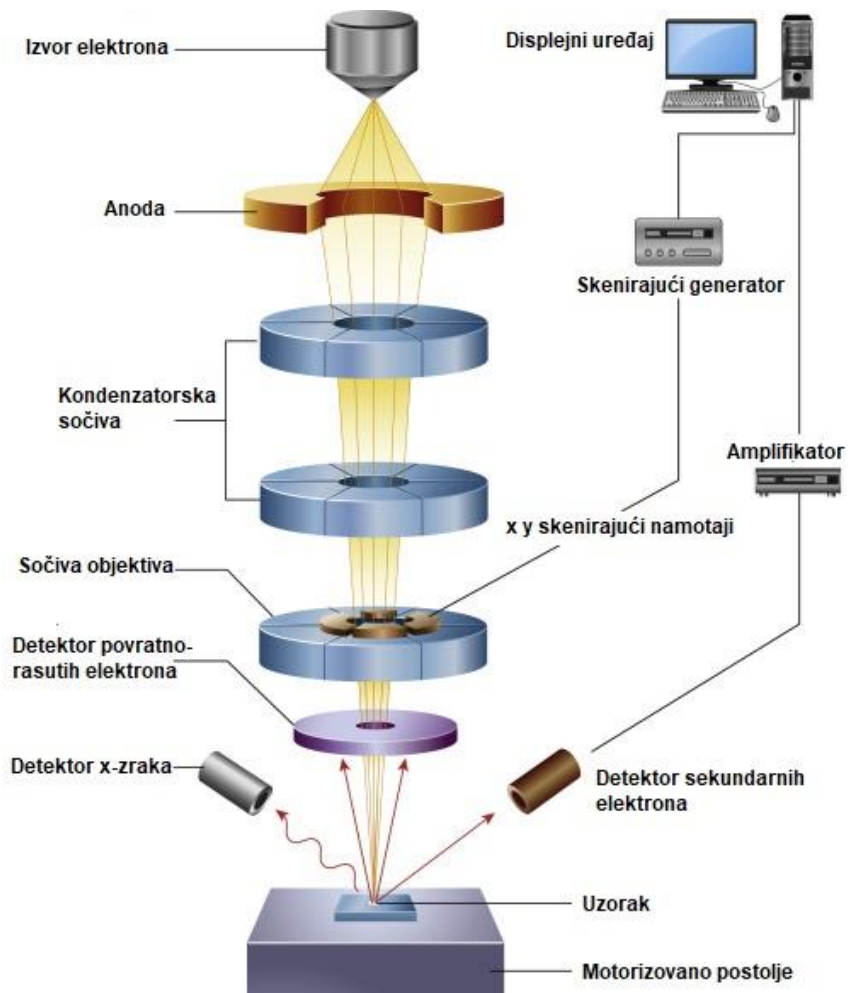
Slika 6. Ilustracija interakcije elektronskog snopa i uzorka u primeni SEM (ilustrovano prema Zhou et al., 2006).

Naime, **elektronski snop** se emituje iz **izvora elektrona**, koji čini zagrejan emiter (npr. volframska žica). Naime, zagrevanjem katode dolazi do emisije elektrona koji dobijaju visoku

kinetičku energiju, te se ubrzavaju prema **anodi**. Ubrzani elektroni prolaze kroz elektronsku kolonu koju čini sistem elektronskih optičkih elemenata (jedno ili više elektromagnetnih sočiva), čija je uloga usmeravanje i fokusiranje elektronskog snopa. Ultravisoki vakuum u koloni je neophodan kako bi se izbeglo rasipanje i apsorpcija elektronskog snopa. Takođe, na ovaj način se izbegava i kontaminacija elektronskih topova i drugih komponenti mikroskopa česticama iz spoljašnje sredine. SEM sadrži **kondenzatorska sočiva i sočiva objektivna**, čija je funkcija kontrola dijametra elektronskog mlaza, kao i fokusiranje elektronskog mlaza na uzorak (**Slika 7**) (Egerton, 2005; Huang, 2013). U trenutku kada snop elektrona intereaguje sa uzorkom, dolazi do odbijanja i rasipanja elektrona zbog elastičnih i neelastičnih sudara. Kada napuste uzorak i uđu iznova u okolni vakuum, ovi elektroni se registruju kao **povratno-rasuti elektroni** (backscattered electrons, engl.) (BSE), koji nastaju kao posledica elastičnih sudara, ili kao **sekundarni elektroni**, koji su posledica neelastičnog rasejanja. Kao usputna pojava se mogu javiti i karakteristični **rendgenski zraci** (x-zraci) koji nastaju prilikom udara elektrona o površinu uzorka. Postoje detektori kojima se ovi zraci registruju, što se može koristiti u kvantitativnim analizama hemijskog sastava uzorka (Egerton, 2005).

Jednu od komponenti skenirajućeg elektronskog mikroskopa čine i **skenirajuće x, y zavojnice (namotaji)**, koje rasterski pomeraju elektronski snop sa velikom preciznošću. Kreirana slika se nalazi u okviru definisanog rastera, gde svaki piksel odgovara pojedinačnoj tački na uzorku, na definisanom uvećanju (Zhou et al., 2006). Sam proces skeniranja i pomeranje elektronskog mlaza po površini uzorka su sinhronizovani zahvaljujući **skenirajućim generatorima** (Inkson, 2016) (**Slika 7**).

Čitav sistem je istovremeno povezan sa **detektorima** kojima se postiže registrovanje signala sekundarnih ili BSE elektrona. Ovako stvoreni signal se pojačava putem **signalnog pojačivača** (**Slika 7**), zatim se digitalizuje i prikazuje na ekranu, tako da svakoj tački na ekranu odgovara tačka na uzorku (Nixon, 1971; Egerton, 2005).



Slika 7. Shematski prikaz principa i instrumentacije SEM (preuzeto iz Inkson, 2016).

SEM je neophodna prilikom posmatranja objekata čija je veličina manja od talasne dužine vidljivog dela spektra svetlosti. Prednost ove mikroskopije jeste upravo u dobijanju slika uzorka maksimalne rezolucije, od 1 do 5 nm. Time se dobijaju detaljne topografske i morfološke informacije, kao i informacije o sastavu, što ovu tehniku čini neprocenjivom u različitim naučnim primenama, pa tako i u entomologiji (Egerton, 2005; Jung et al., 2016).

Kada su u pitanju biološki uzorci, priprema tkiva za snimanje na SEM predstavlja veoma važan korak, što podrazumeva isušivanje uzorka koji će biti presvučeni nekim plemenitim

metalom (zlato, srebro, zlato/paladijum ili platina). Bitno je napomenuti da je presvlačenje metalom neophodno pošto su bioorganski materijali izgrađeni od elemenata malog atomskog broja (C, H, N) i samim tim neprovodni. Presvlačenjem se postiže zatvaranje strujnog kola i izbegava se akumulacija elektrona na uzorku. Time se dobija dovoljno jak signal i uzorak postaje vidljiv kada dođe do interakcije njegove površine sa elektronskim snopom (Zhou et al., 2006).

Dehidratacija je veoma važan korak kako ne bi došlo do narušavanja sistema vakuuma u mikroskopu. Direktno sušenje na vazduhu može dovesti do značajne distorzije oblika uzorka zbog nepovoljnih efekata sila površinskog napona (Bray, 2008). Voda ima izuzetno visok površinski napon koji bi doveo do narušavanja morfologije čak i najstabilnijih uzoraka. Alternativa ovom metodu jeste sušenje zamrzavanjem, čime se voda iz uzorka uklanja procesom sublimacije, što se pokazalo kao uspešno za neke uzorke, prevashodno one malih površina koji se mogu za kratak vremenski period zamrznuti pre nego što dođe do formiranja kristala leda (Bray, 2000).

Danas se, u tom smislu, češće koristi tehnika kritične tačke (critical point drying, engl.) (CPD) (Bray, 2000; Baskin et al., 2014), koja podrazumeva primenu povišene temperature i pritiska. U ovom postupku, dehidratacija uzoraka se obavlja etil-alkoholom (30%, 50%, 70%, 80%, 90% i 100% etil-alkohol, kao i nekoliko dodatnih ispiranja u 100% etil-alkoholu) (Zhou et al., 2006). Uzorci se zatim tretiraju ohlađenim, tečnim ugljen-dioksidom, koji se potom zagreva pod pritiskom kako bi prošao kroz kritičnu tačku temperature i pritiska (31,1°C, 72,9 atm). Na taj način se podstiče prelazak ugljen-dioksida iz tečnosti u gas. Pri tome, molekuli rastvarača ulaze u gasnu fazu više ili manje istovremeno unutar uzorka, čime se postiže izbegavanje formiranja granične površine između tečnosti i gasa i pratećeg visokog površinskog napona (Baskin et al., 2014). Kada je reč o osetljivim biološkim uzorcima, pomenute metode mogu dovesti do značajnih oštećenja, čime se gubi realna slika o morfologiji i anatomiji, što sugerise da je potrebno da se izvrše izvesne modifikacije u metodama koje se tiču pripreme uzoraka za SEM.

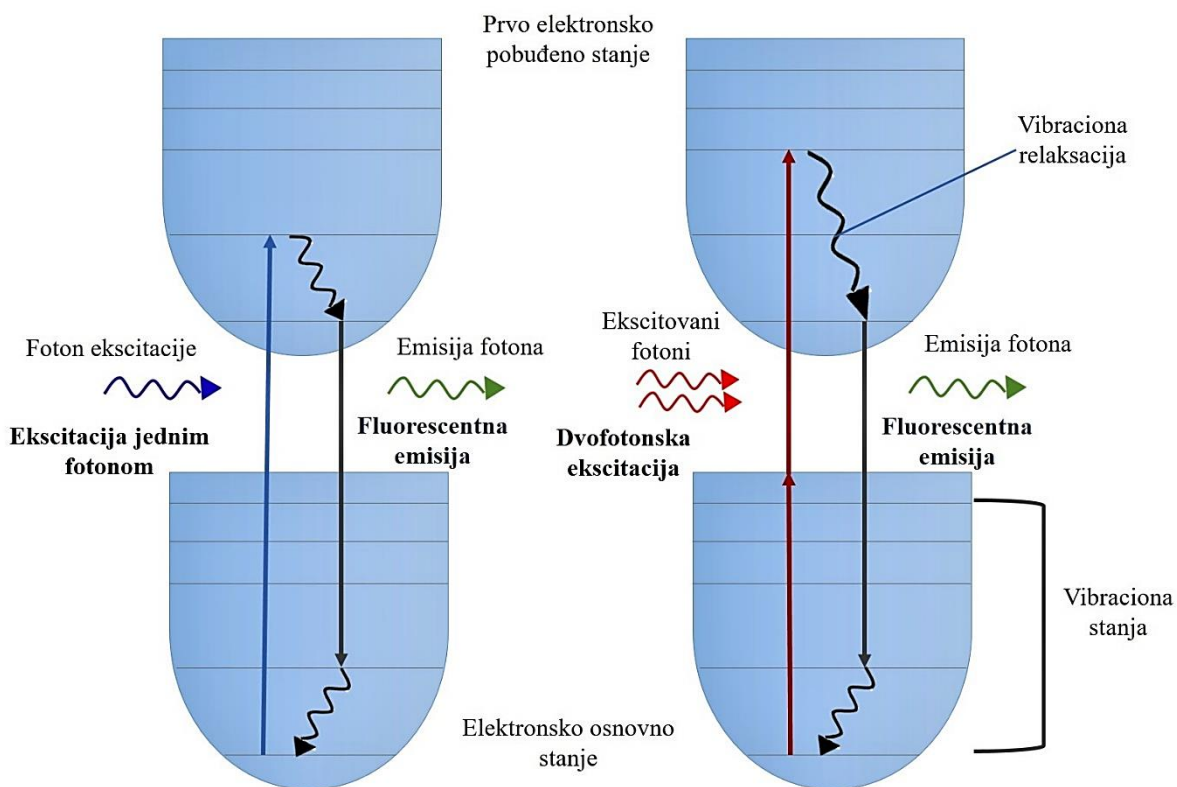
1.4.2. Dvofotonski ekscitovana fluorescentna nelinearna mikroskopija: opšti biofizički principi i instrumentacija

U biološkim i medicinskim naukama dvofotonski ekscitovana fluorescentna nelinearna mikroskopija, tj. TPEF (two-photon excited fluorescence, engl.) modalitet nelinearne mikroskopije, nalazi posebno značajnu primenu. Upotreba ove vrste fluorescentne mikroskopije je omogućila postizanje detaljnijeg uvida u biološke strukture, što je doprinelo napretku u brojnim istraživanjima (So et al., 2000; Hoover & Squier, 2013; Adur et al., 2015).

Termin *nelinearna mikroskopija* se odnosi na takav vid laserske mikroskopije gde se upotrebljava lokalizovano nelinearno pobuđivanje (ekscitacija) fluorescencije u okviru tanke raster-skenirajuće ravni (Zipfel et al., 2003). Sama fluorescencija predstavlja proces koji se događa pri prelasku elektrona iz pobuđenog stanja u osnovno stanje, u kratkom vremenskom periodu od nekoliko nanosekundi, čime dolazi do oslobađanja energije u vidu fotona. Ovim procesom emisijski spektar se pomera ka većim talasnim dužinama u odnosu na apsorpcijski spektar (Stoksov pomak) (Kokot, 2015). Efikasnost ovog događaja je određena kvantnim prinosom fluorescencije (Φ), koji je definisan kao odnos broja emitovanih fotona (N_e) i broja apsorbovanih fotona (N_a) (Valeur & Berberan-Santos, 2012):

$$\Phi = N_e/N_a$$

Kada je reč o dvofotonskoj ekscitaciji, bitno je napomenuti da se koristi približno dvostruka talasna dužina u poređenju sa jednofotonskim ekscitovanjem, premda se sam princip pobuđivanja ne razlikuje (**Slika 8**) (Kokot, 2015). Naime, kod ovakvog tipa ekscitacije, dva fotona nose približno po polovinu energije (Mulligan & MacVicar, 2007). Bitno je napomenuti da prednost dvofotonske ekscitacije u odnosu na jednofotonsku leži u tome što svetlost veće talasne dužine može dublje prodirati kroz tkivo uzorka u odnosu na svetlost kraće talasne dužine, čime se smanjuju efekti rasejanja svetlosti (Helmchen & Denk 2005, citirano u Sanderson et al., 2014; Kokot, 2015).



Slika 8. Jablonski dijagram. Poređenje jednofotonske i dvofotonske ekscitacije (ilustrovano prema So, 2002; Kokot, 2015).

Sam signal se može optimizovati podešavanjem ekscitacione talasne dužine, tako da bude usklađen sa apsorpcionim spektrom. U blizini apsorpcionog maksimuma se pobuđuje fluorofora, a što je veća fluorescencija, to će biti jači signal. Sve ovo se postiže upotrebom **lasera** koji se podešavaju na talasne dužine usklađene sa vrstom fluorofore (Matsumoto & Adams, 2002; Sanderson et al., 2014).

Generalno posmatrano, laseri se odlikuju znatnim brojem jedinstvenih karakteristika u poređenju sa ostalim svetlosnim izvorima, poput ekstremno velikog intenziteta svetlosti,

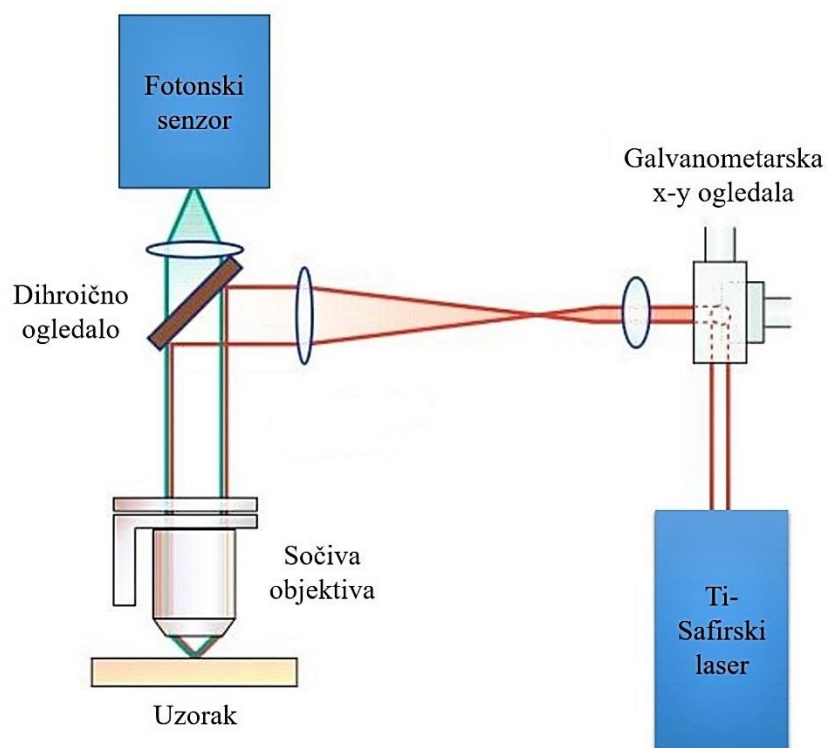
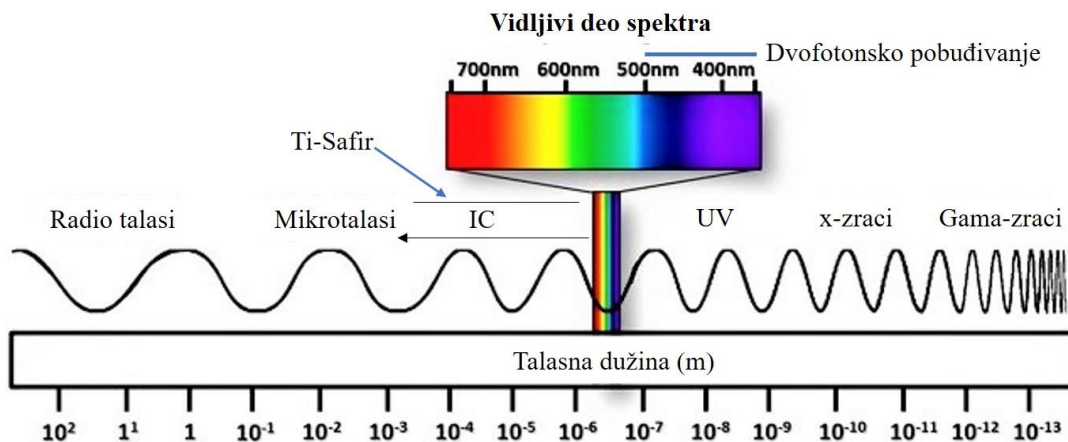
prostorne koherentnosti i monohromatičnosti, što doprinosi mogućnosti fokusiranja na veoma male delove uzorka, uporedive sa talasnom dužinom laserske svetlosti (Matsumoto & Adams, 2002).

Upotreba femtosekundnih lasera različitih talasnih dužina je obezbedila efikasnu nelinearnu ekscitaciju dovoljno niskom energijom, tako da se biološki uzorci ne mogu oštetiti. Naime, ovakvi laseri emituju veoma veliki broj fotona u kratkim impulsima (10^{-15} s) (Santos et al., 2009; Adur et al., 2016). Takođe, njihovim korišćenjem su poboljšani rezolucija snimaka i 3D oslikavanje, što je za kratko vreme našlo široku primenu u snimanju različitih bioloških struktura (Santos et al., 2009).

Kako bi se proces dvofotonskog pobuđivanja odigrao, apsorbovani fotoni moraju do uzorka stići simultano, što se može postići upotrebom pomenutih femtosekundnih lasera visoke snage (Sanderson et al., 2014). Danas se najčešće koristi titanijum-safirni laser (Ti: Sapphire laser, engl.), čija se talasna dužina može podešavati u rasponu od 700-1000 nm (**Slika 9a**) i koji omogućava dvofotonsko pobuđivanje u ultravioletnom i zelenom delu spektra (350-500 nm) (So et al., 2002). Ova vrsta lasera se pokazala kao najbolji izbor u dvofotonskoj fluorescentnoj mikroskopiji, kada su u pitanju biološke strukture (Rabasović et al., 2015) U razvoju su i tzv. „solid-state” laserski uređaji za primenu na većim talasnim dužinama (So et al., 2002).

Laserska svetlost se do uzorka usmerava pomoću dihroičnog ogledala i motorizovanih optičkih elemenata (**galvanometarska ogledala**), koji pomeraju laserski snop po principu „linija po liniju” po X i Y osi unutar fokalne ravni, što rezultuje u dobijanju optičkog preseka (**Slika 9b**) (So et al., 2000).

Kada usmerena laserska svetlost dođe u kontakt sa molekulima u uzorku, dolazi do pobuđivanja elektrona samog uzorka pri čemu se selektivno generišu fluorescentni fotoni u maloj fokalnoj zapremini. Emitovana svetlost se se prikuplja kroz **objektiv** i dalje usmerava dihroičnim ogledalima i filterima prema fotodetektoru (**fotonskom sensoru**), gde se će se signal registrovati (Adur et al., 2016) (**Slika 9b**). Fotodetektor, uključujući fotomultiplikatorske cevi, fotodiode i CCD (charge-coupled device, engl.) kameru, su sinhronizovani sa displejnim uređajem. Signali se finalno sumiraju, digitalizuju i prikazuju na ekranu računara (So et al., 2000).



Slika 9. Princip i instrumentacija dvofotonski pobuđene nelinearne mikroskopije. (a) Opseg podešavanja titanijum-safirskog lasera u blizini dela infracrvene talasne dužine svetlosnog spektra i pobuđivanje fluorofora koje su u ultravioletnom i optičkom delu spektra (~350-500 nm); (b) pojednostavljena shema nelinearnog dvofotonskog mikroskopa (modifikovano prema So et al., 2000; Mulligan & MacVicar, 2007).

Ova tehnika je slična konfokalnoj mikroskopiji, sa tim da postoji razlika u dubini penetracije kroz uzorak, što doprinosi većoj informativnosti, ali i razlika u boljem redukovanju artefakta i pozadinskog šuma tokom snimanja, a u većini slučajeva nije potrebno primeniti bojenje tkiva, već se konačna slika bazira na autofluorescenciji samog uzorka (So, 2002; Steven et al., 2008).

U odnosu na konvencionalnu svetlosnu mikroskopiju, fluorescentna mikroskopija se svakako odlikuje mogućnošću 3D oslikavanja i daleko većom rezolucijom, kao i jednostavnijom pripremom uzoraka. Neuporediva prednost TPEF modaliteta se ogleda i u tome što je kod svetlosne mikroskopije slika u fokusnoj ravni obično zamućena ogromnim šumom izvan fokusa (So, 2002).

Osim nelinearnog 3D oslikavanja bioloških struktura, nelinearni modaliteti su omogućili i praćenje ćelijskih procesa *in vivo*, kao i ćelijskog kretanja i distribucije i ekspresije određenih molekula u živim ćelijama na veoma visokoj rezoluciji. Ovakva posmatranja je moguće obaviti u kontinuitetu, tokom dužeg vremenskog perioda, pri čemu su minimizirane neželjene interakcije, poput termičkih i mehaničkih nuspojava. To je doprinelo veoma značajnom napretku u biološkim naukama i medicini (Cole, 2014; Choi, 2015; Adur, 2016).

U morfologiji i anatomiji insekata, ova mikroskopska metoda omogućava uvid u detaljniju trodimenzionalnu sliku uzorka, kao i dostupnost informacija o dužini, širini, debljini i dijametru struktura bez prethodne pripreme tkivnih preseka. Takođe, tkiva koja sadrže hitin i miozin u svom sastavu imaju sposobnost autofluorescencije, kao što je već pomenuto u ranijem potpoglavlju, što ukazuje na jednostavnost pripreme tkiva bez primene obeleživača i bojenja. Na taj način se za pripremu uzoraka i snimanje značajno štedi u vremenu, u čemu se ogleda još jedna prednost ove tehnike kada govorimo o radu sa velikim brojem uzoraka (Rabasović et al., 2015).



2. CILJEVI



1. Istraživanje antimikrobnog dejstva sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka na humane patogene mikroorganizme (bakterije i mikromicete);
2. Ispitivanje citotoksičnog potencijala sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka na humane tumorske [MCF-7 (adenokarcinom dojke), NCI-H460 (nesitnoćelijski karcinom pluća), HeLa (cervikalni karcinom), HepG2 (hepatocelularni karcinom)] i netumorske ćelijske kulture [PLP2 (primarna ćelijska kultura hepatocita)];
3. Ispitivanje antimikrobnog dejstva sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste trčuljaka *L. (P.) punctatus* na mikroorganizme iz istog pećinskog staništa;
4. Posmatranje i pronalaženje ekološke pozadine antimikrobne aktivnosti sekreta vrste *L. (P.) punctatus* na humane patogene i mikroorganizame izolovane iz istog pećinskog staništa;
5. Morfo-anatomska i histološka karakterizacija pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka primenom SEM i TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Sakupljanje i rukovanje primercima iz prirode

3.1.1. Prikupljanje jedinki trčuljaka iz prirode

Adulti jedinki oba pola odabranih vrsta trčuljaka sakupljeni su ručno na nekoliko lokaliteta u Srbiji, u periodu od 2014-2017. godine. Prikupljeni su predstavnici pet vrsta potporodice Carabinae (tribus Carabini), jedan predstavnik potporodice Pterostichinae (tribus Pterostichini) i jedan predstavnik potporodice Platyninae (tribus Sphodrini).

3.1.1.1. Opšte karakteristike ispitivanih vrsta trčuljaka

Abax (Abax) parallelepipedus (Piller & Mitterpacher, 1783) (potporodica Pterostichinae, tribus Pterostichini) može se naći na području severne i centralne Evrope u šumskim ekosistemima, na raznim nadmorskim visinama. Ova vrsta je najčešće crne boje i robusnog izgleda. Na apikalnim tarzomerama postoji nekoliko seta ventralno. Dužina tela iznosi između 15,8 mm i 20,8 mm (Slika 10a) (Hürka, 1996).

Calosoma (Calosoma) sycophanta (Linnaeus, 1758) (potporodica Carabinae, tribus Carabini) predstavlja takson distribuiran u Holarktiku, a naročito je česta u području centralne Evrope. Radi se o predatorskoj vrsti koja se hrani larvama i lutkama leptira (Evans, 2009). Najčešće je zastupljena u šumskim staništima koja naseljava gubar, te se njena sezonska pojava može pratiti varijacijama u brojnosti populacija ovih šumskih štetočina. Introdikovana je u Severnu Ameriku i na ostrvo Java u Indoneziji. Ova vrsta se odlikuje plavim pronotumom i zlatno-zelenim elitrama. Dužina tela se kreće od 18 mm do 30 mm. Fovee intervala 4, 8 i 12 elitri su izrazito uže od širine samih intervala. Zadnji trohanter je bez setifernih punktura (Slika 10b) (Hürka, 1996).

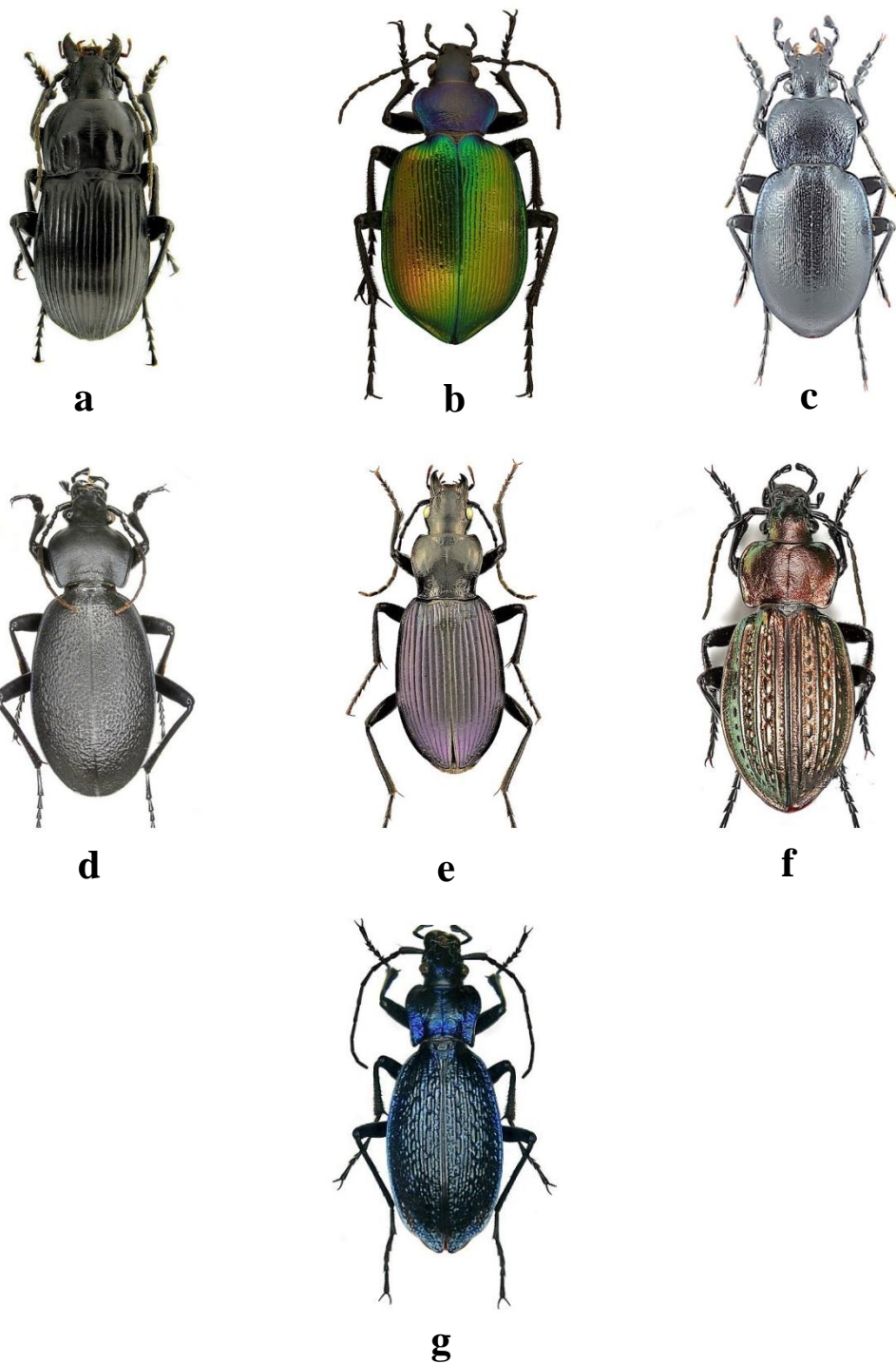
Carabus (Tomocarabus) convexus Fabricius, 1775 (potporodica Carabinae, tribus Carabini) se najčešće sreće na području centralne Evrope. Zastupljena je u skrivenim i zasenčenim delovima šumskih staništa. Posедуje crne elitre sa kompletnim grebenima i plavim elitralnim marginalnim delom, kao i tri reda nejasnih fovea. Dužina tela iznosi od 14 mm do 20 mm (**Slika 10c**) (Hůrka, 1996).

Carabus (Procrustes) coriaceus Linnaeus, 1758 (potporodica Carabinae, tribus Carabini) se može pronaći u gotovo čitavoj Evropi, ukoliko se izuzme Velika Britanija i Iberijsko poluostrvo. Najčešće naseljava šumska staništa, od malih nadmorskih visina do planinskih delova. Dužina tela se kreće od 33 mm do 40 mm i crne je boje (**Slika 10d**) (Hůrka, 1996).

Laemostenus (Pristonychus) punctatus (Dejean, 1828) (potporodica Platyninae, tribus Sphodrini) predstavlja vrstu distribuiranu u području jugoistočne Evrope i Balkana. Pripadnicima ove vrste je telo vretenasto, crne boje, sa tamno plavim elitrama. Dužina tela se kreće od 13,2 mm do 18,3 mm. Pronotum je u samoj bazi i uz posteriorni deo lateralne margine izrazito punktiran (**Slika 10e, Prilog v**) (Hůrka, 1996). Ova vrsta se često označava kao troglofilna (Ćurčić, pers. comm.).

Carabus (Eucarabus) ullrichii Germar, 1824 (potporodica Carabinae, tribus Carabini) naseljava različita staništa centralne i jugoistočne Evrope, poput livada, žbunastih zajednica i otvorenih šuma. Dužina tela ove robusne vrste je varijabilna i kreće se od 22 mm do 33 mm. Elitralne tuberkule su vidno podignute. Na dorzalnoj strani telo poseduje bakarnu boju, neretko dolazi do pojave zelenih nijansi, dok je ventralna strana crne boje (**Slika 10f**) (Hůrka, 1996).

Carabus (Chaetocarabus) intricatus Linnaeus, 1761 (potporodica Carabinae, tribus Carabini) je uglavnom zastupljena u otvorenim šumskim ekosistemima zapadne, centralne i jugoistočne Evrope, sve do severnog dela Balkana. Dužina tela iznosi od 24 mm do 36 mm. Uglavnom su jedinke plave boje, katkad sa primesama zeleno-crne nijanse (**Slika 10g**) (Hůrka, 1996).



Slika 10. Dorzalni prikaz habitusa odabranih predstavnika porodice Carabidae. (a) *A. (A.) parallelepipedus* (<http://carabidae.org>); (b) *C. (C.) sycophanta* (<http://carabidae.org>); (c) *C. (T.) convexus* (<http://www.researchgate.net>); (d) *C. (P.) coriaceus* (<http://carabidae.org>); (e) *L. (P.) punctatus* (<http://insects.nature4stock.com>); (f) *C. (E.) ullrichii* (<http://www.biolib.cz>); (g) *C. (C.) intricatus* (<http://carabidae.org>).

3.1.1.2. Lokaliteti

Primerici vrsta *A. (A.) parallelepipedus*, *C. (C.) sycophanta*, *C. (T.) convexus*, *C. (P.) coriaceus* i *C. (E.) ullrichii* su sakupljeni na planini Avala, između sela Beli potok i Pinosava, 44°41'25"N, 20°30'51"E, blizu Beograda, centralna Srbija (prosečne vrednosti temperature i vlažnosti vazduha tokom svih uzorkovanja: 28°C i 20%) (i); uzorci vrste *C. (C.) intricatus* su prikupljeni u selu Golubinje, planina Miroč, 44°33'25.74"N, 22°17'3.62"E, blizu Donjeg Milanovca, istočna Srbija (prosečne vrednosti temperature i vlažnosti vazduha tokom svih uzorkovanja: 19°C i 30%) (ii); jedinke vrste *L. (P.) punctatus* su sakupljene u Ogoreličkoj pećini, selo Sićevo, 43°20'27.35"N, 22°5'2.8"E, Svrljiške planine, blizu Niša, jugoistočna Srbija (prosečne vrednosti temperature i vlažnosti vazduha svih pet prostorija pećine, tokom svih uzorkovanja: 12,6°C i 68,7% u martu mesecu i 14,6°C i 87,8% u junu mesecu) (**Tabela 3, Prilog i**) (Nenadić et al., 2016b, 2017a) (iii). Jedinke epigejskih trčuljaka su nakon sakupljanja čuvane u laboratorijski kontrolisanim uslovima, na konstantnim vrednostima parametara (temperatura i vlažnost vazduha), koje su bile iste kao sa lokaliteta sa kojih su jedinke bile prikupljene. Troglofilna vrsta *L. (P.) punctatus* je održavana na temperaturi od 10°C u plastičnom frižideru, pri totalnoj zamračenosti, pri čemu je vlažnost uzoraka i podloge održavana konstantnom. Svi uzorci su sačuvani u zbirci Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b, 2018).

Tabela 3. Prikaz tačaka uzorkovanja, parametara životne sredine i podaci o uzorcima *L. (P.) punctatus* sakupljenim u Ogoreličkoj pećini u martu i junu mesecu 2015. i 2017. godine.

Tačke uzorkovanja u pećini	Opis tačaka uzorkovanja	Temperatura vazduha	Mart /jun	
			Relativna vlažnost vazduha	Broj prikupljenih jedinki <i>L. (P.) punctatus</i>
1	15 m od ulaza u pećinu, postoji delimična osvetljenost	14°C/18°C	60%/80%	0/9
2	50 m od ulaza u pećinu, zona totalnog mraka	12,5°/15°C	61%/86%	3/12
3	70 m od ulaza u pećinu, zona totalnog mraka, na samom skretanju glavnog kanala prema poslednjoj dvorani	12°C/13,8°C	61,5%/90%	7/11
4	90 m od ulaza u pećinu, zona totalnog mraka, u skrivenom delu kanala	12°C/13,5°C	80%/91%	8/5
5	103 m od ulaza u pećinu, zona totalnog mraka, neposredno pre jamskog dela pećine	12,5°C/13°C	81%/92%	12/7

3.1.2. Sakupljanje uzoraka bakterija i mikromiceta iz pećinskog staništa

3.1.2.1. Prikupljanje i izolacija uzoraka mikromiceta sa zidova pećine

Uzorci mikromiceta su izolovani sa nižih delova zidova Ogoreličke pećine, blizu podloge koja je uglavnom sačinjena od guana, na pet različitih tačaka uzorkovanja u martu mesecu 2015. godine. Sredinski uslovi tokom uzorkovanja su prethodno predstavljani u **Tabeli 3**. Ukupno 11 uzoraka mikromiceta je prikupljeno putem sterilnih pamučnih briseva (po dva uzorka u prve dve prostorije i tri uzorka iz poslednje prostorije pećine). Pod sterilnim laboratorijskim uslovima,

uzorci sa briseva su razblaženi u 10 mL sterilne dejonizovane vode, a potom podvrgnuti snažnom šejkiranju 10 minuta. Nakon toga, 1 mL svake dobijene konidijalne suspenzije je inokulisano u Petri šolje na standardnoj hranljivoj podlozi (Malt Extract Agar, engl.) (MEA) u triplikatu. Kako bi se sprečila kontaminacija bakterijskim kolonijama, 500 μgL^{-1} streptomicina je dodato tokom pripreme hranljive podloge. Inkubacija je izvršena u termostatu (UE500, Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, Nemačka) na $25\pm 1^\circ\text{C}$ tokom sedam dana (Nenadić et al., 2017a).

Čiste kulture identifikovanih mikromiceta su dobijene iz laboratorije Katedre za algologiju, mikologiju i lihenologiju Instituta za botaniku i Botaničke bašte “Jevremovac” Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta, gde su mikromicete determinisane korišćenjem sledećih dihotomih ključeva: Raper & Fennel (1965), Ainsworth et al. (1973), Pitt (1979), Ellis & Ellis (1997), Samson et al. (2010), Bensch et al. (2012) i Woudenberg et al. (2013). Dobijene mikromicete su korišćene u antimikrobnoj studiji u sklopu ove doktorske disertacije (Nenadić et al., 2017a).

3.1.2.2. Prikupljanje uzoraka guana

U prethodnoj našoj nezavisnoj zajedničkoj studiji (Kabić, 2016 i nepublikovani podaci) je utvrđen i analiziran mikrobijalni diverzitet guana u Ogoreličkoj pećini (*Prilog iia, iib i iiii*). Na osnovu navedene studije je ustanovljeno da su određene vrste bakterija i gljiva iz guana prisutne u svim prostorijama pećine. Kako se prema navedenom radi o dominantim izolatima u guanu, selektivno su odabrani kako bi bili testirani u sklopu antimikrobne studije u ovoj doktorskoj disertaciji. Bakterijski izolati su identifikovani molekularnim metodama. Izolati mikromiceta su preliminarno identifikovani uz pomoć morfoloških ključeva Raper & Fennel (1965), Pitt (1979), Watanabe (2002) i Samson et al. (2010), dok je molekularnim metodama data finalna potvrda u identifikaciji. Izolacija i identifikacija su obavljani u laboratorijama pri Katedri za mikrobiologiju i Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac” Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta. Ukupno 30 uzoraka guana je

prikupljeno sa poda Ogoreličke pećine sa 5 tačaka uzorkovanja (6 uzoraka po tački uzorkovanja) (prethodno predstavljeno u **Tabeli 3; Prilog i**).

3.2. Izolovanje i merenje mase sekreta pigidijalnih žlezda sakupljenih trčuljaka

Stimulacijom posteriornog dela abdomena trčuljaka je postignuto ekstrahovanje uzoraka sekreta pigidijalnih žlezda iz svake jedinke, koji su rastvoreni u 5% vodenom rastvoru DMSO dimetil sulfoksida (DMSO) [(CH₃)₂SO] (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka), i čuvani u posebnim vijalicama na 4°C, u frižideru, u laboratoriji Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta.

Masa ispuštenih sekreta iz jedinki je merena na analitičkoj vagi (Sartorius Model 2405, Sartorius Group, Getingen, Nemačka), sa maksimumom merene težine do 30 g, sa rezolucijom od 0,001 mg, u laboratoriji Katedre za organsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta. Najpre su merene prazne vijalice, da bi nakon toga bile izmerene vijalice ispunjene čistim sekretom. Razlika između punih i praznih vijalica je ukazala na ukupnu masu sekreta istisnutog iz pigidijalnih žlezda svih testiranih jedinki za svaku vrstu posebno. Eksperiment merenja je ponovljen tri puta, u cilju potvrde validnosti rezultata (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b, 2018).

3.3. *In vitro* antimikrobna studija

3.3.1. Primenjeni biološki materijal

Za antimikrobni esej testiranja aktivnosti na humane patogene, upotrebljeni su sekreti pigidijalnih žlezda ekstrahovani iz sledećih uzoraka: 44 jedinke vrste *A. (A.) parallelepipedus*, 4 jedinke vrste *C. (P.) coriaceus*, 1 jedinka vrste *C. (C.) intricatus*, 12 jedinki vrste *C. (E.) ullrichii*, 5 jedinki vrste *Calosoma (C.) sycophanta*, kao i 30 jedinki vrste *L. (P.) punctatus*.

Uzorci su rastvoreni u 3000 μ L 5% vodenog rastvora DMSO (5 mL DMSO u 95 mL bidestilovane vode), pojedinačno po uzorku.

Kod ispitivanja antifungalnog dejstva na mikromicete izolovane sa zidova pećine je korišćen sekret ekstrahovan iz 30 jedinki vrste *L. (P.) punctatus*. Uzorak je rastvoren u 3000 μ L 5% vodenog rastvora DMSO.

Pri ispitivanju antimikrobne aktivnosti na potencijalne patogene iz guana je izolovan sekret pigidijalnih žlezda 44 jedinke vrste *L. (P.) punctatus*. Uzorak je rastvoren u 3000 μ L koncentrovanog metanola.

Svi uzorci su čuvani u frižideru na 4°C u laboratoriji Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b).

3.3.2. Sintetički antibiotici i antimikotici

Pri testiranju bakterijskih humanih patogena, kao pozitivna kontrola su primenjeni sintetički antibiotici streptomycin (1 mg aktivne supstance u 1 mL fiziološkog rastvora; početna koncentracija 0,50 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka) i ampicilin (500 mg amoksicilin trihidrata u 500 mL fiziološkog rastvora; početna koncentracija 0,50 mg/mL) (Panfarma, Beograd, Srbija).

Tokom testiranja pećinskih bakterijskih izolata, korišćeni su streptomycin (1 mg aktivne supstance u 1 mL fiziološkog rastvora; rastvaranjem štoka od 20 mg/mL u destilovanoj vodi je dobijena finalna koncentracija od 400 μ g/mL) (HiMedia, Mumbai, Indija) i rezazurin natrijumova so [$>90\%$ (LC) $C_{12}H_6NNaO_4 = 251,17$ g/mol; finalna koncentracija 0,675 mg/mL] (TCI, Zwijndrecht, Belgija).

Kao sintetički antimikotici, pri testiranju humanih patogenih mikromiceta, kao i mikromiceta izolovanih sa zidova pećine, primenjeni su ketokonazol (200 mg aktivne supstance u 200 mL fiziološkog rastvora; početna koncentracija 5,0 mg/mL) (Zorka Pharma, Šabac, Srbija) i bifonazol (bikutrin) ($C_{22}H_{18}N_2$, 1 g aktivne supstance u 100 mL razblaženog etanola, uz dodatak solubilizatora i glicerola; početna koncentracija 5,0 mg/mL) (Srbolek, Beograd, Srbija).

Prilikom testiranja mikromiceta iz guana, korišćen je nistatin (100 mg aktivne supstance u 100 mL fiziološkog rastvora; početna koncentracija 1,0 mg/mL) (Hemofarm koncern a.d., Vršac, Srbija).

3.3.3. Hranljivi medijumi

Kao hranljiva podloga za bakterijske kulture humanih patogena je korišćena TSB (Tryptic Soy Broth, engl.) podloga (15 g kazeina, 5 g peptona, 5 g NaCl, 15 g agara, 1 L K_2HPO_4 i 1000 mL destilovane vode) (Biolife Italiana, Milano, Italija).

Bakterijski sojevi pečinskih izolata su gajeni na LB (Luria-Bertani Broth, engl.) podlozi (10 g baktotripton, 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 3 mL 1M NaOH i 1000 mL destilovane vode) (Becton Dickinson, Nju Džerzi, SAD).

Za pripremu kultura svih sojeva mikromiceta, upotrebljena je čvrsta sladni agar (Malt Agar, engl.) (MA) podloga (15 g agara, 50 g sladnog ekstrakta i 1000 mL destilovane vode; kuvano do potpunog rastvaranja, sterilisano na 121°C/25 min, pH = 7, regulisano putem 1N NaOH) (Torlak, Beograd, Srbija).

U toku mikrodilucione metode, za humane patogene i izolate mikromiceta izolovanih sa zidova pećine je korišćena podloga sladni bujon (Malt Broth, engl.) (MB) (50 g sladnog ekstrakta i 1000 mL destilovane vode; sterilizovano na 121°C/15 min, pH = 7, regulisano putem 1N NaOH), dok je za bakterijske pečinske izolate upotrebljena LA (Luria-Bertani Agar, engl.) podloga (LB sa dodatkom 15 g agara na 1000 mL bidestilovane vode) (Becton Dickinson, Nju Džerzi, SAD). Kada su u pitanju mikromicete izolovane iz guana, korišćen je tečni sladni ekstrakt (Malt extract broth, engl.) (MEB) (50 g sladnog ekstrakta LAB M Limited 1 i 1000 mL destilovane vode; sterilizovano na 121°C/15 min, pH = 7, regulisano putem 1N NaOH).

3.3.4. Priprema prekonocnih kultura bakterija

Bakterijski sojevi humanih patogena su štokirani u glicerolu, presejani na 2 mL TSB podloge i inkubirani u termostatu 24 h na 37°C. Svaka prekonocna kultura je sadržala ukupno

1,0 x 10⁹ CFU/mL podloge. Finalni rastvor ćelijske kulture i podloge (1,0 x 10⁸ ćelija/mL) je postignut razblaživanjem 1:9, odnosno 100 mL primarne kulture je razblaženo u 900 ml TSB podloge (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017b).

Bakterijski sojevi pečinskih izolata su iz glicerola presejani na LB podlogu i inkubirani u termostatu 24 h na 30°C. Finalne testirane koncentracije ćelija bakterijskih pečinskih izolata iznosile su 1 × 10⁶ CFU/mL.

3.3.4.1. Testirani sojevi bakterija

3.3.4.1.1. Humani patogeni

Pri antibakterijskom eseju su korišćeni sledeći laboratorijski i klinički sojevi bakterija: *Bacillus cereus* (klinički izolat), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (NCTC7973) (Gram-pozitivne bakterije), *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* (klinički izolat) i *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) (Gram-negativne bakterije). Pomenuti izolati su čuvani u Mikološkoj laboratoriji Odeljenja za fiziologiju biljaka Univerziteta u Beogradu - Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

3.3.4.1.2. Izolati iz guana

Pri ispitivanju antimikrobne aktivnosti sekreta na mikroorganizme izolovane iz guana, testirano je 12 izolata bakterija: *Enterococcus eurekaensis* (29.3), *Rhodococcus jialingiae* (O26.1), *Micrococcus yunnanensis* (T5.3), *Bacillus thuringiensis* (26.2), *B. cereus* (30.1), *Lysinibacillus sphaericus* (O4.3), *Paenibacillus polymyxa* (T21.1), *Viridibacillus arvi* (T26.2) (Gram-pozitivne bakterije), *Escherichia fergusonii* (O29.1), *Pseudomonas putida* (11.1), *Citrobacter freundii* (O11.3) i *Serratia proteamaculans* (O11.1) (Gram-negativne bakterije). Navedeni izolati su čuvani u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac” Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta.

3.3.5. Priprema kultura mikromiceta

Sve analizirane mikromicete (humani patogeni, izolati sa zidova pećine i izolati iz guana) su kultivisane na čvrstoj MA podlozi 21 dan na 26°C, a potom čuvane u termostatu na 4°C. Inokulum je pripremljen spiranjem spora sa površine supstrata upotrebom sterilnog rastvora 0,85% NaCl i 0,1% deterdženta Tween 80 (humani patogeni i izolati sa zidova pećine), odnosno Tween 20 (izolati iz guana). Inokulum je kultivisan na 4°C. Finalna koncentracija spora je bila $1,0 \times 10^5$ ćelija/mL podloge (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b).

3.3.5.1. Testirani sojevi mikromiceta

3.3.5.1.1. Humani patogeni

Pri ispitivanju antifungalne aktivnosti sekreta na humane patogene, ispitivani su sledeći izolati: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *A. ochraceus* (ATCC 12066), *A. versicolor* (ATCC 11730), *A. niger* (ATCC 6275), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *P. ochrocloron* (ATCC 9112), *T. viride* (IAM 5061) i *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (izolat iz hrane). Testirani sojevi mikromiceta koji su korišćeni u ovim istraživanjima predstavljaju direktne ili indirektne humane patogene i potencijalno humane patogene, koji mogu biti odgovorni za mnogobrojna oboljenja kako kod ljudi, tako i kod životinja.

Testirani izolati su čuvani u Mikološkoj laboratoriji Odeljenja za fiziologiju biljaka Univerziteta u Beogradu - Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

3.3.5.1.2. Pećinski izolati

Pri ispitivanju antimikrobnog potencijala sekreta na mikromicete izolovane sa zidova pećine, korišćeni su sledeći izolati: *Aspergillus brunneouniseriatus*, *Penicillium* sp., *R. stolonifer*, *Talaromyces duclauxi* i *T. viride* (Nenadić et al., 2017a). Ovi izolati su čuvani u laboratoriji Katedre za algologiju, mikologiju i lihenologiju Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac” Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta.

Prilikom testiranja antimikrobnog potencijala sekreta na mikromicete izolovane iz guana, ispitani su sledeći izolati: *Meyerozyma guilliermondii* (G13-4), *Aspergillus flavus* (G3-1), *Penicillium citrinum* (G5-1) i *Trichoderma harzianum* (G3-2). Testirani izolati pripadaju kolekciji izolata Katedre za algologiju, mikologiju i lihenologiju Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac” Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta.

3.3.6. Mikrodiluciona metoda

U antimikrobnoj studiji koja se odnosi na testiranje humanih patogena, antimikrobni esej je sproveden primenom mikrodilucione metode (Hanel & Raether, 1988; Daouk et al., 1995; CLSI, 2009; Soković et al., 2010) u cilju određivanja MIK, MBK i MFK testiranih sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka. Primenjeno je dvostruko serijsko razblaživanje smeše sekreta u 5% vodenom rastvoru DMSO. U svaki bunarčić mikrotitracione ploče (F-mikrotitracione ploče sa poklopcem, sistem od 96 bunarčića) (Spektar, Čačak, Srbija) je dodato po 20 μ L odgovarajuće podloge (TSB za bakterije, tečni MA za mikromicete), zatim 180 μ L rastvora sekreta, 10 μ L bakterijskog inokuluma, tj. fungalnog inokuluma (čija zapremina zavisi od soja mikromiceta). Ukupna zapremina svakog bunarčića je bila 210 μ L. Kao pozitivne kontrole su korišćeni gore pomenuti antibiotici i antimikotici. Petoprocentni vodeni rastvor DMSO je upotrebljen kao negativna kontrola (kontrola rasta bakterija/mikromiceta), a „blank” kao kontrola sterilnosti (samo podloga za gajenje bakterija/mikromiceta). Nakon aplikacije ispitivanih sekreta i pozitivnih i negativnih kontrola, mikrotitracione ploče sa bakterijskim sojevima su inkubirane na 37°C tokom 24 h, dok su ploče sa mikromicetama inkubirane 72 h na 28°C (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b).

Identična metoda i procedura je sprovedena prilikom testiranja antifungalnog efekta sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* na mikromicete izolovane sa zidova pećine, kao i mikromiceta koje su izolovane iz guana, sa tim da je u slučaju izolata iz guana inkubacija obavljena na 25°C.

U delu antimikrobne studije koji se odnosi na ispitivanje antibakterijskog efekta sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* na sojeve izolovane iz guana, takođe je primenjena mikrodiluciona metoda za određivanje MIK i MBK. Korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića. Vršeno je dvostruko serijsko razblaženje uzorka LB podlogom u koncentracionom opsegu od 0,007-0,225 mg/mL. Pored bunarčića sa ispitivanom supstancom, postavljena je i negativna kontrola (kontrola rasta bakterija) i „blank”. Uzorak sekreta je rastvaran u apsolutnom metanolu, pa je rađena i kontrola rastvarača po istom principu serijskog razblaživanja kao i u slučaju testirane supstance. Najveća testirana koncentracija apsolutnog metanola je bila 10%. Kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik streptomycin u koncentracionom opsegu od 0,0063-0,200 mg/mL. Analiza uzorka sekreta, rastvarača i antibiotika rađeni su u duplikatu. Nakon serijskih razblaženja i postizanja finalne zapremine od 200 μ L, ploče su inkubirane 24 h na 37°C.

3.3.6.1. *Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)*

MIK se definiše kao najniža koncentracija testiranog agensa, nakon čije primene ne dolazi do vidljivog rasta kolonija, odnosno koncentracija koja kompletno inhibira rast bakterijskih kolonija i mikromiceta (Soković et al., 2010; Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b).

MIK vrednost je kod bakterijskih kolonija, u slučaju testiranja humanih patogena, determinisana putem kolorimetrijskog eseja mikrobijalne vijabilnosti, koji se bazira na redukovanju INT (*p*-jodonitrotetrazolijum violet) boje [2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolijum hlorid] (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka), što se postiže poređenjem bakterijskih kolonija sa pozitivnom kontrolom za svaki posmatrani bakterijski soj. Nakon aplikacije boje, bakterijske kolonije su inkubirane 2 h na 37°C. Bledo žuta nijansa kolonija ukazuje na inhibiciju bakterijskog rasta (CLSI, 2009). U cilju evaluacije intenziteta žute boje, upotrebljen je „Microplate reader” (TecanAustria GmbH, Grödig, Austrija; Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka). Najpre su dobijene vrednosti izražene u mg/100 μ L, što je na kraju preračunato u mg/mL (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b).

U delu studije koji se odnosi na testiranje antibakterijskog efekta sekreta na bakterijske sojeve iz guana, primenjeno je spektrofotometrijsko očitavanje rasta na „microplate reader-u” (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer, OD 570 nm), a nakon toga dodata su 22 μ L resazurina i mikrotitracione ploče su vraćene na doinkubaciju u trajanju od 2 h na 37°C. Nakon inkubacije, praćena je promena boje, tj. resazurinska reakcija. U ovoj metodi koristi se kao indikator resazurin, koji omogućava detekciju mikrobijalnog rasta u veoma malim zapreminama rastvora u mikrotitracionim pločama bez upotrebe spektrofotometra ili kao njegova krajnja potvrda. Resazurin je plava redukujuća boja koja se obično koristi kao indikator hemijske citotoksičnosti u kulturi ćelija. Esej se zasniva na sposobnosti živih, metabolički aktivnih ćelija da redukuju resazurin do rezorufina i konačno do bezbojnog dihidrorezorufina (Karuppusamy & Rajasekaran, 2009). Iz svih bunarčića u kojima nije došlo do promene boje vršeno je zasejavanje na hranljivu podlogu. Nakon prekonocne inkubacije na 37°C posmatran je rast bakterija. Ako je rast uočen, ta koncentracija uzorka sekreta je označena kao MIK vrednost.

U slučaju testiranja sojeva mikromiceta koji su se odnosili na humane patogene i pečinske izolate, MIK vrednosti su determinisane putem brojanja ćelija spektrofotometrijskom metodom. Dobijene vrednosti su izražene u mg/100 μ L, a potom preračunate u mg/mL.

3.3.6.2. Određivanje minimalne baktericidne (MBK) i minimalne fungicidne (MFK) koncentracije

Najniža koncentracija testiranog agensa, nakon čije primene nije došlo do vizuelnog rasta bakterijskih kolonija ili mikromiceta, odnosno najniža koncentracija koja indicira ubijanje 99,5% originalnog inokuluma, definiše se kao MBK/MFK (Soković et al., 2010; Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b).

MBK vrednosti kod testiranja humanih patogena su određene putem kolorimetrijske metode mikrobijalne vijabilnosti koja se zasniva na redukciji INT boje, što se poredi sa pozitivnom kontrolom za svaki posmatrani bakterijski soj. Nakon aplikacije boje, bakterijske

kolonije su inkubirane 2 h na 37°C. Nebojeni bunarčići na mikrotitracionoj ploči su ukazivali na prisustvo baktericidnog efekta (CLSI, 2009; Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b).

U studiji koja se tiče testiranja antibakterijskog dejstva sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste *L. (P.) punctatus* na sojeve izolovane iz guana, u cilju određivanja MBK vrednosti, korišćeno je spektrofotometrijsko očitavanje rasta na „microplate reader-u” (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer, OD 570 nm), kao i prilikom određivanja MIK vrednosti, i praćena je resazurinska reakcija. Ukoliko nakon primene ovog metoda, u prisustvu testiranog sekreta, nije došlo do rasta bakterijskih kolonija, onda su takve koncentracije označene kao MBK vrednosti.

Kod određivanja MFK vrednosti, u slučaju testiranja humanih patogena (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017b), pećinskih mikromiceta (Nenadić et al., 2017a), kao i mikromiceta iz guana, optička gustina svakog bunarčića je merena na talasnoj dužini od 655 nm pomoću uređaja „Microplate Manager” (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austrija; Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka) i poređena sa „blankom” (tečni medijum i rastvoreni ekstrakt) i pozitivnom kontrolom. MFK je finalno determinisana serijskom subkultivacijom 2 mL inokuluma u mikrotitracionim pločama, koje su sadržale 100 mL tečnog medijuma po bunarčiću i daljim inkubiranjem u periodu od 72 h na 25°C. Dobijene vrednosti MBK i MFK su prvenstveno dobijene u mg/100 µL, što je na kraju izraženo u mg/mL.

3.3.7. Statistička analiza i kvantifikacija rezultata dobijenih antimikrobnim esejem

Statistička analiza rezultata antimikrobne studije je izvedena putem softvera Statgraphics Centurion XVII, Version 16.2 i rezultati su predstavljeni u vidu srednjih vrednosti i standardnih grešaka. Primenjena je jednosmerna analiza varijanse (ANOVA), kao i Takijev HSD (honestly significant difference, engl.) test ($\alpha = 0,05$) (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a, 2017b).

3.4. In vitro citotoksični test na netumorske i tumorske ćelijske linije

Ovaj deo studije je obavljen u saradnji sa laboratorijom Politehničkog instituta, Kampus Santa Apolonia, Mountain Research Centre (CIMO), Poljoprivrednog fakulteta, Bragança, Portugal (Nenadić et al., 2018).

3.4.1. Primenjeni biološki materijal

Za citotoksični esej upotrebljeni su sekreti pigidijalnih žlezda ekstrahovani iz sledećih uzoraka: 44 jedinke vrste *A. (A.) parollepipedus*, 4 jedinke vrste *C. (P.) coriaceus*, 12 jedinki vrste *C. (E.) ullrichii* i 30 jedinki vrste *L. (P.) punctatus*. Uzorci su rastvoreni u 3000 µL 5% vodenog rastvora DMSO (5 mL DMSO u 95 mL bidestilovane vode), pojedinačno po uzorku.

Svi uzorci su čuvani u frižideru na 4°C u laboratoriji Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta (Nenadić et al., 2018).

3.4.2. Sintetički antikancerogeni lek

U ovom delu studije kao pozitivna kontrola je upotrebljen komercijalni antikancerogeni lek elipticin (5,11-dimetil-6H-pirido[4,3-b]karbazol) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD) (maksimalne koncentracije od 25 µg/mL) (Nenadić et al., 2018). Prethodno je utvrđena snažna antitumorska aktivnost ovog leka (Paoletti et al. 1980), što je ukazalo na povoljnost njegove upotrebe u testiranjima antitumorskog potencijala u ovoj studiji.

3.4.3. Testirana netumorska ćelijska kultura: priprema ćelijske kulture

Netumorska ćelijska kultura je već prethodno pripremljena i dizajnirana kao PLP2 (primary porcine liver cells, engl.) od hepatocita poreklom iz jetre svinje u laboratoriji Mountain Research Centre (CIMO), Poljoprivrednog fakulteta, Bragança, Portugal, i kao takva je korišćena u testiranju citotoksičnog dejstva u sklopu ove doktorske disertacije.

Štokovi rastvora testiranih sekreta su pripremljeni u 5% vodenom rastvoru DMSO i čuvani na -20°C. Ćelije su direktno praćene upotrebom faznog mikroskopa na svaka 2-3 dana.

Potom su ćelije subkultivisane, posađene na ploču od 96 bunarčića (gustina $1,0 \times 10^4$ ćelija po bunarčiću) i kultivisane u DMEM medijumu sa 10% serumom fetusa govečeta (fetal bovine serum, engl.) (FBS), 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (Nenadić et al., 2018).

3.4.4. Testirane tumorske ćelijske linije: priprema ćelijskih kultura

U ovoj studiji su testirane četiri tumorske linije humanih ćelija: MCF-7 (adenokarcinom dojke), NCI-H460 (nesitnoćelijski karcinom pluća), HeLa (cervikalni karcinom) i HepG2 (hepatocelularni karcinom). Sve tumorske ćelijske linije su dobijene iz Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Nemačka. Humane tumorske ćelije su rutinski održavane kao adherentne ćelijske kulture u RPMI-1640 medijumu (10% toplotno inaktiviran FBS i 2 mM glutamin na 37°C), u vlažnim uslovima, u inkubatoru sa 5% CO₂. Svaka ćelijska linija je zasejana u odgovarajućoj gustini ($1,0 \times 10^4$ ćelija po bunarčiću u sistemu od 96 bunarčića) i inkubirana na 24 h (Nenadić et al., 2018).

3.4.5. Sulforodamin B (SRB) esej

Sve kultivisane ćelije su tretirane 48h različitim koncentracijama svakog uzorka sekreta. Testirani uzorci sekreta su prethodno pripremljeni u rastvorima štoka u 5% vodenom rastvoru DMSO i čuvani na -20°C. Odgovarajuća serijska razblaženja originalnog rastvora sekreta su pripremljena u gorenavedenom rastvaraču (početna koncentracija rastvora rastvarača i sekreta koja je upotrebljena je bila razblažena 0,25% u cilju potvrđivanja odsutnosti citotoksičnosti, a serijsko razblaživanje je rađeno od navedene početne, odnosno maksimalne koncentracije). Ohlađena 10% trihlorosirćetna kiselina (trichloroacetic acid, engl.) (TCA) (100 µL) je upotrebljena za fiksiranje adherentnih ćelija, nakon čega su ćelije inkubirane 60 min na 4°C. Ploče sa ćelijama su potopljene u dejonizovanoj vodi, nakon čega su ćelije osušene. SRB rastvor (0,1% rastvora u 1% sirćetnoj kiselini, 100 µL) je dodat u svaki bunarčić ploče, nakon čega je vršena inkubacija 30 min na sobnoj temperaturi. SRB boja koja nije vezana je otklonjena ispiranjem uz upotrebu 1% sirćetne kiseline. Ploče su potom osušene na vazduhu, dok je vezana SRB boja rastvorena sa 10 mM Tris-om (200 µL). Apsorbanca je merena na 540 nm upotrebom ELX800 Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, SAD) (Calhelha et al., 2012).

Rezultati su predstavljani kao procenat inhibicije ukupnog ćelijskog rasta. Ukoliko dođe do inhibiranja 50% ukupne ćelijske proliferacije, ta koncentracija je označena kao GI_{50} . Ove koncentracije se definišu formulom $[(T-To)/(C-To)] \times 100$, pri čemu **T** predstavlja broj ćelija koje su tretirane određenom koncentracijom testiranog agensa nakon 48 h, **To** je početni broj ćelija (broj ćelija prvog dana, pre inkubacije), a **C** predstavlja broj ćelija nakon 48 h koje su tretirane rastvorom DMSO/H₂O, bez testiranog agensa (negativna kontrola). Kao pozitivna kontrola je korišćen gorepomenuti antikancerogeni lek elipticin (Nenadić et al., 2018).

3.4.6. Statistička analiza i kvantifikacija rezultata dobijenih citotoksičnim esejem

Rezultati ovog dela studije su izraženi u vidu srednjih vrednosti i standardnih devijacija (SD) primenom ANOVA, kao i Takijevog HSD testa ($\alpha = 0,05$), uz Welchovu statističku obradu. Za izvođenje ovakve analize, upotrebljen je SPSS program Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, SAD). Svi uzorci su analizirani u triplikatu (Nenadić et al., 2018).

3.5. Morfo-anatomska studija pigidijalnog žlezdanog kompleksa

3.5.1. Histološka izolacija pigidijalnog žlezdanog kompleksa

Svi primerci trčuljaka su uspavani zamrzavanjem na -20°C tokom 30 minuta. Potom su potopljeni u 70% etil-alkohol i disekovani u predelu abdomena uklanjajući abdominalnih tergita, uz upotrebu binokularne lupe SteREO Discovery.V8 (Carl Zeiss, Jena, Nemačka). Pigidijalne žlezde su izolovane, potopljene u različite medijume, zavisno od tehnike mikroskopije (70% etil-alkohol pre pripreme tkiva za SEM ili koncentrovani glicerol pre primene TPEF modaliteta NLM), i čuvane u frižideru na 4°C u laboratoriji Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta.

3.5.2. Primena skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM)

Uz pomoć SEM je posmatran pigidijalni sistem tri odabrane vrste trčuljaka: *A. (A.) parallelepipedus*, *C. (P.) coriaceus* i *L. (P.) punctatus*. Ovaj deo studije je obavljen u laboratoriji Centra za fotoniku Univerziteta u Beogradu - Instituta za fiziku.

3.5.2.1. Histološka priprema tkiva za SEM

Priprema dela uzoraka tkiva pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka je obavljena na Katedri za botaniku Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta, dok je drugi deo uzoraka pripremljen u laboratoriji Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta. Nakon izolacije žlezdanog sistema, uzorci su čuvani na 4°C u frižideru u 70% etil-alkoholu. Zatim je izvršena dehidracija uzoraka na svakih 10 minuta, u 30%, 50%, 70% i 90% etil-alkoholu, kao i 2 puta u 100% etil-alkoholu. Uzorci su nakon pripreme tkiva čuvani u apsolutnom etil-alkoholu, u frižideru, na 4°C, u laboratoriji Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta.

3.5.2.2. Eksperimentalna postavka i primena SEM

SEM snimci su dobijeni pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa MIRA3 FEG-SEM (Tescan, Brno, Czech Republic), pod visokim vakuumom, pri naponu od 15 kV. Svi uzorci su napareni zlatom/paladijumom na 30 s. Indeks intenziteta elektronskog snopa je iznosio 15,00, a pritisak u koloni oko $127,19e-3$ Pa.

Dobijene fotografije su sklapane, obrađene i unapređene upotrebom programa Adobe® Photoshop CC2018 u cilju uklanjanja nepoželjnih čestica prašine i poboljšanja oštine i kontrasta.

Snimljene su sledeće strukture pigidijalnog žlezdanog sistema: sekretorni lobusi, sabirni kanali, glavni sabirni kanal, rezervoar i eferentni kanal. Navedene strukture su analizirane i poredene između odabranih vrsta, odnosno između pojedinih rodova.

3.5.3. Primena TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije

TPEF modalitetom NLM je posmatran pigidijalni sistem pet odabranih vrsta trčuljaka: *A. (A.) parallelepipedus*, *C. (T.) convexus*, *C. (P.) coriaceus*, *C. (E.) ullrichii* i *L. (P.) punctatus*. Ovaj deo studije je obavljen u laboratoriji Centra za fotoniku Univerziteta u Beogradu - Instituta za fiziku.

3.5.3.1. Histološka priprema tkiva za primenu TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije

Nakon izolacije, uzorci su potopljeni i čuvani u koncentrovanom glicerinu, koji je kasnije korišćen i kao medijum u kome se nalazilo tkivo u toku snimanja. U oslikavanju je korišćen signal nastao usled autofluorescencije posmatranog tkiva.

3.5.3.2. Eksperimentalna postavka i primena TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije

Nakon pripreme tkiva, svi uzorci potopljeni u glicerinskom medijumu su snimljeni upotrebom dvofotonskog laserskog mikroskopa, koji je konstruisan na Univerzitetu u Beogradu - Institutu za fiziku. Pre snimanja, uzorci su postavljani na mehaničko postolje, koje je manipulirano motornim pogonom, prevodeći uzorak vertikalno, sa rezolucijom od 0,3 μm .

Korišćena su dva femtosekundna lasera kako bi se generisala dvofotonska ekscitacija fluorescencije. Upotrebljen je titanijum-safirni laser (Mira 900-F, Coherent, Santa Klara, SAD) (700-840 nm), podržan od strane lasera (Verdi V10, Coherent, Santa Klara, SAD) od 10 W (532 nm), na frekvenciji repeticije od 76 MHz, u okviru opsega podešavanja od 700-1000 nm. Galvanometarska skenirajuća ogledala (6215H, Cambridge Technologies, Bedford, SAD) su korišćena u cilju smanjenja rastera uzoraka. Snimanje je vršeno na različito podešenoj snazi (80-150 mW), u zavisnosti od uzorka. Svi snimci su izrađeni na rezoluciji od 1024 x 1024. Prilikom snimanja svakog uzorka je korišćen Plan-Apochromat mikroskopski objektiv 20 x 0,8 (radna udaljenost vidnog polja 500 μm) (Carl Zeiss, Jena, Nemačka).

Za usmeravanje laserskog snopa u pravcu mikroskopskog objektiva je korišćeno dihroično ogledalo (DMSP805, Thorlabs, Njuton, SAD) granične talasne dužine od 850 nm, a koje propušta kratke talasne dužine. Fotomultiplikatorska cev (PF1006, RCA, Njujork, SAD), zajedno sa odgovarajućim blokirajućim filterima, upotrebljena je za detekciju fluorescencije. Dodatni pomoćni filteri koji propuštaju male talasne dužine su upotrebljeni za detekciju TPEF signala kako bi se redukovao artefakt laserske svetlosti, koja je transmitovana kroz dihroično ogledalo.

U cilju snimanja mikrografija, korišćena je EOS 50D (Canon, Tokio, Japan) digitalna kamera. Kontrola instrumentacije i procesuiranje mikrografija su obavljani putem računara. Softver VolView 3.4 (Kitware, Inc., Klifton Park, SAD) je korišćen za trodimenzionalnu (3-D) vizuelizaciju.

Dobijene fotografije su sklapane, obrađene i unapređene upotrebom programa Adobe® Photoshop CC2018 u cilju uklanjanja nepoželjnih čestica prašine i poboljšanja oštine i kontrasta.

Ovim vidom mikroskopije su analizirane sledeće strukture pigidijalnog žlezdanog sistema: sekretorni lobusi, sabirni kanali, glavni sabirni kanal, rezervoar i eferentni kanal. Navedene strukture su analizirane i poređene između odabranih vrsta, odnosno između pojedinih rodova.

4. REZULTATI

4.1. Antimikrobna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka na humane patogene

Antimikrobna aktivnost 5% DMSO vodenog rastvora sekreta pigidijalnih žlezda šest vrsta trčuljaka [*A. (A.) parallelepipedus*, *C. (P.) coriaceus*, *C. (C.) intricatus*, *C. (E.) ullrichii*, *C. (C.) sycophanta* i *L. (P.) punctatus*] testirana je metodom mikrodilucije na četiri Gram-pozitivna i četiri Gram-negativna bakterijska soja, kao i na 8 vrsta mikromiceta. Antimikrobni potencijal sekreta pigidijalnih žlezda trčuljaka na humane patogene je prvi put testiran u ovoj studiji.

4.1.1. Ukupna koncentracija ekstrahovanog sekreta pigidijalnih žlezda ispitivanih vrsta trčuljaka

Svi uzorci su podvrgnuti identičnom protokolu u cilju dobijanja koncentracija koje su upotrebljene pri antimikrobnom testu. Dobijene koncentracije su predstavljene u 3000 μL 5% vodenog rastvora DMSO. Rezultati merenja mase i dobijene koncentracije sekreta su prikazani u **Tabeli 4** (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017b). Totalna masa sekreta je u zavisnosti od ukupnog broja jedinki iz kojih je sekret izolovan, ali i dijametra rezervoara pigidijalnog sistema koji prati proporcionalno veličinu tela.

Tabela 4. Totalna masa i ukupna koncentracija sekreta pigidijalnih žlezda izolovanog iz šest vrsta trčuljaka.

Vrsta trčuljaka	Broj jedinki	Totalna masa sekreta pigidijalnih žlezda (SV \pm SE)	Ukupna koncentracija sekreta pigidijalnih žlezda u rastvaraču
<i>A. parallelepipedus</i>	44	0,184 mg \pm 0,001 mg	0,123 mg/mL
<i>C. sycophanta</i>	5	0,144 mg \pm 0,001 mg	0,048 mg/mL
<i>C. coriaceus</i>	4	1,503 mg \pm 0,001 mg	1,002 mg/mL
<i>C. intricatus</i>	1	3,614 mg \pm 0,001 mg	1,205 mg/mL
<i>C. ullrichii</i>	12	12,477 mg \pm 0,001 mg	4,159 mg/mL
<i>L. punctatus</i>	30	0,068 mg \pm 0,001 mg	0,022mg/mL

SV - srednja vrednost; SE - standardna greška

4.1.2. Antibakterijski efekat na humane patogene

Primenom mikrodilucione metode (**Slika 11**), utvrđene su MIK i MBK koncentracije 5% DMSO vodenog rastvora sekreta pigidijalnih žlezda, što je predstavljeno u **Tabeli 5**.

Najveći antibakterijski potencijal je utvrđen kada je u pitanju sekret vrste *L. (P.) punctatus* koji je izrazitog baktericidnog/bakteriostatičkog dejstva u poređenju sa ostalim testiranim sekretima kada se uzmu u obzir antimikrobno dejstvo na širok spektar testiranih bakterija (i), kao i najniže vrednosti koncentracija kojima je postignuta ova biološka aktivnost (ii) (Nenadić et al., 2016b). Svi testirani sojevi bakterija su pokazali podjednaku osetljivost (MIK 0,022 mg/mL, MBK 0,045 mg/mL) kada je u pitanju sekret vrste *L. (P.) punctatus*, osim sojeva *Micrococcus flavus* (MIK 0,044, MBK 0,045 mg/mL) i *Escherichia coli* (MIK 0,037, MBK 0,045 mg/mL), koji su pokazali nešto veću rezistentnost.

Sličan nivo antibakterijskog efekta se beleži nakon tretiranja sojeva sekretom koji je izolovan iz vrste *C. (E.) ullrichii*, međutim, kada je u pitanju ovaj sekret, inhibitorne i baktericidne koncentracije su postignute na većim vrednostima u poređenju sa prethodno pomenutom vrstom trčuljaka. Antimikrobna aktivnost za većinu testiranih sojeva bakterija nije zabeležena nakon testiranja sekreta vrste *C. (C.) sycophanta*, osim kada je u pitanju bakterijski soj *E. coli* (MIK 0,024 mg/mL, MBK 0,048 mg/mL). U komparaciji sa prethodnom vrstom, sekret vrste *C. (P.) coriaceus* je pokazao nešto niži stepen antibakterijskog potencijala, kako je u ovom slučaju efekat postignut na dve vrste bakterija, *B. cereus* (MIK 25,545 mg/mL, MBK 50,1 mg/mL) i *P. aeruginosa* (MIK 25,538 mg/mL, MBK 50,183 mg/mL). Sličnu aktivnost je pokazao sekret vrste *A. (A.) parallelepipedus*, međutim, inhibitorni i baktericidni efekti su postignuti na nižim koncentracijama. Kada je u pitanju sekret vrste *C. (C.) intricatus*, uočava se potpuna rezistentnost bakterijskih sojeva *B. cereus*, *E. coli* i *P. aeruginosa*, dok je na preostale testirane sojeve pokazao umeren antibakterijski efekat (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017b). Komercijalni antibiotici streptomycin i ampicilin pokazali su inhibitornu aktivnost u opsegu 0,0004-0,01 mg/mL i baktericidnu aktivnost u opsegu 0,0003-0,03 mg/mL.

Tabela 5. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) sekreta pigidijalnih žlezda vrsta *C. (E.) ullrichii*, *C. (P.) coriaceus*, *C. (C.) intricatus*, *A. (A.) parallelepipedus*, *C. (C.) sycophanta* i *L. (P.) punctatus*, poređene sa antibioticima streptomycinom i ampicilinom.

	PGS <i>C. ullrichii</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE	PGS <i>C. coriaceus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE	PGS <i>C. intricatus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE	PGS <i>A. parallelepipedus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE	PGS <i>C. sycophanta</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE	PGS <i>L. punctatus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE	Streptomycin (mg/mL) MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE	Ampicilin (mg/mL) MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE
<i>B. cereus</i>	103,954±0,012 ^d	25,545±0,013 ^c	0,000±0,013 ^a	3,052±0,013 ^b	0,000±0,013 ^a	0,022±0,013 ^a	0,0004±0,013 ^a	0,0002±0,013 ^a
	207,963±0,029 ^d	50,100±0,029 ^c	0,000±0,029 ^a	6,200±0,029 ^b	0,000±0,029 ^a	0,045±0,037 ^a	0,001±0,029 ^a	0,0003±0,029 ^a
<i>M. flavus</i>	103,98±0,002 ^c	0,000±0,002 ^a	0,602±0,002 ^b	0,000±0,002 ^a	0,000±0,002 ^a	0,044±0,002 ^a	0,0003±0,002 ^a	0,0004±0,002 ^a
	207,943±0,040 ^c	0,000±0,000 ^a	1,205±0,008 ^b	0,000±0,008 ^b	0,000±0,008 ^a	0,045±0,008 ^a	0,001±0,008 ^a	0,001±0,008 ^a

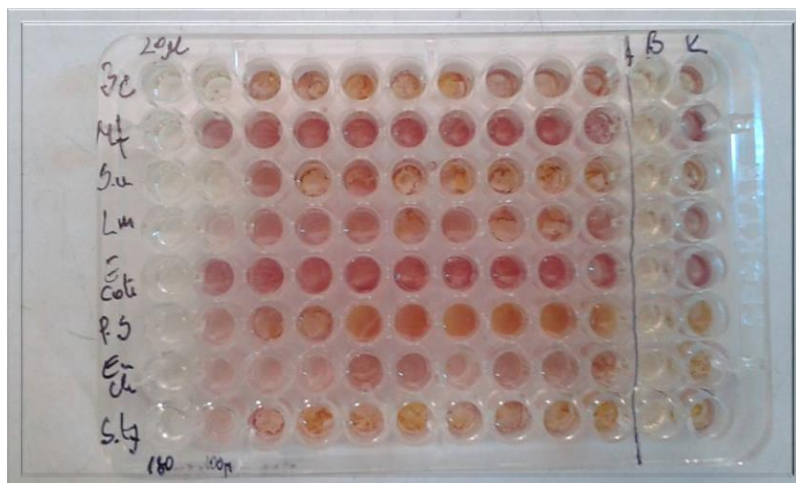
Nastavak Tabele 5.

<i>S. aureus</i>	51,986±0,001 ^c	0,000±0,002 ^a	0,602±0,002 ^b	0,000±0,001 ^a	0,000±0,001 ^a	0,022±0,001 ^a	0,0004±0,002 ^a	0,0002±0,002 ^a
	103,975±0,003 ^c	0,000±0,003 ^a	1,203±0,003 ^b	0,000±0,003 ^a	0,000±0,003 ^a	0,045±0,003 ^a	0,001±0,003 ^a	0,0004±0,003 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	51,986±0,002 ^d	0,000±0,002 ^a	0,602±0,002 ^c	0,000±0,002 ^a	0,000±0,002 ^a	0,022±0,002 ^a	0,016±0,002 ^b	0,0002±0,002 ^a
	103,975±0,002 ^d	0,000±0,002 ^a	1,205±0,002 ^c	0,000±0,002 ^a	0,000±0,002 ^a	0,045±0,002 ^a	0,032±0,002 ^b	0,0003±0,002 ^a
<i>E. coli</i>	103,984±0,003 ^c	0,000±0,003 ^a	0,000±0,003 ^a	0,000±0,003 ^a	0,024±0,003 ^b	0,037±0,003 ^a	0,0004±0,003 ^a	0,0001±0,003 ^a
	207,947±0,009 ^b	0,000±0,009 ^a	0,000±0,009 ^a	0,000±0,009 ^a	0,048±0,009 ^a	0,045±0,009 ^a	0,0008±0,009 ^a	0,0003±0,009 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	103,983±0,009 ^d	25,538±0,009 ^c	0,000±0,009 ^a	1,534±0,009 ^b	0,00±0,009 ^a	0,022±0,009 ^a	0,0004±0,009 ^a	0,0002±0,009 ^a
	207,94±0,018 ^d	50,183±0,018 ^c	0,000±0,017 ^a	3,037±0,017 ^b	0,00±0,018 ^a	0,045±0,018 ^a	0,0008±0,017 ^a	0,0003±0,017 ^a

Nastavak Tabele 5.

<i>E. cloacae</i>	103,977±0,0005 ^c	0,000±0,001 ^a	0,301±0,0004 ^d	0,000±0,001 ^a	0,000±0,0004 ^a	0,022±0,0004 ^b	0,016±0,0004 ^c	0,0002±0,0004 ^a
	207,953±0,007 ^d	0,000±0,007 ^a	0,603±0,007 ^c	0,000±0,007 ^a	0,000±0,007 ^a	0,045±0,007 ^a	0,032±0,007 ^b	0,0004±0,007 ^a
<i>S. typhimurium</i>	103,983±0,003 ^c	0,000±0,003 ^a	0,302±0,003 ^b	0,000±0,003 ^a	0,000±0,003 ^a	0,022±0,003 ^a	0,0004±0,003 ^a	0,0004±0,003 ^a
	207,940±0,002 ^c	0,000±0,002 ^a	0,604±0,002 ^b	0,000±0,007 ^a	0,000±0,007 ^a	0,045±0,002 ^a	0,001±0,002 ^a	0,001±0,002 ^a

PGS - sekret pigidijalnih žlezda; SV - srednja vrednost; SE - standardna greška; ^{a, b, c, d} - stepen statističke značajnosti (p<0,05)



Slika 11. Izgled mikrodilucione ploče, 96 sistem. Antibakterijska aktivnost: bunarčići obojeni crveno označavaju rast bakterija, a bunarčići obojeni žuto označavaju odsustvo rasta bakterija.

4.1.3. Antifungalni efekat na humane patogene

Primenom mikrodilucione metode (**Slika 12**), utvrđene su MIK i MBK koncentracije 5% DMSO vodenog rastvora sekreta pigidijalnih žlezda, što je predstavljeno u **Tabeli 6**.

Veoma dobar antifungalni efekat u poređenju sa svim testiranim uzorcima je postignut nakon tretmana mikromiceta sekretom vrste *L. (P.) punctatus*, koji se i do 5 puta pokazao efikasnijim od pozitivne kontrole, komercijalnog antimikotika bifonazola. Testirani sekret je postigao 20-50 puta jači efekat (MIK 0,022 mg/mL, MFK 0,044 mg/mL) u poređenju sa komercijalnim antimikotikom ketokonazolom. Posebno je zanimljivo da je pri testiranju mikromicete *P. ochrochloron*, antifungalni potencijal ovog sekreta bio aproksimalno između 150-200 puta veći (MIK 0,012 mg/mL, MFK 0,022 mg/mL) u odnosu na pozitivne kontrole (MIK 2,503 mg/mL, MFK 3,467 mg/mL).

Sekret vrste *C. (C.) sycophanta* je pokazao približno isti antifungalni efekat u poređenju sa prethodno pomenutim sekretom, međutim, mikromicete *P. ochrochloron* i *P. verrucosum* var. *cyclopium* su pokazale veću senzibilnost u odnosu na sekret *L. (P.) punctatus*. Slični rezultati su dobijeni nakon testiranja sekreta *C. (C.) intricatus* i to na mikromicete *Aspergillus ochraceus*, *Trichoderma viride* i *P. ochrochloron*, pri čemu je ketokonazol imao slabije dejstvo (**Tabela 6**). Sve testirane mikromicete su pokazale značajan stepen rezistencije na sekret vrste *C. (E.) ullrichii*, gde su uočene visoke MIK i MFK vrednosti. Potpuna rezistencija je zabeležena nakon tretmana mikromiceta *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* i *P. verrucosum* var. *cyclopium*, sekretima vrsta *C. (P.) coriaceus* i *A. (A.) parallelepipedus*. *Trichoderma viride* je bila potpuno rezistentna nakon primene sekreta vrste *C. (P.) coriaceus* (**Tabela 6**) (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017b).

Tabela 6. Minimalna inhibitorna (MIK) i minimalna fungicidna koncentracija (MFK) sekreta pigidijalnih žlezda *C. (E.) ulrichii*, *C. (P.) coriaceus*, *C. (C.) intricatus*, *A. (A.) parallelepipedus*, *C. (C.) sycophanta* i *L. (P.) punctatus*, poređena sa antimikoticima ketokonazolom i bifonazolom.

	PGS <i>C. ulrichii</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE	PGS <i>C. coriaceus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE	PGS <i>C. intricatus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE	PGS <i>A. parallelepipedus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE	PGS <i>C. sycophanta</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE	PGS <i>L. punctatus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE	Streptomicin (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE	Ampicilin (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE
<i>A. flavus</i>	51,992±0,061 ^f 103,942±0,017 ^g	25,517±0,061 ^e 50,150±0,016 ^f	0,602±0,061 ^c 1,203±0,016 ^d	3,207±0,061 ^d 6,150±0,016 ^e	0,022±0,061 ^{ab} 0,046±0,017 ^a	0,022±0,061 ^a 0,044±0,017 ^a	0,153±0,061 ^a 0,211±0,016 ^b	0,202±0,061 ^b 0,504±0,016 ^c
<i>A. versicolor</i>	25,992±0,059 ^f 51,995±0,013 ^g	25,518±0,059 ^e 50,117±0,013 ^f	0,317±0,059 ^c 0,603±0,013 ^d	3,218±0,059 ^d 6,147±0,013 ^e	0,012±0,059 ^a 0,023±0,013 ^a	0,022±0,060 ^a 0,044±0,013 ^a	0,123±0,060 ^{ab} 0,208±0,013 ^b	0,201±0,059 ^b 0,504±0,013 ^c

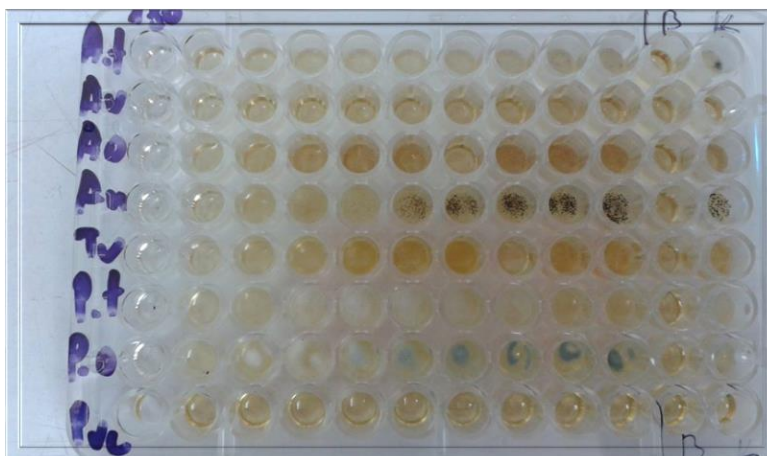
Nastavak Tabele 6.

<i>A. ochraceus</i>	25,992±0,061 ^f	25,525±0,061 ^e	0,603±0,060 ^b	3,207±0,060 ^d	0,023±0,061 ^a	0,022±0,061 ^a	0,151±0,060 ^a	1,503±0,060 ^c
	51,995±0,019 ^g	50,137±0,019 ^f	1,204±0,018 ^d	6,173±0,018 ^e	0,044±0,019 ^a	0,044±0,019 ^a	0,208±0,018 ^b	2,033±0,018 ^c
<i>A. niger</i>	51,975±0,005 ^f	0,000±0,004 ^a	0,602±0,004 ^e	0,000±0,005 ^a	0,023±0,004 ^b	0,022±0,004 ^a	0,153±0,005 ^c	0,201±0,005 ^d
	103,968±0,004 ^f	0,000±0,003 ^a	1,204±0,003 ^e	0,000±0,004 ^a	0,045±0,003 ^b	0,044±0,003 ^a	0,211±0,004 ^c	0,504±0,004 ^d
<i>T. viride</i>	25,994±0,057 ^e	0,000±0,057 ^a	0,334±0,057 ^b	3,197±0,058 ^d	0,023±0,057 ^a	0,022±0,058 ^a	0,152±0,057 ^a	1,002±0,058 ^c
	51,994±0,014 ^g	0,000±0,014 ^a	0,603±0,014 ^d	6,149±0,014 ^f	0,047±0,014 ^b	0,044±0,014 ^{a,b}	0,220±0,014 ^c	1,001±0,014 ^e
<i>P. funiculosum</i>	12,965±0,012 ^d	0,000±0,011 ^a	0,606±0,012 ^c	0,000±0,012 ^a	0,024±0,011 ^a	0,022±0,011 ^a	0,201±0,012 ^b	0,202±0,011 ^b
	25,996±0,002 ^f	0,000±0,001 ^a	1,204±0,002 ^e	0,000±0,002 ^a	0,045±0,001 ^b	0,044±0,001 ^a	0,252±0,001 ^c	0,503±0,001 ^d

Nastavak Tabele 6.

<i>P. ochrochloron</i>	207,935±0,008 ^g	25,525±0,008 ^f	0,153±0,009 ^b	3,042±0,008 ^e	0,023±0,008 ^a	0,012±0,009 ^a	0,202±0,008 ^c	2,503±0,008 ^d
	415,907±0,015 ^g	50,117±0,014 ^f	0,302±0,015 ^c	6,114±0,014 ^e	0,046±0,014 ^a	0,022±0,015 ^a	0,234±0,014 ^b	3,467±0,014 ^d
<i>P. verrucosum</i>	207,934±0,006 ^f	0,000±0,006 ^a	0,301±0,006 ^e	0,000±0,006 ^a	0,023±0,006 ^b	0,012±0,007 ^a	0,115±0,007 ^c	0,202±0,007 ^d
var. <i>cyclopium</i>	415,901±0,005 ^f	0,000±0,005 ^a	0,602±0,005 ^e	0,000±0,005 ^a	0,046±0,005 ^b	0,022±0,005 ^a	0,220±0,005 ^c	0,300±0,005 ^d

PGS - sekret pigidijalnih žlezda; SV - srednja vrednost; SE - standardna greška; ^{a, b, c, d} - stepen statističke značajnosti (p<0,05)



Slika 12. Izgled mikrodilucione ploče, 96 sistem. Antifunglana aktivnost: bunarčići sa sadržajem označavaju rast mikromiceta, a prazni (prozirni) odsustvo rasta mikromiceta.

4.2. Antimikrobna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828) na bakterije i mikromicete izolovane iz pećinskog staništa

U našoj paralelnoj zajedničkoj nezavisnoj studiji (Kabić, 2016) je urađen i analiziran mikrobijski diverzitet guana koji je predstavljen u vidu filogenetskog stabla u *Prilogu iia i iib i Prilogu iii*. Na osnovu ove studije je ustanovljeno da su određene vrste bakterija i gljiva iz guana prisutne u svim prostorijama Ogoreličke pećine. Prethodno pomenuti izolati su označeni kao dominantni, zbog čega su selektivno odabrani kako bi bili testirani u sklopu antimikrobne studije u ovoj doktorskoj tezi.

Antimikrobna aktivnost 5% DMSO vodenog ekstrakta sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* testirana je metodom mikrodilucije na 12 odabranih bakterijskih sojeva i 4 vrste mikromiceta izolovanih iz guana, kao i na pet vrsta mikromiceta izolovanih sa zida pećine.

Antimikrobni potencijal sekreta pigidijalnih žlezda ove vrste na pečinske mikromicete i guanofilne bakterije i mikromicete je po prvi put testiran u ovoj studiji.

4.2.1. Ukupna koncentracija izolovanog sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus*

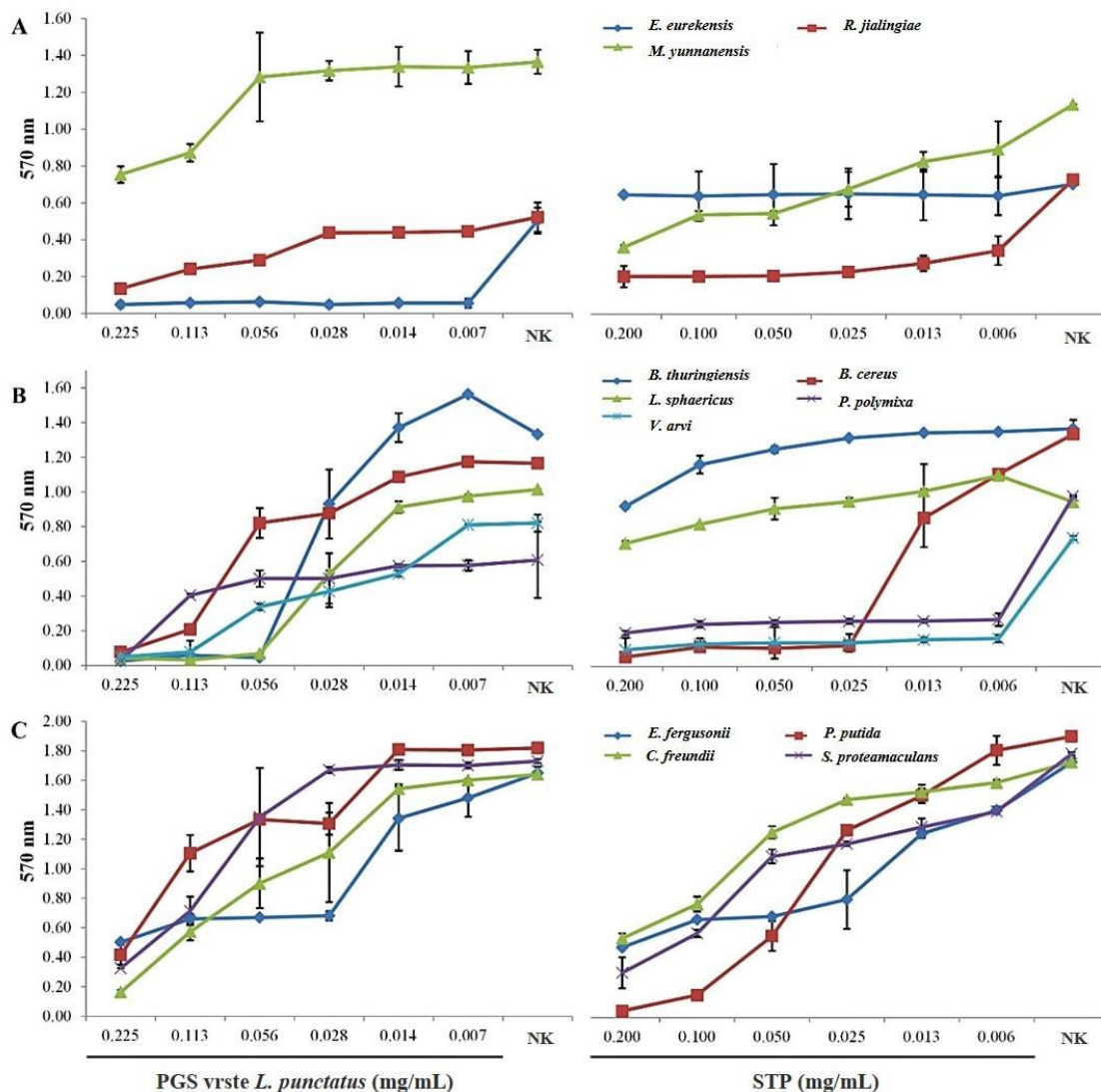
U svrsi dobijanja koncentracije sekreta, svi testirani uzorci sekreta vrste *L. (P.) punctatus* su podvrgnuti identičnom protokolu radi dalje upotrebe u antimikrobnoj studiji.

Pri antimikrobnoj studiji u kojoj su testirani izolati iz guana, totalna masa je dobijena iz 41 jedinice ($0,189 \pm 0,001$ mg). Dobijena koncentracija je predstavljena u 3000 μ L rastvarača za konzerviranje uzoraka (koncentrovani metanol) i iznosila je 0,063 mg/mL.

U antifungalnoj studiji u kojoj su testirane mikromicete sa zidova pećine, dobijena je totalna masa iz 30 jedinki ove vrste ($0,068 \pm 0,001$ mg). Dobijena koncentracija je predstavljena u 3000 μ L rastvarača (5% DMSO), i iznosila je 0,022 mg/mL (Nenadić et al., 2017a).

4.2.2. Antibakterijska aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* na bakterijske sojeve izolovane iz guana u Ogoreličkoj pećini

Nakon testiranja sekreta vrste *L. (P.) punctatus* na odabrane bakterijske pečinske izolate, antibakterijska aktivnost je potvrđena spektrometrijski, što je predstavljeno na Slici 13.



Slika 13. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti testiranog sekreta *L. (P.) punctatus* spektrofotometrijskom metodom. Jedinice su izražene u mg/mL, uz prikazivanje standardne devijacije za svaku tačku uzorkovanja. PGS - sekret pigidijalnih žlezda; STP - streptomycin; NK - negativna kontrola (rast bakterija bez testirane supstance).

Takođe, kao krajnja potvrda spektrofotometrijskog očitavanja je bilo očitavanje MIK i MBK vrednosti korišćenjem rezazurinske reakcije, čiji su rezultati prikazani u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Antibakterijska aktivnost, izražena u MIK i MBK vrednostima, dobijenih nakon tretiranja selektovanih pečinskih izolata sekretom pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* i antibiotika streptomicina.

Bakterijski sojevi	PGS <i>L. punctatus</i> (mg/mL)	Streptomicin (mg/mL)
	MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE	MIK(SV)±SE MBK(SV)±SE
<i>Enterococcus eurekaensis</i> 29.3	0,007±0,002 ^a 0,113±0,0002 ^b	>0,200±0,002 ^b 0,000±0,0002 ^a
<i>Rhodococcus jialingiae</i> O26.1	0,056±0,002 ^b 0,113±0,0003 ^a	0,050±0,002 ^a 0,200±0,0003 ^b
<i>Micrococcus yunnanensis</i> T5.3	0,113±0,0003 ^a 0,225±0,0002 ^b	0,200±0,0003 ^b 0,000±0,0002 ^a
<i>Bacillus thuringiensis</i> 26.2	0,056±0,002 ^a 0,225±0,0002 ^b	> 0,200±0,002 ^b 0,000±0,0002 ^a
<i>Bacillus cereus</i> 30.1	0,225±0,0003 ^b 0,000±0,0004 ^a	0,025±0,0003 ^a 0,200±0,0004 ^b
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> O4.3	0,056±0,002 ^a 0,113±0,0002 ^b	> 0,200±0,002 ^b 0,000±0,0002 ^a
<i>Paenibacillus polymyxa</i> T21.1	0,225±0,001 ^b 0,000±0,0002 ^a	0,013±0,001 ^a 0,025±0,0002 ^b
<i>Viridibacillus arvi</i> T26.2	0,113±0,0003 ^b 0,225±0,0003 ^b	0,006±0,0003 ^a 0,013±0,0003 ^a
<i>Escherichia fergusonii</i> O29.1	0,028±0,0003 ^a 0,225±0,0003 ^b	0,050±0,0003 ^b 0,200±0,0003 ^a
<i>Pseudomonas putida</i> 11.1	0,225±0,0005 ^b 0,000±0,0002 ^b	0,200±0,0005 ^a 0,000±0,0002 ^b
<i>Citrobacter freundii</i> O11.3	0,225±0,0003 ^b -	> 0,200±0,0003 ^a -
<i>Serratia proteamaculans</i> O11.1	0,225±0,001 ^b -	0,200±0,001 ^a -

PGS - sekret pigidijalnih žlezda; SV - srednja vrednost; SE - standardna greška; ^a, ^b - stepen statističke značajnosti (p<0,05)

Kao najosetljiviji izolat ovog testiranja pokazao se *E. eurekensis*, sa najnižom zabeleženom MIK vrednošću od 0,007 mg/mL, uz istovremenu rezistentnost prema antibiotiku streptomycinu pri najvišoj testiranoj koncentraciji. Interesantno je da je od svih testiranih Gram-negativnih izolata, *E. fergusonii* pokazala izraženu osetljivost prema sekretu. Slični rezultati su zabeleženi i kod sojeva *M. yunnanensis*, *B. thuringiensis* i *L. sphaericus*, gde se primećuje da su MIK vrednosti streptomicina bile veće u odnosu na MIK vrednosti sekreta.

4.2.3. Antifungalna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* na mikromicete izolovane iz Ogoreličke pećine

4.2.3.1. Selektivno identifikovani izolati mikromiceta sa zidova pećine

Tabelarno su predstavljene selektivno identifikovane i determinisane vrste koje su izolovane sa delova zidova Ogoreličke pećine, blizu samog tla, koji je u neposrednom kontaktu sa guanom (**Tabela 8**). Od ukupno 11 uzoraka, izolovana su 32 različita morfotipa, uključujući filamentozne micete i kvasce. Većina dokumentovanih gljiva su pripadnici podrazdela Ascomycotina. U okviru podrazdela Zygomycotina je identifikovana samo jedna vrsta – *Rhizopus stolonifer*. Na specijskom nivou je identifikovano pet brzorastućih i visokosporulišućih filamentoznih gljiva, čije su sporangiospore, konidije ili askosopore malih dimenzija. Sledeće vrste su odabrane za testiranje antifungalnog potencijala sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* u ovoj studiji: *Aspergillus brunneouniseriatus*, *Penicillium* sp., *R. stolonifer*, *Talaromyces duclauxii* i *Trichoderma viride* (Nenadić et al., 2017a).

Tabela 8. Lista filamentoznih mikromiceta izolovanih sa zidova Ogoreliške pećine.

Izolati mikromiceta	Identifikacioni ključevi
Zygomycotina	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Samson et al. (2010)
Ascomycotina	
<i>Alternaria alternata</i>	Woudenberg et al. (2013)
<i>Arthrimum phaeospermum</i>	Ellis & Ellis (1997)
<i>Aspergillus brunneouniseriatus</i>	Raper & Fennell (1965)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Samson et al. (2010)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Bensch et al. (2012)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Bensch et al. (2012)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Samson et al. (2010)
<i>Fusarium sp.</i>	Samson et al. (2010)
<i>Penicillium sp.</i> ^{*3}	Pitt (1979), Samson et al. (2010)
<i>Talaromyces duclauxii</i>	Pitt (1979), Samson et al. (2010)
<i>Trichoderma viride</i>	Samson et al. (2010)

* - broj morfotipova

4.2.3.2. Antifungalna aktivnost sekreta vrste *L. (P.) punctatus*

4.2.3.2.1. Antifungalni efekat sekreta na mikromicete izolovane sa zidova pećine

Primenom mikrodilucione metode, utvrđeno je da sekret pigidijalnih žlezda ispitivane troglofilne vrste ostvaruje antifungalno dejstvo na sve ispitane odabrane izolate pećinskih mikromiceta (**Tabela 9**). Niži antifungalni efekat (MIK 2,2 mg/mL, MFK 4,5 mg/mL) je postignut kod većine testiranih izolata (*T. duclauxii*, *A. brunneouniseriatus*, *R. stolonifer*, *T. viride*), dok je kod izolata *Penicillium sp.* zabeležena nešto veća antifungalna aktivnost, čime se ova vrsta pokazala kao manje rezistentna na sekret ispitivane vrste trčuljka (MIK 0,5 mg/mL, MFK 1,1 mg/mL) (Nenadić et al., 2017a).

Tabela 9. Antifungalna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* na odabrane izolate pečinskih mikromiceta.

Izolati pečinskih mikromiceta	PGS	Ketokonazol*	Bifonazol*
	<i>L. punctatus</i>	(mg/mL)	(mg/mL)
	(mg/mL)	MIK(SV)±SE	MIK(SV)±SE
	MIK(SV)±SE	MFK(SV)±SE	MFK(SV)±SE
	MFK(SV)±SE		
<i>Rhizopus stolonifer</i>	2,2±0,058	0,000±0,000	0,000±0,000
	4,5±0,088	0,000±0,000	0,000±0,000
<i>Talaromyces duclauxii</i>	2,2±0,067	0,000±0,000	0,000±0,000
	4,5±0,167	0,000±0,000	0,000±0,000
<i>Penicillium sp.</i>	0,5±0,029	0,000±0,000	0,000±0,000
	1,1±0,058	0,000±0,000	0,000±0,000
<i>Trichoderma viride</i>	2,2±0,009	0,000±0,000	0,000±0,000
	4,5±0,145	0,000±0,000	0,000±0,000
<i>Aspergillus brunneouniseriatus</i>	2,2±0,076	0,000±0,000	0,000±0,000
	4,5±0,033	0,000±0,000	0,000±0,000

PGS - sekret pigidijalnih žlezda; SV - srednja vrednost; SE - standardna greška; * - poređenje sa komercijalnim antimikoticima nije moglo da se realizuje jer nije zabeleženo dejstvo istih u odnosu na testirane pečinske izolate

4.2.3.2.2. Antifungalni efekat sekreta na mikromicete izolovane iz guana

U slučaju testiranja antifungalne aktivnosti sekreta vrste *L. (P.) punctatus* na mikromicete izolovane iz guana, svi ispitani izolati su pokazali određen stepen senzibilnosti u odnosu na testirani uzorak sekreta. Pozitivna kontrola, nistatin, pokazala je veći stepen antifungalne aktivnosti u odnosu na sekret, kada su u pitanju mikromicete *M. guilliermondii*, *A. flavus*, međutim, izolati *P. citrinum* i *T. harzianum* su pokazali veću rezistentnost na nistatin (**Tabela 10**).

Tabela 10. Antifungalna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* na odabrane izolate pečinskih mikromiceta.

Mikromicete izolovane iz guana	PGS <i>L. punctatus</i> (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE	Nistatin (mg/mL) MIK(SV)±SE MFK(SV)±SE
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> G13-4	0,154±0,002 ^b 0,303±0,002 ^b	0,051±0,002 ^a 0,050±0,002 ^a
<i>Aspergillus flavus</i> G3-1	0,147±0,003 ^b 0,304±0,002 ^b	0,050±0,003 ^a 0,252±0,002 ^a
<i>Penicillium citrinum</i> G5-1	0,303±0,003 ^a 0,600±0,002 ^a	0,503±0,003 ^b 1,003±0,002 ^b
<i>Trichoderma harzianum</i> G3-2	0,152±0,002 ^a 0,303±0,005 ^a	0,252±0,002 ^b 0,757±0,005 ^b

PGS - sekret pigidijalnih žlezda; SV - srednja vrednost; SE - standardna greška

4.3. Citotoksični potencijal sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka

U citotoksičnom eseju su testirani sekreti 4 odabrane vrste trčuljaka: *C. (E.) ullrichii*, *C. (P.) coriaceus*, *A. (A.) parallelepipedus* i *L. (P.) punctatus*. U cilju ispitivanja citotoksičnog potencijala testiranih sekreta primenjen je sulfordamin B esej i dobijene su procenti inhibicije ukupne proliferacije ćelija. Citotoksični esej je primenjen na primarne netumorske ćelijske kulture (PLP- primarna ćelijska kultura hepatocita). Pored navedenog, istom metodom, ispitan je i antitumorski efekat, odnosno inhibicija proliferacije sledećih humanih tumorskih ćelijskih linija: NCI-H460 - nesitnoćelijski karcinom pluća, HeLa - cervikalni karcinom, MCF7 - adenokarcinom dojke i HepG2 - hepatocelularni karcinom. Postignute GI₅₀ vrednosti su ukazale na značajan nivo inhibicije proliferacije tumorskih ćelija od strane pozitivne kontrole, komercijalnog antikancerogenog medikamenta elipticina. Primenjene su sledeće polazne koncentracije sekreta: *C. (E.) ullrichii* – 21 µg/mL, *C. (P.) coriaceus* – 2,5 µg/mL, *A. (A.) parallelepipedus* – 0,3 µg/mL, *L. (P.) punctatus* – 0,1 µg/mL. Nakon primene pozitivne kontrole, u svim slučajevima su postignute GI₅₀ vrednosti. U slučaju testiranja sekreta, uviđa se da je inhibicija proliferacije 50% ukupne ćelijske kulture najpribližnije postignuta kada je u pitanju sekret vrste *L. (P.) punctatus* (42,77%) u prisustvu najveće testirane koncentracije (0,1 µl/mL), i

to specifično na MCF7 ćelije. Procenat inhibicije proliferacije ostalih tumorskih ćelija nakon testiranja ovog sekreta je bio manji (**Tabela 11**). Kada su u pitanju sekreti pigidijalnih žlezda drugih testiranih vrsta, GI₅₀ vrednost nije postignuta. Primećuje se da je citotoksičnost na primarne ćelije hepatocita bila izuzetno niska u odnosu na pozitivnu kontrolu koja je dostigla 50% inhibicije rasta istih, što je značajan rezultat sa stanovišta daljih testiranja u sklopu antimikrobne studije (**Tabela 11**) (Nenadić et al., 2018).

Tabela 11. Inhibicija ukupne ćelijske proliferacije nakon primene najvećih koncentracija sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka, izraženo u procentima (%).

Ćelijske linije	PGS (%)±SE			
	<i>C. ullrichii</i>	<i>C. coriaceus</i>	<i>A. parallelepipedus</i>	<i>L. punctatus</i>
NCI-H460	4,24±0,52 ^c	4,37±0,62 ^c	34,01±2,17 ^a	17,02±0,96 ^b
HeLa	7,81±1,29 ^b	0,14±0,01 ^c	17,06±1,25 ^a	16,09±1,23 ^a
MCF7	20,14±1,87 ^c	36,56±4,11 ^b	31,53±2,85 ^b	42,77±3,56 ^a
HepG2	6,06±0,87 ^c	13,51±1,56 ^b	36,49±3,89 ^a	13,40±1,41 ^b
PLP2	1,61±0,21 ^c	11,16±0,98 ^b	1,26±0,27 ^c	14,72±0,86 ^a

PGS - sekret pigidijalnih žlezda; SE - standardna greška; NCI-H460 - nesitnoćelijski karcinom pluća; HeLa - cervikalni karcinom; MCF7 - adenokarcinom dojke; HepG2 - hepatocelularni karcinom; PLP2 - primarna ćelijska kultura hepatocita; a, b, c - nivoi statističke značajnosti (p<0,05) u komparaciji uzoraka sekreta. *GI₅₀ vrednosti za pozitivnu kontrolu elipticin (izraženo u µg/ml): NCI-H460: 1,03±0,09; HeLa: 0,91± 0,11; MCF7: 1,21±0,02; HepG2: 1,10±0,09; PLP2: 2,29±0,18

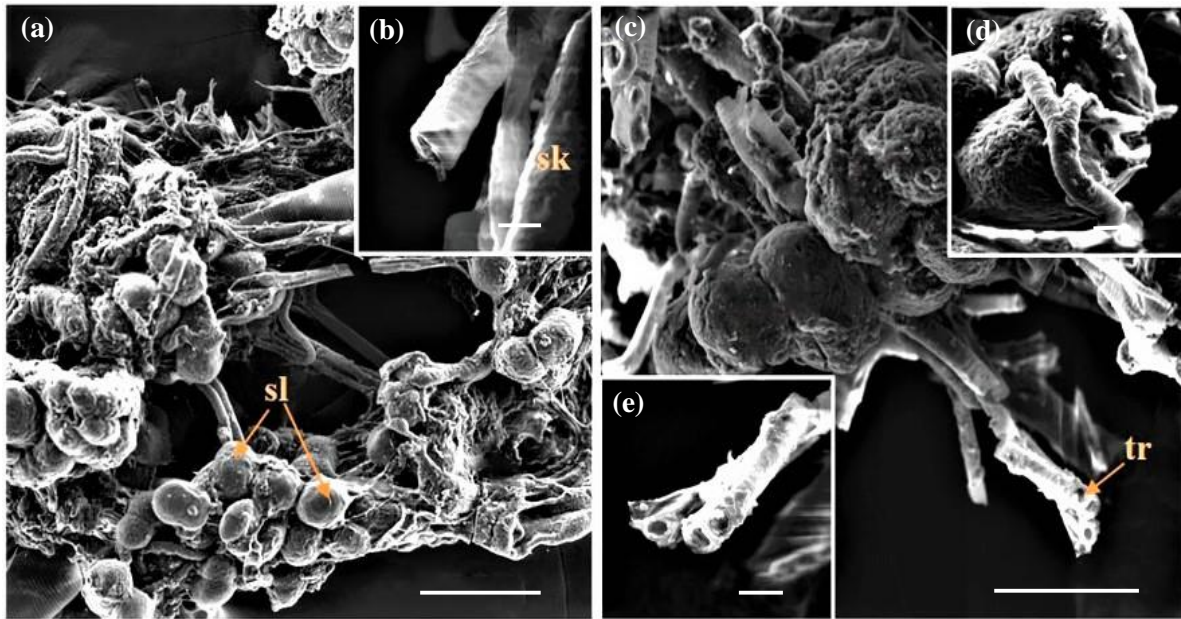
4.4. Morfo-anatomski aspekti pigidijalnog žlezdanog kompleksa odabranih vrsta trčuljaka; uvid u spoljašnju i unutrašnju morfologiju i anatomiju

Primenom SEM i TPEF modaliteta NLM postignut je po prvi put uvid u detaljnu strukturu pigidijalnog žlezdanog sistema odabranih vrsta trčuljaka, uključujući kako morfološki, tako i anatomski aspekt. Uz pomoć SEM su analizirane sledeće vrste: *A. (A.) parallelepipedus*, *C. (P.) coriaceus* i *L. (P.) punctatus*. TPEF modalitetom NLM su ispitane sledeće vrste: *A. (A.) parallelepipedus*, *C. (T.) convexus*, *C. (P.) coriaceus*, *C. (E.) ullrichii* i *L. (P.) punctatus*. Ovaj deo studije je obavljen u laboratoriji Centra za fotoniku Univerziteta u Beogradu - Instituta za fiziku.

4.4.1. Primena SEM u analizi spoljašnje morfologije pigidijalnog žlezdanog sistema odabranih vrsta

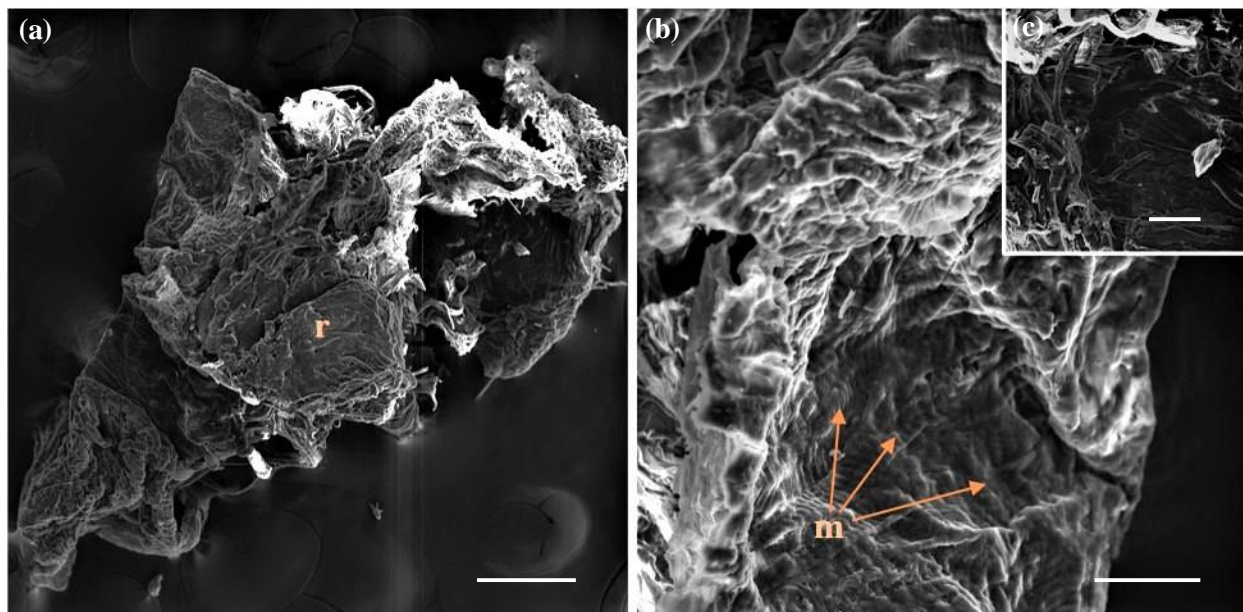
*4.4.1.1. Spoljašnji morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste *Abax (Abax parallelepipedus (Piller & Mitterpacher, 1783)**

Primenom SEM je omogućen detaljan uvid u morfološki aspekt i ultrastrukturu posmatranog pigidijalnog žlezdanog sistema *A. (A.) parallelepipedus*. Primećuje se kompleksan sistem sekretornih lobusa, koji se nastavljaju na veliki broj radijalno raspoređenih sabirnih kanala (**Slika 14a-c**). Sekretorni lobusi su sferičnog oblika i sa neregularnom strukturom na površini, prosečnog dijametra od oko 63,25 μm . Od njih polaze najsitniji radijalni sabirni kanali, koji se nastavljaju u krupnije sabirne kanale (**Slika 14d**). Sekretorni lobusi su raspoređeni u manje grupacije unutar žlezdanog sistema (pomoću SEM je zabeleženo prosečno oko 80 sekretornih lobusa u klasteru), koje su povezane sa radijalnim sabirnim kanalima većeg dijametra. Ovi sabirni kanali su glatke površine (**Slika 14a**). Dijametar radijalnih sabirnih kanala u proseku iznosi oko 16,78 μm . Može se uvideti da je ovaj sistem dobro aerisan s obzirom da je prožet brojnim traheolama (**Slika 14b**), prosečnog zabeleženog dijametra od 10,3 μm , koje sadrže spiralna zadebljanja i imaju tendenciju ka grananju u svim pravcima (**Slika 14e**).



Slika 14. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda vrste *A. (A.) parallelepipedus*. (a) Klaster sekretornih lobusa sa radijalnim sabirnim kanalima; (b) bliži prikaz radijalnih sabirnih kanala; (c) bliži prikaz pojedinačnih sekretornih lobusa, radijalnih sabirnih kanala i traheola; (d) mesto polaska radijalnih sabirnih kanala iz sekretornog lobusa; (e) traheole. Skale: 200 μm (a), 100 μm (c), 20 μm (d i e) i 10 μm (b). sl - sekretorni lobus; sk - sabirni kanal; tr - traheola.

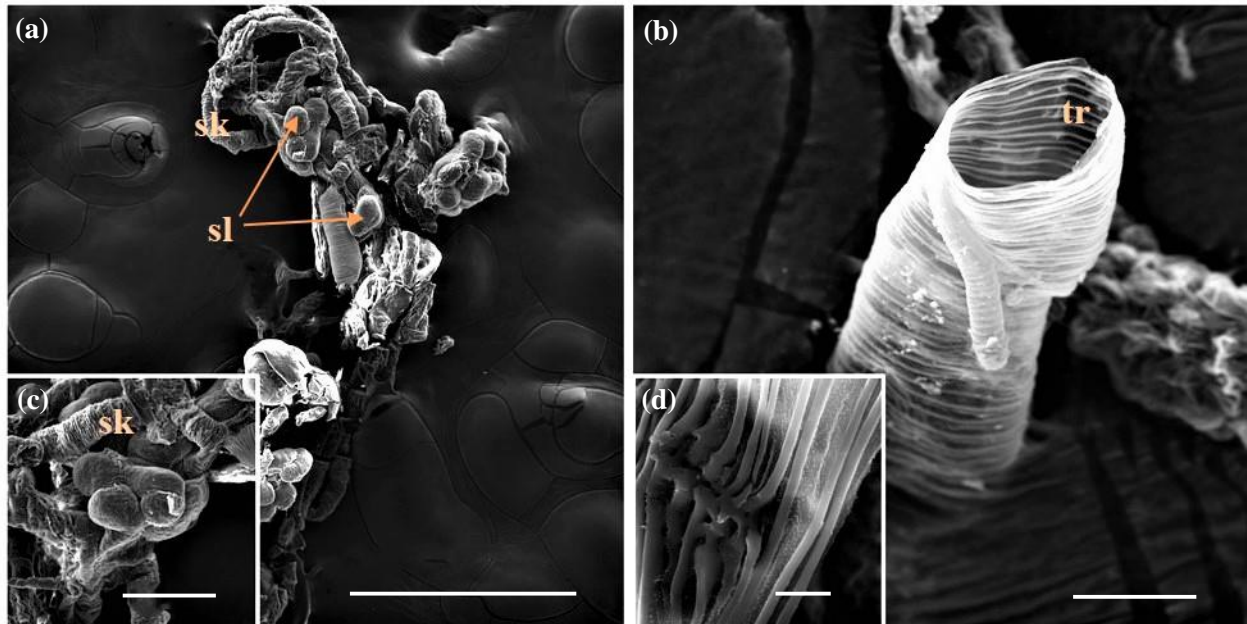
Prosečne dimenzije rezervoara pigidijalnih žlezda *A. (A.) parallelepipedus* iznose oko 1491,07 μm (dužina) i 891,67 μm (širina) (Slika 15a). Primećuje se nepravilna trougaona forma rezervoara, kao i vrlo osetljivo mišićno tkivo, sa izuzetno gusto raspoređenim, paralelno postavljenim i isprepletanim naizgled snopovima vlakana glatke muskulature, prosečne debljine od 8,33 μm , što daje neregularnu strukturu površini rezervoara (Slike 15b i 15c).



Slika 15. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda *A. (A.) parallelepipedus*. (a) Rezervoar; (b) mišićno tkivo rezervoara, sa finom strukturom paralelno raspoređenih snopova mišićnih vlakana; (c) bliži prikaz fine strukture mišićnih vlakana. Skale: 200 µm (a) i 50 µm (b i c). r - rezervoar; m - mišićna vlakna.

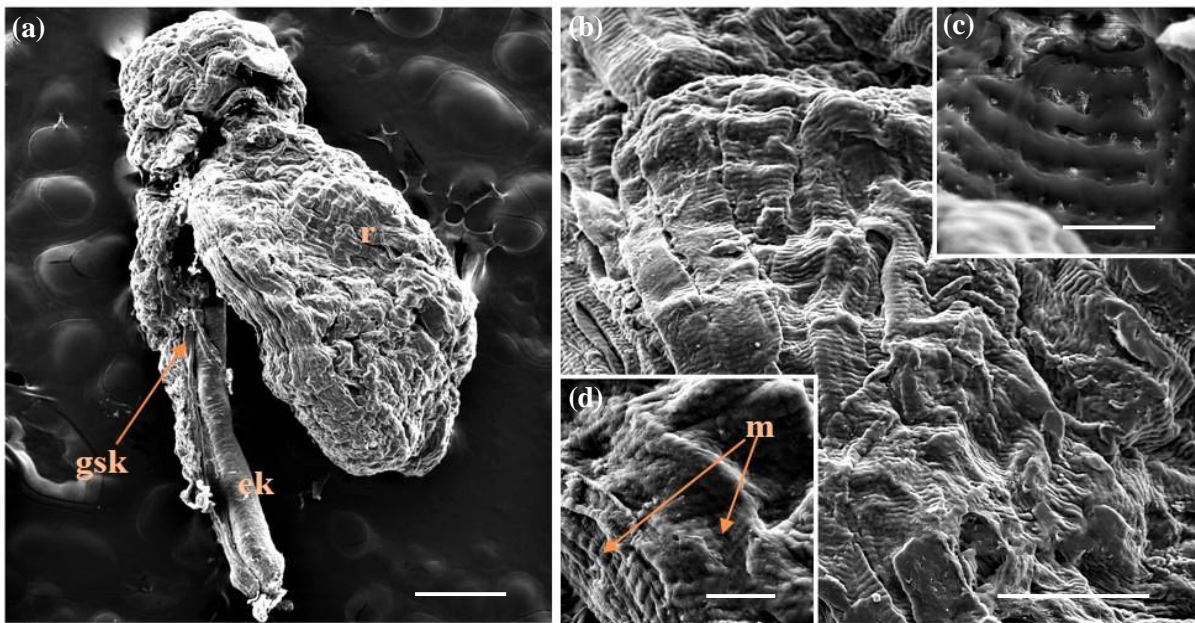
4.4.1.2. Spoljašnji morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste *Carabus (Procrustes) coriaceus* (Linnaeus, 1758)

Na SEM mikrografijama primećuje se jednostavan pigidijalni žlezdani sistem, koji se sastoji od manjeg broja (tridesetak jedinica) sferičnih i sferično-spljoštenih sekretornih lobusa prosečnog dijametra od oko 60 µm i sa neregularnom strukturom na površini. Lobusi su povezani sa malim brojem radijalno postavljenih naboranih sabirnih kanala (Slike 16a i 16c) varijabilnih dijametara. Dijametar radijalnih sabirnih kanala u proseku iznosi između 40 µm i 70 µm (Slika 16c). Na ultrastrukturnom nivou, na površini traheole (prosečnog dijametra 26,67 µm) se uočavaju specifične spiralne strukture u vidu grebena (Slika 16b i d).



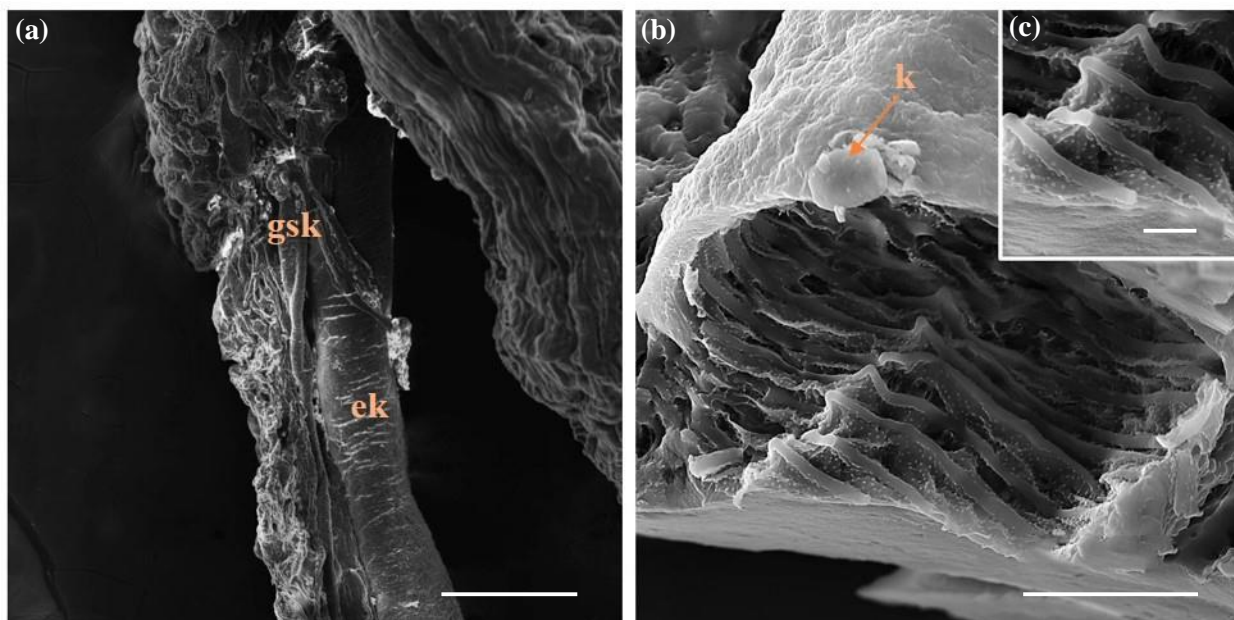
Slika 16. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda *C. (P.) coriaceus*. (a) Sistem sekretornih lobusa sa radijalnim sabirnim kanalima; (b) traheola; (c) bliži prikaz pojedinačnih sekretornih lobusa i radijalnih sabirnih kanala; (d) ultrastruktura traheole. Skale: 500 μm (a), 100 μm (b), 20 μm (c) i 5 μm (d). sl - sekretorni lobus; sk - sabirni kanal; tr - traheola.

Rezervoar pigidijalnih žlezda *C. (P.) coriaceus* ima specifičan, nepravilan pasuljast oblik (**Slika 17a**). Posедуje vrlo snažno mišićno tkivo (**Slika 17b**), sa izuzetno gustim raspoređenim paralelno postavljenim snopovima mišićnih vlakana, prosečne debljine od 20 μm , što daje neregularnu strukturu površini rezervoara (**Slike 17c i 17d**). Prosečne dimenzije rezervoara iznose 2924,24 μm (dužina) i 1876,43 μm (širina) (**Slika 17a**).



Slika 17. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda *C. (P.) coriaceus*. (a) Rezervoar sa glavnim sabirnim kanalom i eferentnim kanalom; (b) glatka muskulatura rezervoara sa finom strukturom paralelno raspoređenih snopova mišićnih vlakana; (c) uvećana struktura snopova mišićnih vlakana; (d) bliži prikaz muskulature. Skale: 500 μm (a), 100 μm (b), 20 μm (d) i 10 μm (c). gsk - glavni sabirni kanal; ek - eferentni kanal; r - rezervoar; m - mišićna vlakna.

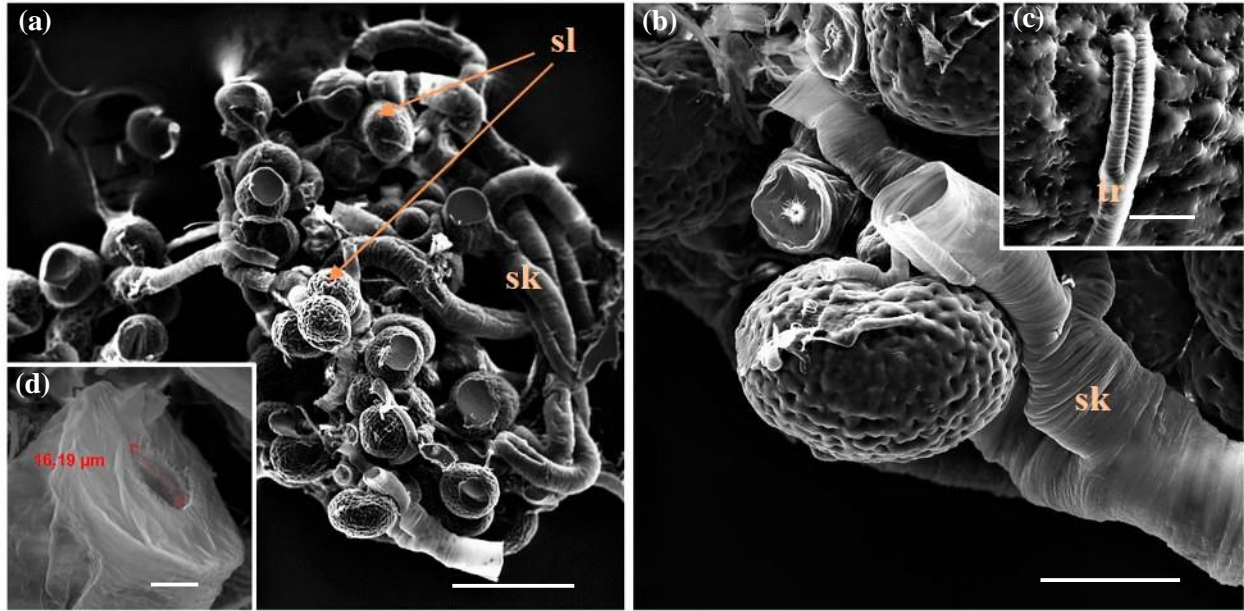
Pored navedenih struktura žlezda, na SEM mikrografijama uočava se i eferentni kanal prosečnog dijametra od oko 118 μm , glatke površine (Slike 18a i 18b) i specifične unutrašnje ultrastrukture, sa spiralnim grebenima (prosečne debljine od oko 0,68 μm), u okviru koje se primećuju kružna zadebljanja (Slika 18c). Uz eferentni kanal se pruža i glavni sabirni kanal (Slika 18a), užeg dijametra (20 μm), kod kojeg se naziru prstenaste, spiralne strukture, čija je funkcija održavanje konzistentnosti kanala i sprečavanje spljoštavanja istog prilikom pražnjenja (Slika 18a).



Slika 18. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda *C. (P.) coriaceus*. (a) Glavni sabirni kanal i eferentni kanal; (b) bliži prikaz glavnog sabirnog kanala; (c) unutrašnja ultrastruktura glavnog sabirnog kanala. Skale: 200 μm (a), 10 μm (b) i 2 μm (c). gsk - glavni sabirni kanal; ek - eferentni kanal; k - kružna zadebljanja na zidu eferentnog kanala.

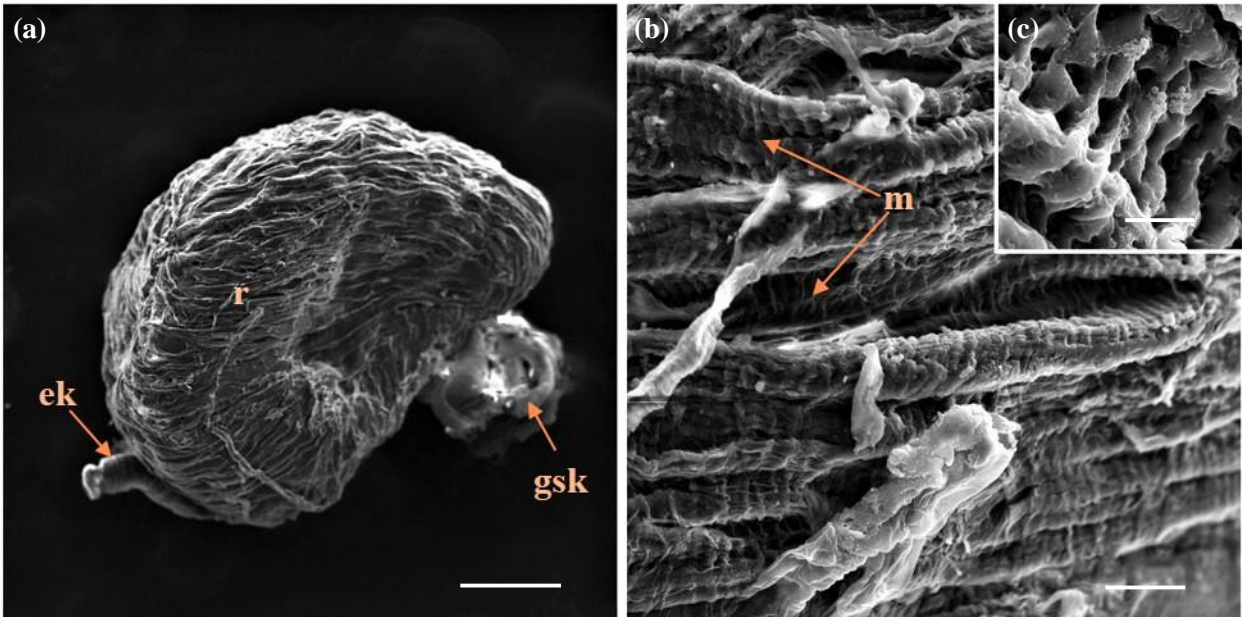
4.4.1.3. Spoljašnji morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828)

Na SEM mikrografijama pigidijalnih struktura ove vrste se može uočiti znatan broj sekretornih lobusa (između 50 i 60 jedinica) sferične forme i varijabilnih dijametara (prosečan dijametar 156 μm) (Slika 19a). Lobusi perforirane površine povezani su sa radijalnim sabirnim kanalima (Slika 19c), čiji prečnik se kreće od 5-55 μm . Na slučajno dobijenom poprečnom preseku radijalnog sabirnog kanala, nastalom neplaniranim oštećenjem tkiva, uočava se dijametar lumena, koji iznosi oko 16,19 μm (Slika 19d).



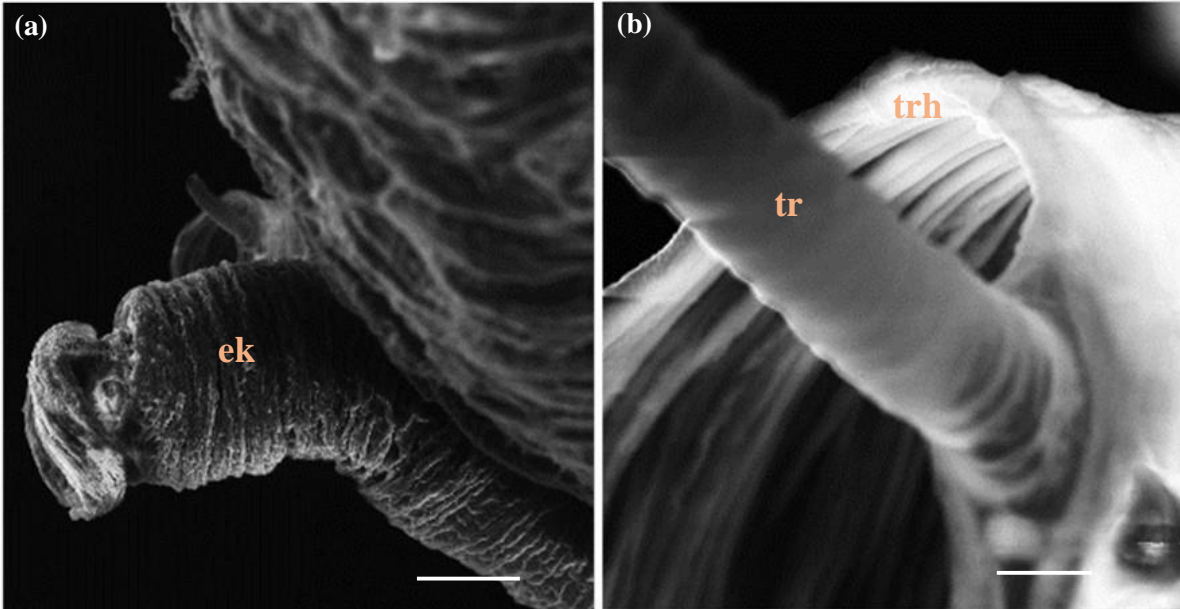
Slika 19. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda *L. (P.) punctatus*. (a) Sistem sekretornih lobusa i radijalnih sabirnih kanala; (b) sekretorni lobus sa traheolama; (c) mesto izlivanja traheola iz pojedinačnog sekretornog lobusa; (d) poprečni presek radijalnog sabirnog kanala. Skale: 200 μm (a), 50 μm (b) i 10 μm (c i d). sl - sekretorni lobus; sk - sabirni kanal; tr - traheola.

Rezervoar pigidijalnih žlezda *L. (P.) punctatus* se sastoji od snažnog mišićnog zida, prečnika je od oko 1080 μm (dužina 1000 μm i širina 800 μm) i ima reniformni oblik (Slika 20a). Na površini mišićnog tkiva se uočavaju gusto raspoređeni snopovi mišićnih vlakana, paralelno postavljenih, čija debljina prosečno iznosi oko 20 μm (Slike 20b i 20c), što daje neregularnu strukturu površini rezervoara.

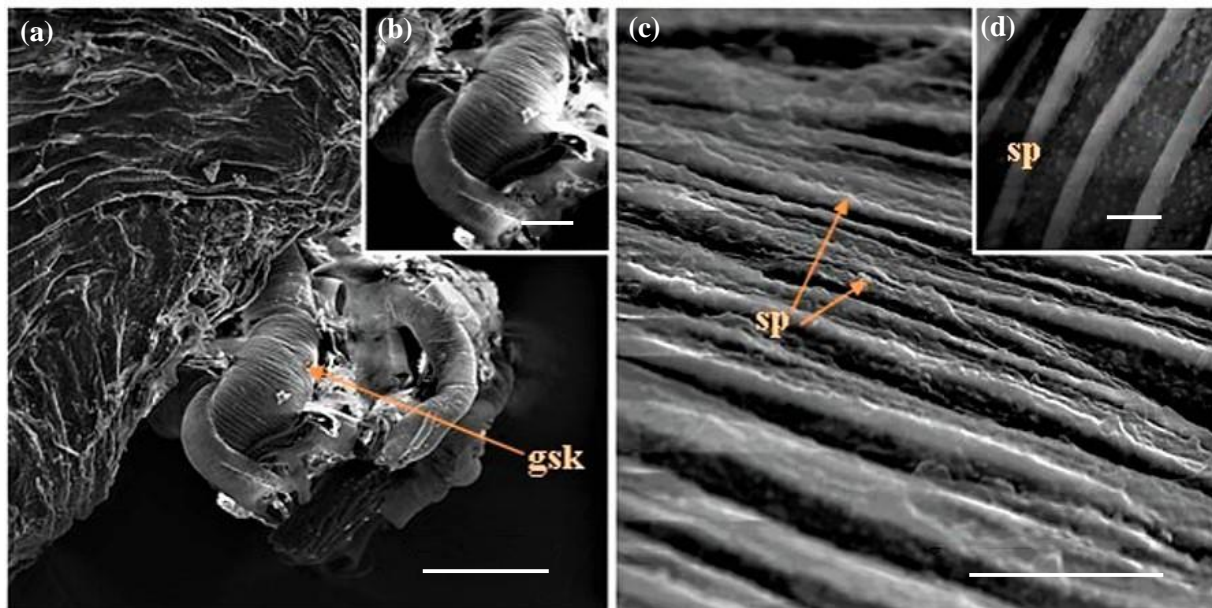


Slika 20. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda *L. (P.) punctatus*. (a) Rezervoar sa glavnim sabirnim kanalom (desno) i eferentnim kanalom (levo); (b) mišićno tkivo rezervoara i fina struktura paralelno i gusto raspoređenih snopova mišićnih vlakana; (c) uvećani prikaz mišićnog tkiva rezervoara. Skale: 200 μm (a), 20 μm (b) i 5 μm (c). ek - eferentni kanal; gsk - glavni sabirni kanal; r - rezervoar; m - mišićna vlakna.

Eferentni kanal, dijametra od oko 100 μm , ima naboranu površinu na kojoj se nalaze spiralna zadebljanja (**Slika 21a**). Glavni sabirni kanal, prosečnog dijametra od oko 66,6 μm i sa glatkom površinom (**Slike 22a i 22b**), poseduje spiralna zadebljanja, čija širina iznosi oko 633,65 nm (**Slike 22c i 22d**). Primećuje se dobra aerisanost pigidijalnog žlezdanog sistema na osnovu prisustva brojnih traheola sa spiralnim zadebljanjima (**Slika 21b**).



Slika 21. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda i dela trahejnog sistema *L. (P.) punctatus*. (a) Eferentni kanal; (b) poprečni presek traheje i traheole. Skale: 50 μm (a) i 5 μm (b). ek - eferentni kanal; trh - traheja; tr - traheola.



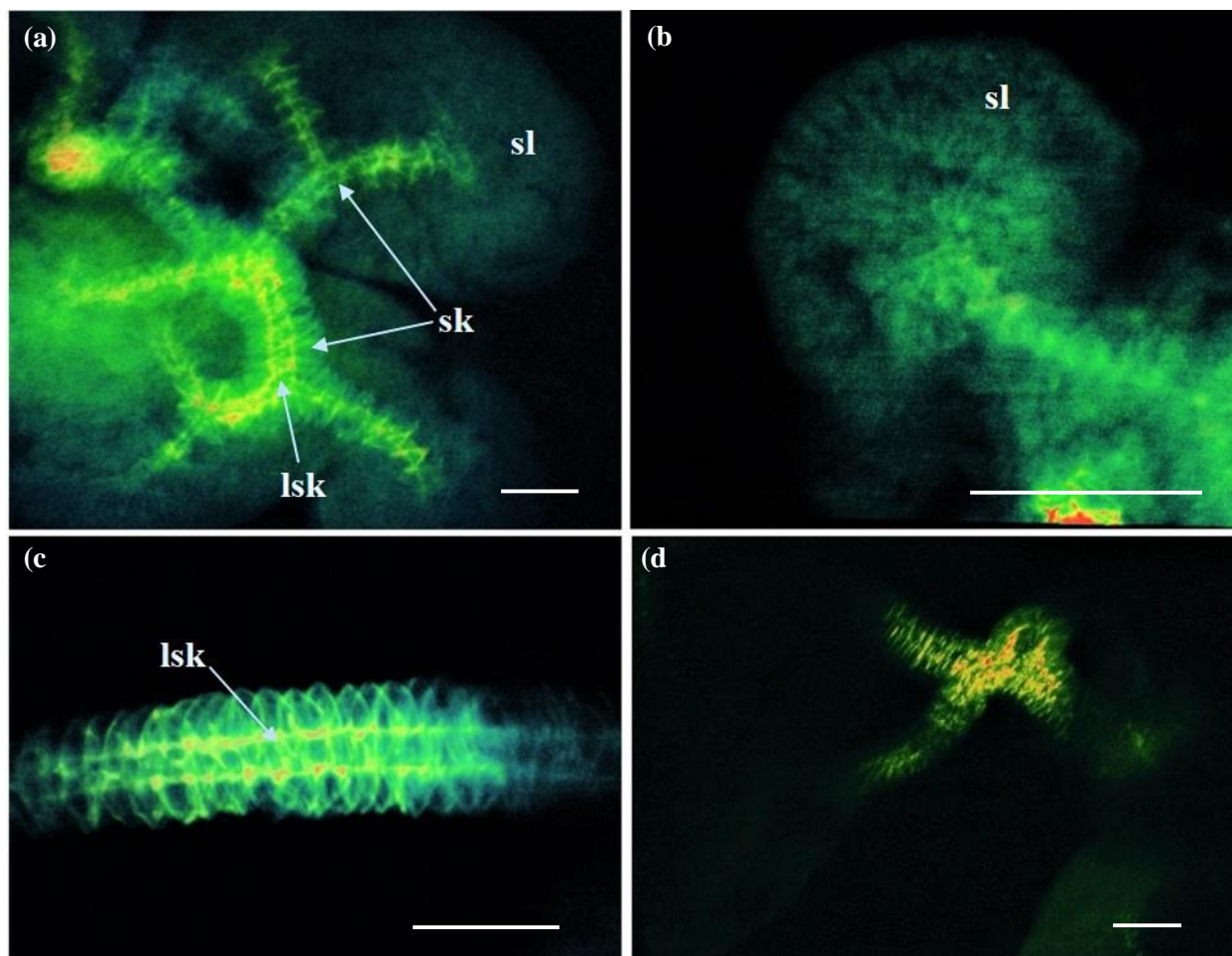
Slika 22. SEM mikrografije spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda *L. (P.) punctatus*. (a) Deo rezervoara sa glavnim sabirnim kanalom; (b) detaljniji prikaz glavnog sabirnog kanala; (c) površina tkiva glavnog sabirnog kanala; (d) ultrastruktura tkiva glavnog sabirnog kanala. Skale: 100 μm (a), 50 μm (c), 5 μm (b) i 2 μm (d). gsk - glavni sabirni kanal; sp - spiralna zadebljanja u unutrašnjosti glavnog sabirnog kanala.

4.4.2. Primena TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije u analizi morfologije i anatomije pigidijalnog žlezdanog sistema odabranih vrsta

4.4.2.1. Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste *Abax (Abax) parallelepipedus* (Piller & Mitterpacher, 1783)

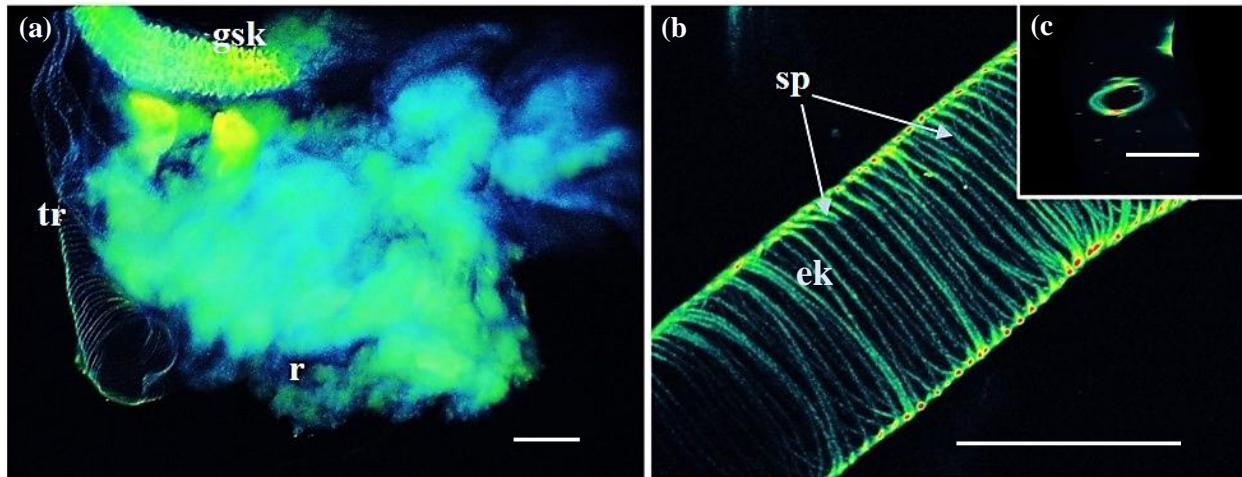
Na mikrografijama dobijenim TPEF modalitetom NLM, kod *A. (A.) parallelepipedus* se uočava sistem sabirnih kanala radijalno razgranat u više različitih pravaca, čiji je dijametar varijabilan (prosečan dijametar iznosi 38,66 μm) (**Slike 23a i 23d**). Prosečni dijametar lumena radijalnih sabirnih kanala iznosi oko 28,72 μm (**Slika 23c**). Uočava se da su radijalni sabirni kanali sa spiralnim zadebljanjima (**Slika 23c**). Takođe, i u ovom slučaju, spiralna zadebljanja imaju funkciju sprečavanja distorzije i spljoštavanja kanala prilikom izlučivanja sekreta u naredni deo pigidijalnog sistema.

Prosečan dijametar pojedinačnog sferičnog sekretornog lobusa iznosi 182 μm (**Slika 23b**). Na mikrografiji pojedinačnog sekretornog lobusa (**Slika 23b**), između sekretornih ćelija, unutar tkiva sekretornog lobusa, mogu se uočiti kanalisani prazni prostori, odnosno međusobno povezani lumeni, koji vode izlučevinu (sekret) iz svake sekretorne ćelije do radijalnih sabirnih kanala, koji se potom sustiču u sabirne kanale većeg dijametra, koji se naposljetku ulivaju u glavni sabirni kanal.



Slika 23. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *A. (A.) parallelepipeda*. (a) Sistem sekretornih lobusa sa radijalnim sabirnim kanalima; (b) sekretorni lobus; (c) ultrastruktura pojedinačnog radijalnog sabirnog kanala; (d) poprečni presek mesta spajanja tri radijalna sabirna kanala. Skale: 91 μm (b) i 90 μm (a, c i d). sk - sabirni kanal; lsk - lumen sabirnog kanala; sl - sekretorni lobus.

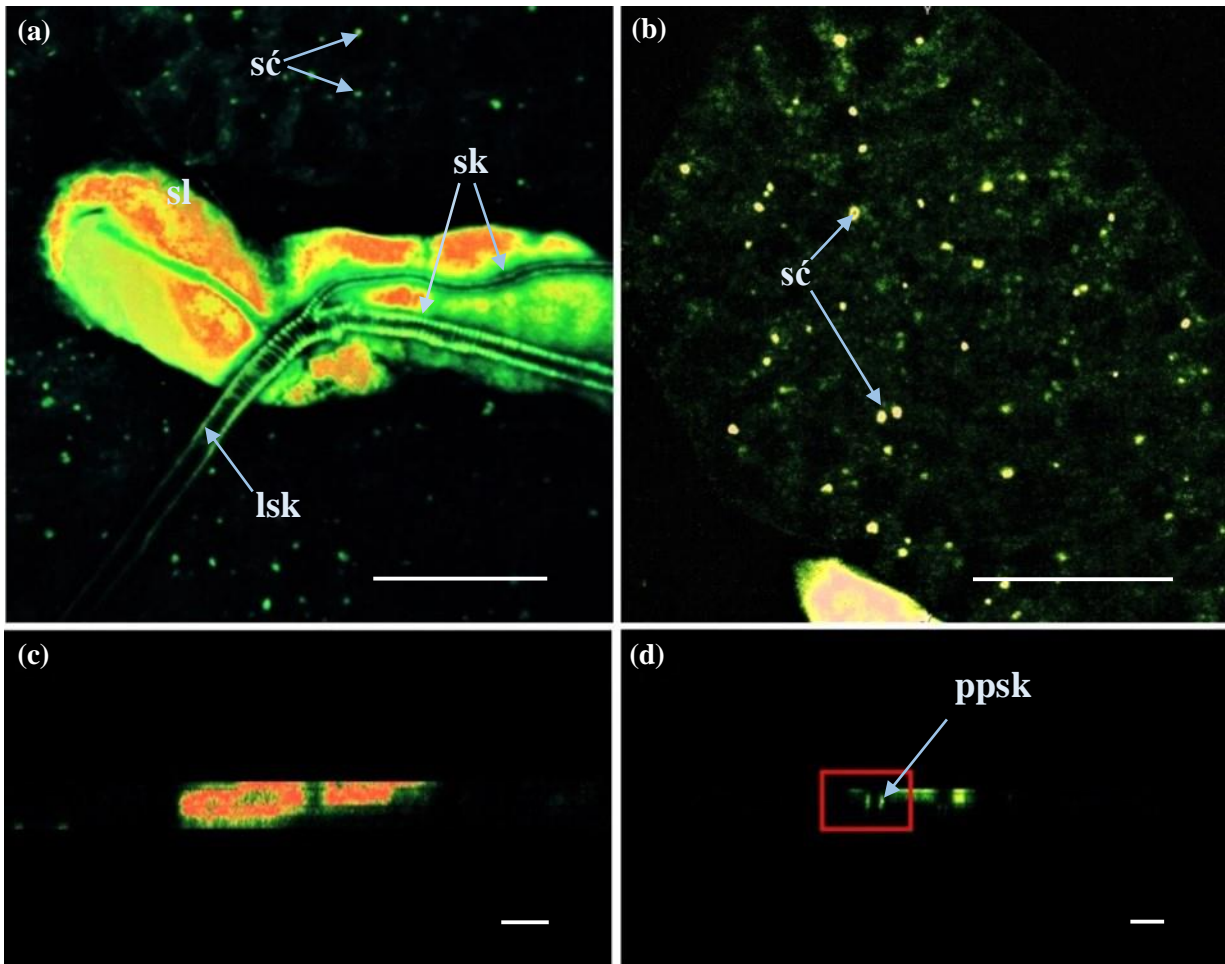
Na mikrografijama se uočava i vrlo rastresito i nekompaktno mišićno tkivo rezervoara, sa slabo vidljivom strukturom (**Slika 24a**). Glavni sabirni kanal je naboran, pri čemu se jasno uočava unutrašnji lumen (**Slika 24a**). Dijametar ovog kanala u proseku iznosi oko 60 μm (**Slika 24a**). Eferentni kanal je spiralno zadebljao, sa prosečnim dijametrom od 86 μm , a može se uočiti i njegov lumen (**Slika 24b**). Ovom mikroskopijom je dobijen i prikaz poprečnog preseka eferentnog kanala (**Slika 24c**).



Slika 24. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *A. (A.) parallelepipedus*. (a) Mišićno tkivo rezervoara sa glavnim sabirnim kanalom i trahejom; (b) ultrastruktura eferentnog kanala; (c) poprečni presek eferentnog kanala. Skale: 86 μm (b i c) i 60 μm (a). gsk - glavni sabirni kanal; tr - traheja; r - rezervoar; ek - eferentni kanal; sp - spiralna zadebljanja eferentnog kanala.

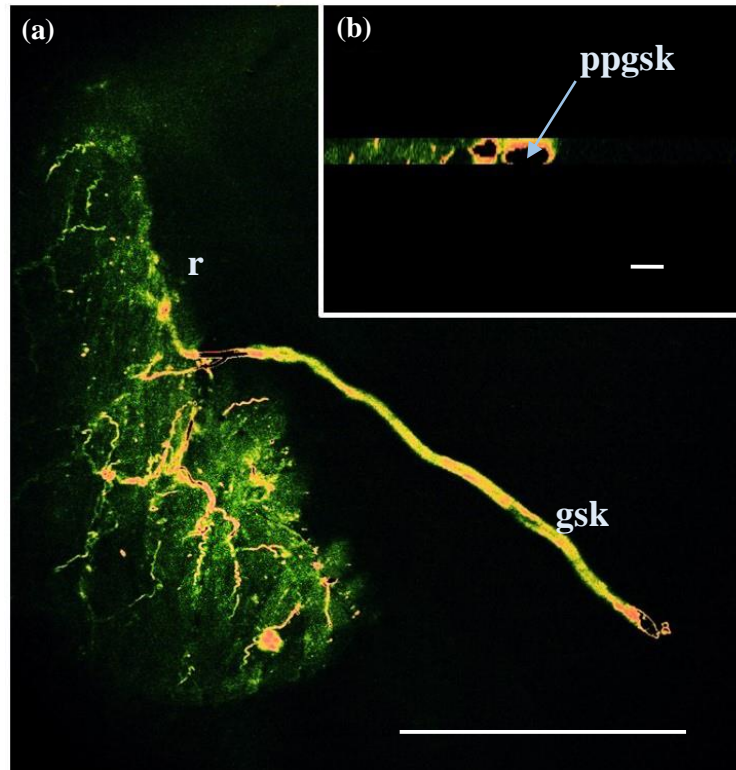
4.4.2.2. Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste *Carabus (Tomocarabus) convexus* Fabricius, 1775

Pigidijalni žlezdani sistem vrste *C. (T.) convexus* počinje pojedinačnim sferičnim sekretornim lobusima, čiji se dijametri kreću između 100 μm i 200 μm (Slike 25a i 25c). Na uvećanom snimku pojedinačnog lobusa se može jasno uočiti veliki broj sekretornih ćelija (Slika 25b). Prosečan dijametar radijalnog sabirnog kanala iznosi 9,4 μm (Slika 25d).



Slika 25. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *C. (T.) convexus*. (a) Sekretorni lobusi sa radijalnim sabirnim kanalima; (b) bliži prikaz sekretornog lobusa sa sekretornim ćelijama; (c) poprečni presek pojedinačnog sekretornog lobusa; (d) poprečni presek pojedinačnog radijalnog sabirnog kanala (označen crvenim ramom). Skale: 100 μm (b), 76 μm (a), 33 μm (c) i 13 μm (d). sk - sabirni kanal; lsk - lumen sabirnog kanala; sl - sekretorni lobus; sc - sekretorne ćelije; ppsk - poprečni presek sabirnog kanala.

Rezervoar pigidijalnih žlezda ove vrste je jednostavno građena struktura dužine od oko 1200 μm i širine od oko 650 μm . Mišićno tkivo ove strukture je kompaktno, sa slabo vidljivim snopovima mišićnih vlakana (**Slika 26a**). Glavni sabirni kanal je glatke površine (**Slika 26a**). Dijametar poprečnog preseka glavnog sabirnog kanala iznosi oko 66 μm (**Slika 26b**).

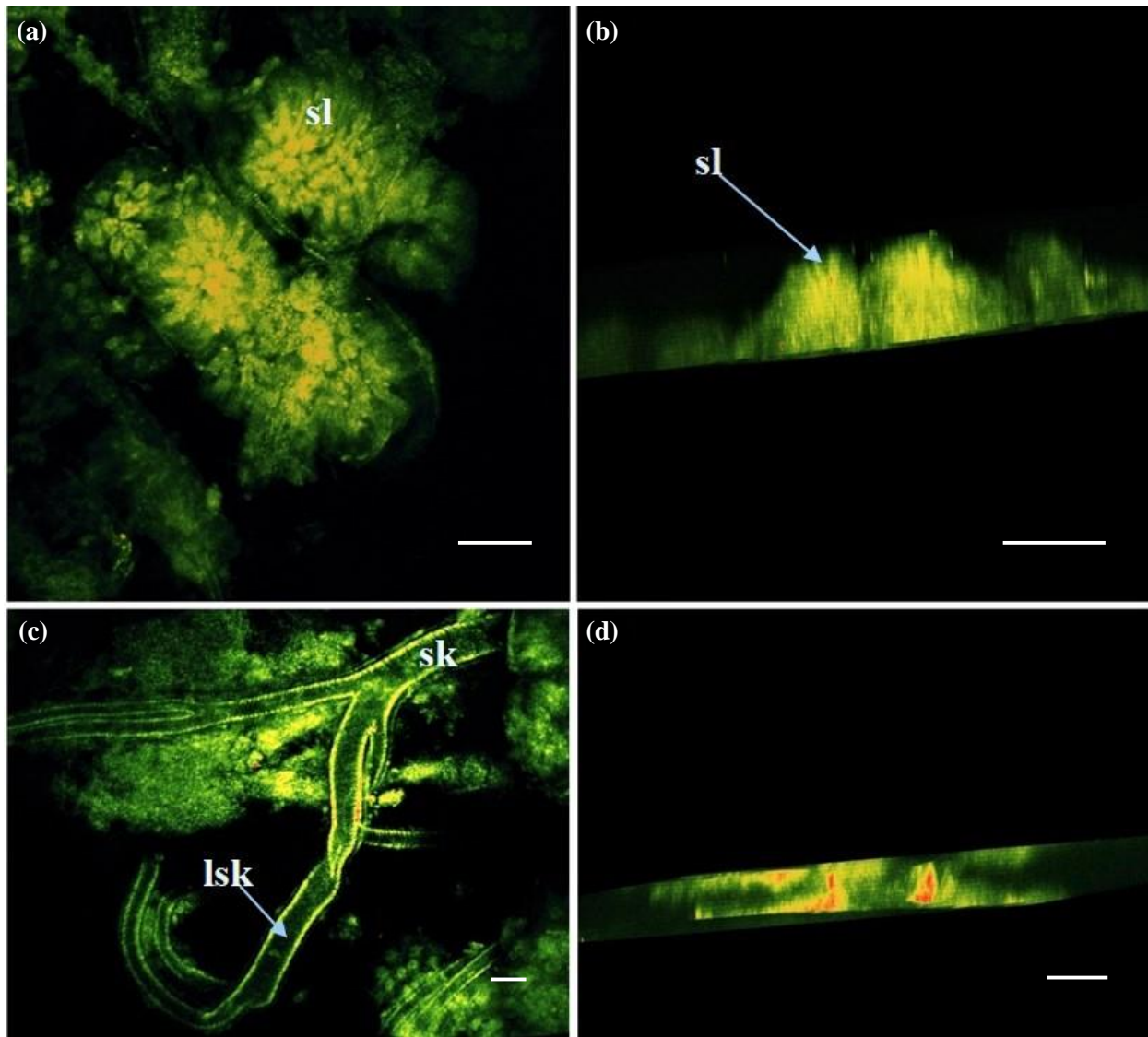


Slika 26. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *C. (T.) convexus*. (a) Deo rezervoara sa glavnim sabirnim kanalom; (b) poprečni presek glavnog sabirnog kanala. Skale: 600 μm (a) i 66 μm (b). r - rezervoar; gsk - glavni sabirni kanal; ppgsk - poprečni presek glavnog sabirnog kanala.

4.4.2.3. Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste *Carabus (Procrustes) coriaceus* Linnaeus, 1758

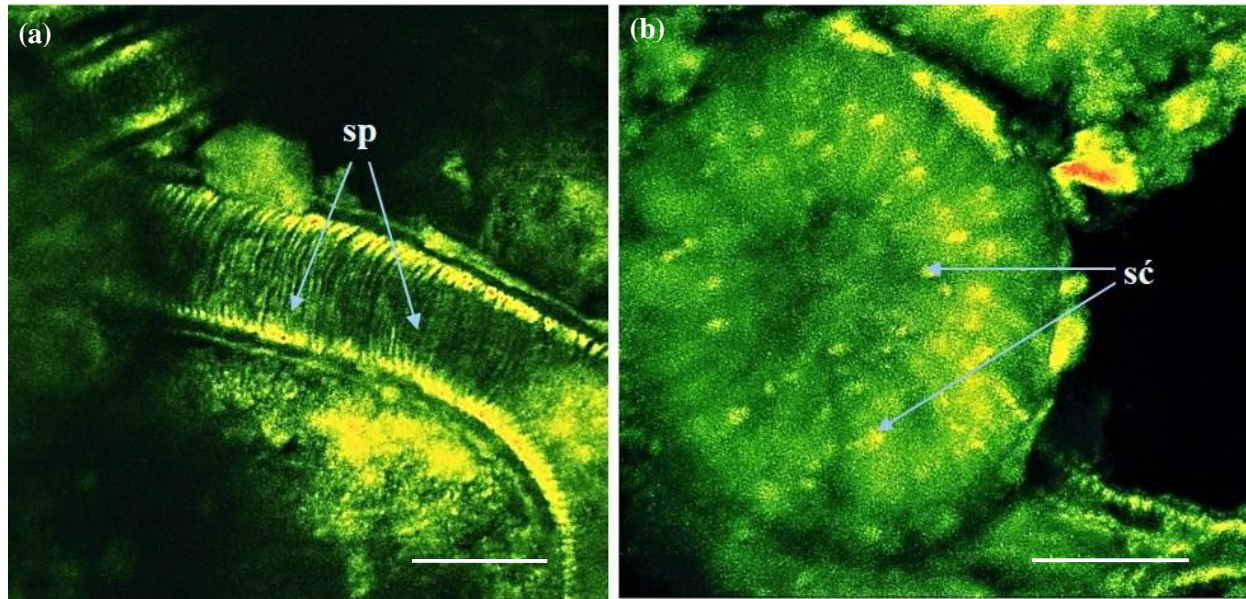
Kod vrste *C. (P.) coriaceus* prisutni su gusto raspoređeni pojedinačni sferični sekretorni lobusi prosečnog dijametara od 175 μm , sa uskim kanalisanim lumenima (**Slike 27a i 27b**).

Razgranati radijalni sabirni kanali su različitih dijametara (od 40 μm do 70 μm) (Slike 27c i 27d).



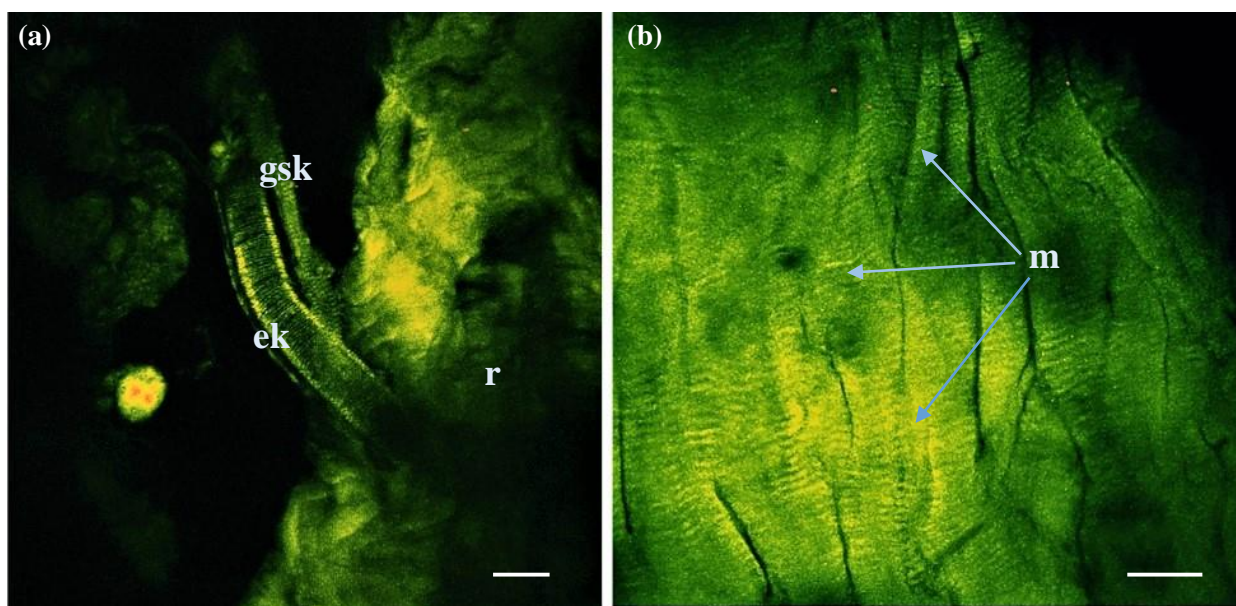
Slika 27. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *C. (P.) coriaceus*. (a) Grupacija sekretornih lobusa sa radijalnim sabirnim kanalima; (b) poprečni presek pojedinačnih sekretornih lobusa; (c) mesto spajanja radijalnih sabirnih kanala; (d) poprečni presek pojedinačnog radijalnog sabirnog kanala. Skale: 100 μm (a), 80 μm (c), 65 μm (d) i 50 μm (b). sk - sabirni kanal; lsk - lumen sabirnog kanala; sl - sekretorni lobus.

Na mikrografijama pojedinačno snimljenog radijalnog sabirnog kanala se uočavaju spiralna zadebljanja (**Slika 28a**). Na uvećanom prikazu pojedinačnog sekretornog lobusa se mogu uočiti gusto pakovane sekretorne ćelije, kao i intercelularni lumeni, u koje se uliva sekret i sprovodi do radijalnog sabirnog kanala, koji polazi od svakog pojedinačnog lobusa (**Slika 28b**).



Slika 28. NLM (TPEF modalitet) mikrografija pigidijalnih žlezda *C. (P.) coriaceus*. (a) Bliži prikaz radijalnog sabirnog kanala; (b) bliži prikaz sekretornog lobusa. Skale: 65 μm (a) i 55 μm (b). sp - spiralna zadebljanja sabirnog kanala; sć - sekretorne ćelije.

Na **Slici 29** je predstavljena strukturiranost rezervoara pigidijalnih žlezda *C. (P.) coriaceus*. Primećuju se jasno definisani i uočljivi fini, gusto raspoređeni snopovi vlakana glatke muskulature različitih debljina (prosečno 75 μm) (**Slika 29b**). Dijametar eferentnog, površinski naboranog kanala, iznosi oko 100 μm (**Slika 29a**). Glavni sabirni kanal, dijametra oko 50 μm , pruža se uz eferentni kanal i poseduje jasno uočljiva spiralna zadebljanja (**Slika 29a**).



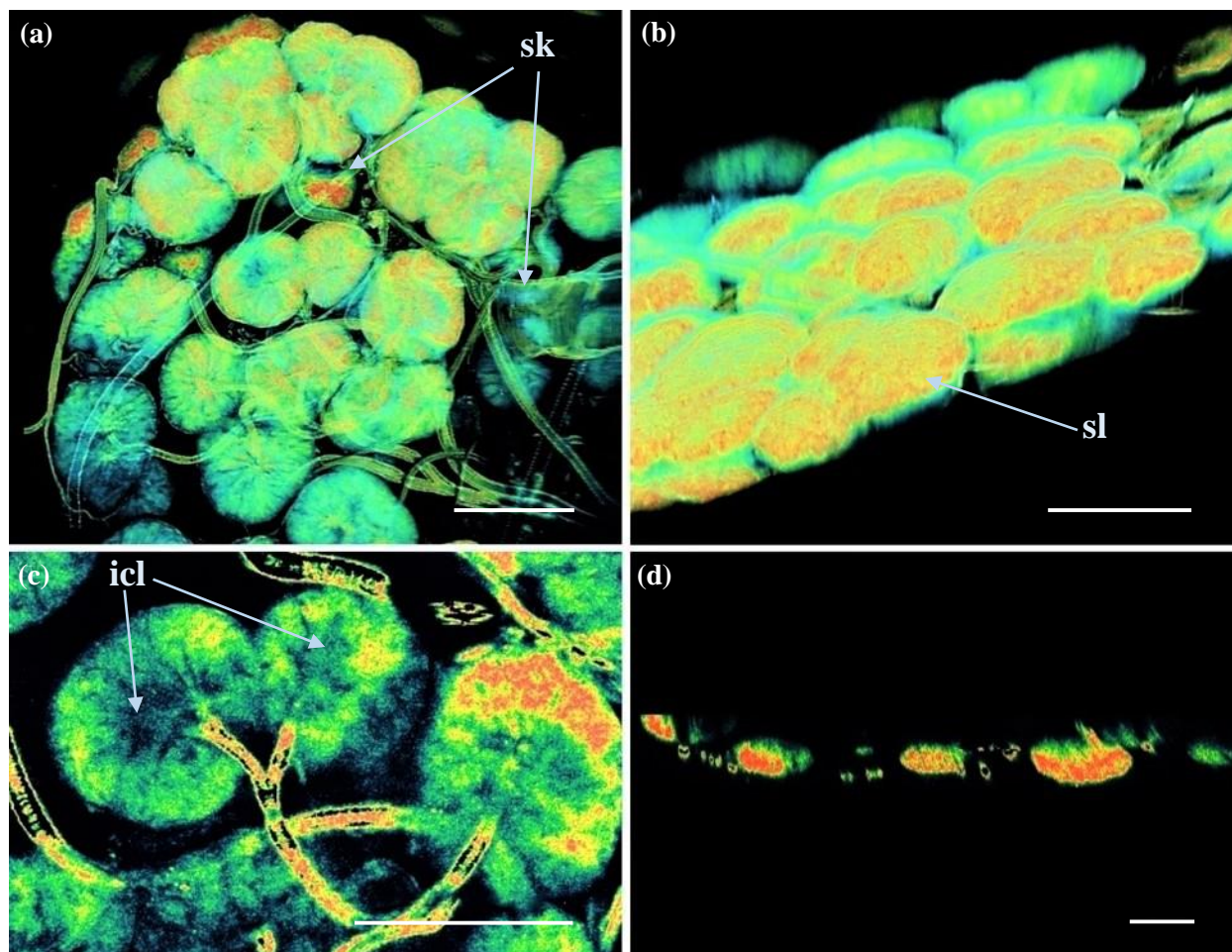
Slika 29. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda vrste *C. (P.) coriaceus*. (a) Deo rezervoara sa glavnim sabirnim kanalom i eferentnim kanalom; (b) mišićno tkivo rezervoara. Skale: 100 μm . ek - eferentni kanal; gsk - glavni sabirni kanal; r - rezervoar; m - mišićna vlakna.

4.4.2.4. Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste *Carabus (Eucarabus) ullrichii* Germar, 1824

Na osnovu uvida u mikrografije, u okviru pigidijalnog žlezdanog sistema *C. (E.) ullrichii* evidentiran je veliki broj gusto raspoređenih sferičnih sekretornih lobusa (**Slike 30a i 30b**) prosečnog dijametra od 116,57 μm (**Slike 30a i 30d**), koji su povezani sa spletom razgranatih naboranih radijalnih sabirnih kanala, čiji prosečni dijametar iznosi 23,14 μm (**Slike 30a i 30b**).

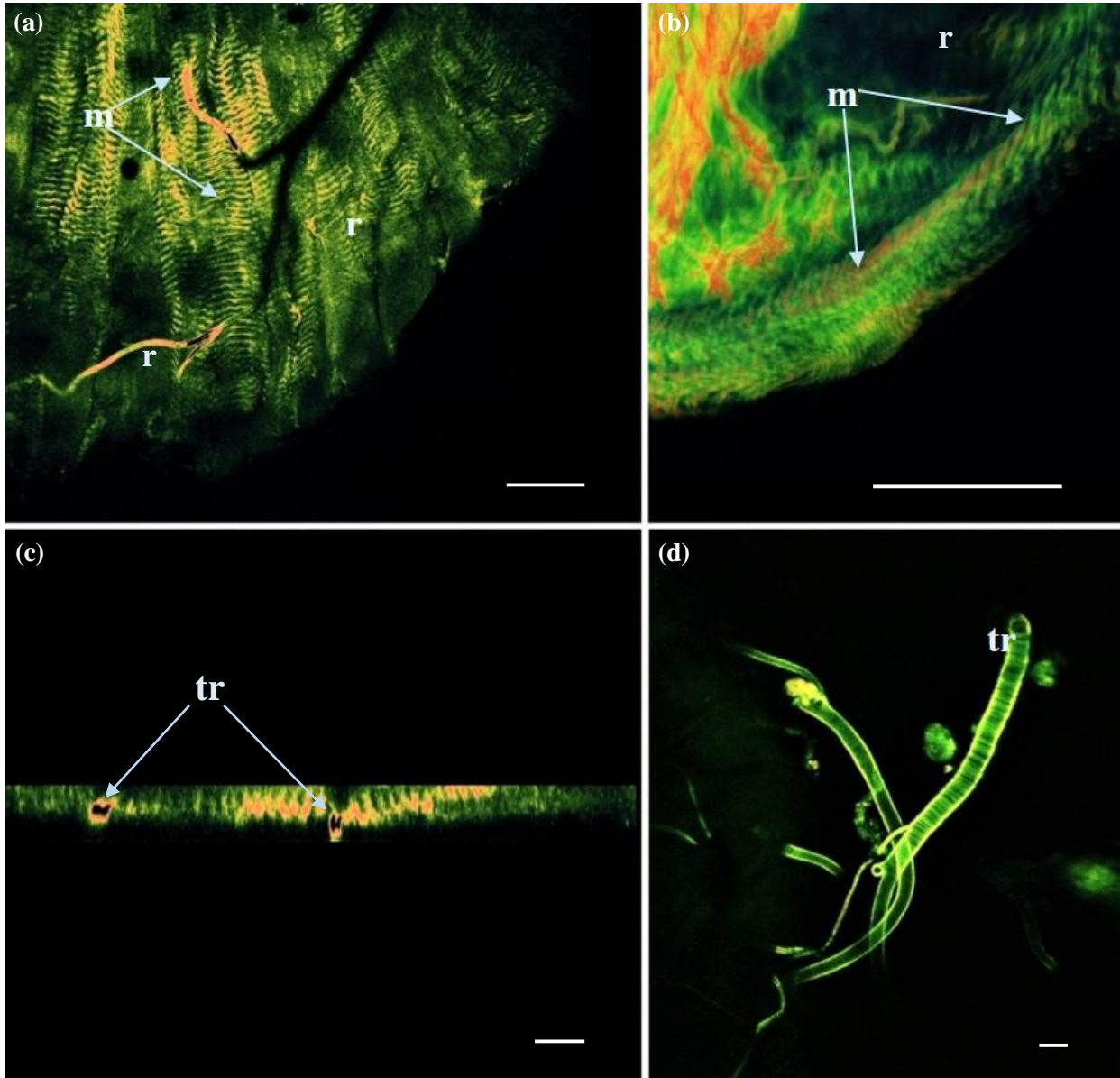
Na **Slici 30c** se uočavaju gusto raspoređene sekretorne ćelije i intercelularni lumeni. Dobijen je i prostorni raspored sekretornih lobusa, na osnovu koga se uočava gusto pakovanje

sekretornih lobusa u klasteru (u proseku od 8 do 10 lobusa u klasteru), a samim tim su uočljivi i veoma uski kanalisani lumeni (Slika 30b).



Slika 30. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *C. (E.) ullrichii*. (a) Grupacija sekretornih lobusa i radijalni sabirni kanali; (b) prostorni 3D raspored sekretornih lobusa; (c) pojedinačni sekretorni lobusi i mesta spajanja sa radijalnim sabirnim kanalima; (d) poprečni presek pojedinačnih sekretornih lobusa. Skale: 180 μm (a-c) i 132 μm (d). sk - sabirni kanali; sl - sekretorni lobus; icl - intercelularni lumeni.

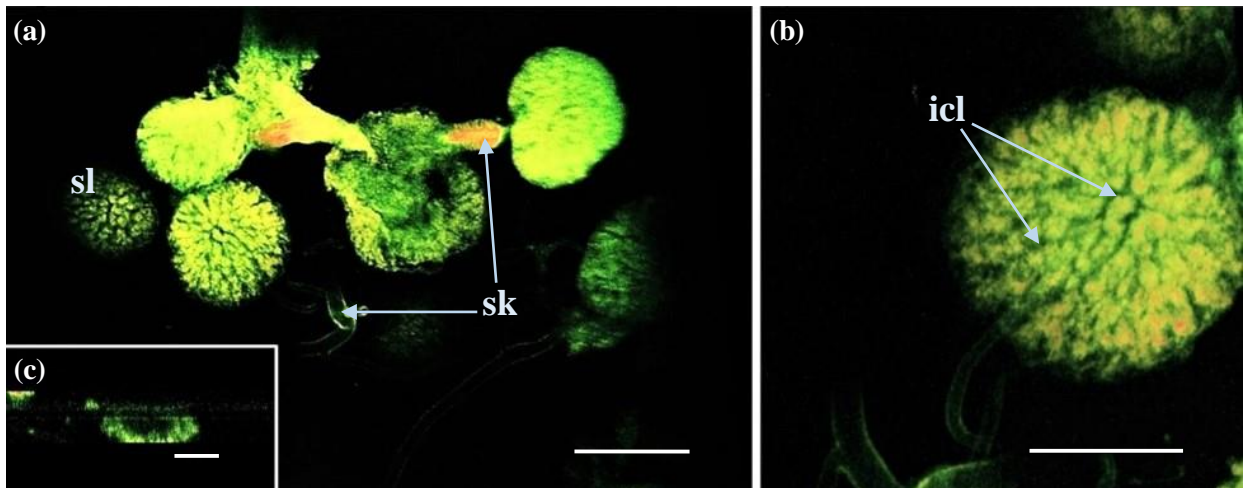
Tkivo rezervoara pigidijalnih žlezda ispitane vrste je specifično po prisustvu fine strukture gusto postavljenih snopova vlakana glatke muskulature, prosečne debljine od oko 30 μm (Slika 31a-c). Gusta mreža razgranatih traheola je u vezi sa rezervoarom. Traheole su sa spiralnim zadebljajima i prosečnog dijametra od oko 40 μm (Slike 31c i 31d).



Slika 31. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *C. (E.) ullrichii*. (a) Mišićno tkivo rezervoara sa traheolama; (b) ultrastruktura mišićnog tkiva rezervoara; (c) poprečni presek dela tkiva rezervoara i traheola; (d) bliži prikaz traheola. Skale: 150 μm (b), 100 μm (a), 66 μm (c) i 40 μm (d). m - mišićna vlakna; r – rezervoar; tr - traheola.

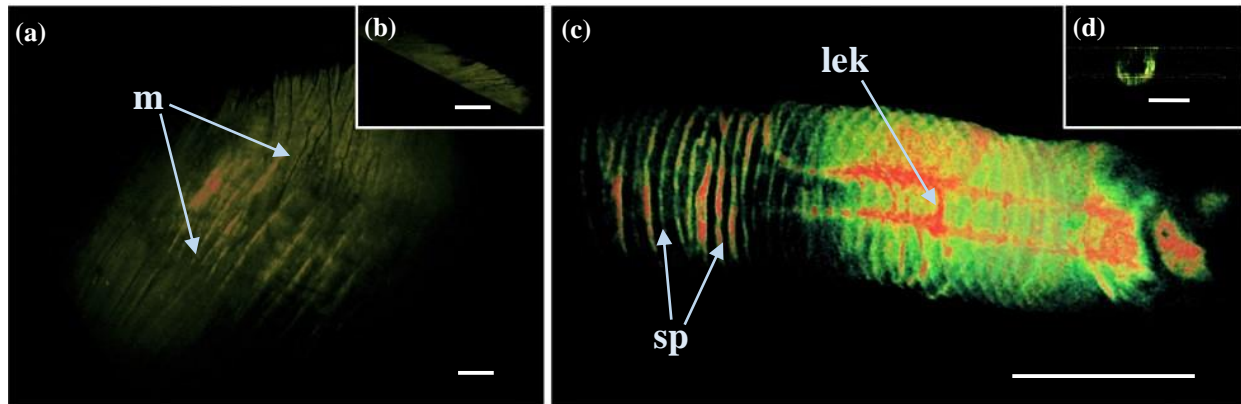
4.4.2.5. Morfo-anatomski aspekt pigidijalnih žlezda vrste *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828)

Sekretorni lobusi *L. (P.) punctatus* su sferičnog oblika, prosečnog dijametra od oko 200 μm (Slika 32a i 32b). Na poprečnom preseku pojedinih lobusa se uočava njihova elipsoidna forma (Slika 32c), što ukazuje na to da mogu da budu i nešto drugačijeg oblika od sferičnog. Povezani su sa razgranatim i delimično naboranim radijalnim sabirnim kanalima varijabilnih dimenzija (prosečan dijametar je oko 20 μm) (Slika 32a). Na mikrografiji pojedinačnog sekretornog lobusa se uočavaju gusto pakovane sekretorne ćelije, kao i intercelularni lumeni, koji sprovode sekret do radijalnog sabirnog kanala (Slika 32b).



Slika 32. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *L. (P.) punctatus*. (a) Grupacija sekretornih lobusa i radijalnih sabirnih kanala; (b) bliži prikaz sekretornog lobusa; (c) poprečni presek pojedinačnog sekretornog lobusa. Skale: 200 μm (a) i 100 μm (b i c). sl - sekretorni lobus; sk - sabirni kanal; icl - intercelularni lumeni.

Tkivo rezervoara pigidijalnih žlezda *L. (P.) punctatus* se sastoji od paralelno postavljenih i gusto raspoređenih vlakana glatke muskulature, prosečne debljine od oko 40 μm (Slike 33a i 33b). Eferentni kanal je prosečnog dijametra od 130 μm , dok prosečni dijametar unutrašnjeg lumena kanala iznosi 32,5 μm (Slika 33c i d). Eferentni kanal je ojačan spiralnim zadebljanjima (Slika 33c).



Slika 33. NLM (TPEF modalitet) mikrografije pigidijalnih žlezda *L. (P.) punctatus*. (a) Mišićno tkivo rezervoara sa finom strukturom paralelno postavljenih mišićnih vlakana; (b) poprečni presek dela tkiva rezervoara; (c) ultrastruktura eferentnog kanala; (d) poprečni presek eferentnog kanala. Skale: 130 μm (b i d); 100 μm (c) i 80 μm (a). m - mišićna vlakna; lek - lumen eferentnog kanala; sp - spiralna zadebljanja.

5. DISKUSIJA

5.1. Antimikrobna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka na humane patogene

Tokom poslednjih decenija, konsekvencija pojačane rezistencije humanih patogena, kao proizvoda prirodnih evolucionih mehanizama, podsticala je naučnike u oblasti biologije i medicine da svo znanje i iskustva usmeravaju u pravcu aspekta poboljšanja terapija i unapređenja medikamenata. Svesnošću da predstoji epoha u kojoj sintetički antibiotici, *de facto*, u daljoj budućnosti neće imati terapeutsko dejstvo, nauka se okreće ispitivanju prirodnih produkata i mehanizama njihovog dejstva, oslanjajući se na već do sada utvrđene i primenjene mehanizme. U tom smislu, insekti igraju značajnu ulogu kako predstavljaju izvor varijabilnih prirodnih produkata, odnosno klasa jedinjenja poput organskih kiselina, aldehida, terpenoida, ali i antimikrobnih proteina (AMP) (Blum, 1981; Giglio et al., 2011; Guilhelmelli et al., 2013; Yi et al., 2014). Kada uzmemo u obzir sve pomenute produkte, u fokus istraživanja su najpre dospeli AMP peptidi, te je vrlo brzo pokazano da se u osnovi dejstva atacina, abaecina, koleopterocina, cercopina, dipterocina, izolovanih iz hemolimfe Diptera, Lepidoptera, ali prevažodno i Coleoptera, nalazi antimikrobni potencijal (Xylander, 2009). Naročito pažnju treba usmeriti na peptide koji su bogati cisteinom. Ovi peptidi pokazuju specifičnu aktivnost na širok spektar Gram-pozitivnih bakterija, dok je nešto manji broj Gram-negativnih bakterija i mikromiceta pogođen njihovim dejstvom. Dakle, peptidi bogati cisteinom imaju značajno i antifungalno dejstvo, tako je npr. drozomicin bio prvi antifungalni peptid, izolovan iz vrste *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Zhang & Zhu, 2009). Prepoznavanje mikroba i indukcija ekspresije AMP peptida je posredovana Toll i IMD signalnim putevima, uz činjenicu da se Toll signalni put najčešće aktivira kao odgovor na prisustvo patogenih mikromiceta i pojavu Gram-pozitivnih bakterijskih infekcija, dok je aktivacija IMD signalnog puta odgovor na prisustvo pretežno Gram-negativnih bakterija (Rolff & Reynolds, 2009; Rosales, 2017).

Generalno posmatrano može se uočiti korelacija između insekata i potencijalnih patogena iz istog staništa. Očito je da je razvoj imunološkog sistema insekata bila posledica evolucije,

usled bliskog kontakta sa mikrobiološkim okruženjem, između ostalog, kako bi se potom ta funkcija mogla primeniti i u druge svrhe. Uprkos postojanju dogmatskog uverenja da invertebrate usled nedostatka timusa i limfnih čvorova nikada neće zadovoljiti pojam adaptivnog imunog sistema, Karp (1996) se u jednoj od svojih studija zalagao za osveščivanje već prihvaćenih činjenica unutar definicije samog imuniteta i redefiniranje onoga što podrazumevamo pod imunitetom. Tada je napomenuto da postoji sve veći broj dokaza koji upućuju na činjenicu da se kod invertebrata može razviti osnovni kriterijum adaptivnog imunog odgovora, tj. specifičnost, odnosno, imunska memorija, pri čemu je specifičnost termin koji je u korelaciji sa sticanjem i razvijanjem imunskog odgovora u kontaktu sa uzročnicima bolesti i ne postoji pre prvog kontakta sa patogenim mikroorganizmom. Prethodno podrazumeva aktivaciju određenih efektorskih proteina koji učestvuju u ovom odgovoru. Tako, kaskadno pokretanje intracelularnih signalnih puteva, što posledično dovodi do aktivacije gena za sintezu AMP proteina predstavlja sekundarni humoralni odgovor kod insekata (Rolff & Reynolds, 2009; Murdock et al., 2012; Keehnen et al., 2017).

Kada izopštimo prethodno opisan imuni mehanizam odbrane insekata od mikrobnih patogena, preostaje nam razmatranje dodatnih alternativnih načina njihove zaštite od mikroorganizama. Dakle, pored razvijenog inducibilnog humoralnog imunog sistema, insekti su razvili i druge mehanizme, koji podrazumevaju prisustvo specijalizovanih egzokrinih struktura, koje mogu potencijalno doprineti neposrednoj odbrani od patogenih mikroorganizama. Sekreti pigidijalnih žlezda i druge vrste sekreta (npr. oralni, analni sekreti), osim što poseduju odbrambenu ulogu, mogu učestvovati i u biološkim aktivnostima, kao što je u tezi već pomenuto. Tako, postoje studije koje upućuju na antimikrobna svojstva oralnih i analnih sekreta predstavnika porodice Silphidae (*Nicrophorus* spp.), koji u svom sastavu sadrže izobutiričnu, fenilacetatnu i kapronsku kiselinu (Hoback et al., 2004; Degenkolb et al., 2011). Konkretno, vrsta *Nicrophorus vespilloides* Herbst, 1783 sadrži u svojim izlučevinama značajan procentualni udeo palmitinske kiseline, koja hipotetički može biti odgovorna za antimikrobni potencijal (Degenkolb et al., 2011). Takođe, i drugi autori sugerišu na prisustvo antimikrobnih agenasa kod predstavnika podreda Polyphaga (Coleoptera), i to kod larvalnih stupnjeva vrsta porodice Staphylinidae i adulta vrsta porodice Tenebrionidae (Ghilarov, 1958; Francke & Dettner, 2005).

Mehanizmi dejstva egzokrinih sekreta insekata nisu još uvek detaljno istraženi, čime ova tematika ostavlja otvoren prostor za dalja istraživanja. Međutim, kada su u pitanju sekreti pigidijalnih žlezda predstavnika porodice Carabidae, može se napraviti korelacija sa mehanizmima antimikrobnog dejstva pojedinačnih organskih konstituenata unutar smeše sekreta, poput masnih kiselina, koji se učestalo detektuju kod najvećeg broja testiranih vrsta trčuljaka, prevashodno kada su u pitanju vrste *L. (P.) punctatus*, *A. (A.) paralellepipedus* i *C. (E.) ullrichii* (Nenadić et al., 2016a, 2016b), ili pak treba razmotriti sinergistično dejstvo istih.

5.1.1. Antibakterijsko dejstvo sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka

Prilikom ispitivanja antibakterijskog dejstva sekreta šest vrsta trčuljaka, ustanovljeno je da svi testirani agensi postižu određen stepen antimikrobnog potencijala, koji je vidno različit na specijskom nivou. Varijabilnost antimikrobnog potencijala se može pripisati hemijskom sastavu sekreta, koji je specifičan za svaku vrstu, iako se neka organska jedinjenja detektuju u sekretima pigidijalnih žlezda većine vrsta trčuljaka, poput metakrilne i tiglinske kiseline (Blum, 1981; Lečić et al., 2014).

U ovoj studiji je ustanovljeno da sekret pigidijalnih žlezda vrste *C. (E.) ullrichii* poseduje antimikrobni potencijal na sve testirane bakterije i mikromicete. U pogledu efekta ovog sekreta, kao najsenzibilniji sojevi bakterija su se pokazali *S. aureus* i *L. monocytogenes*. Ostali bakterijski sojevi su potvrdili duplo veću rezistentnost na dejstvo ovog sekreta.

Sekret vrste *L. (P.) punctatus* je pokazao najveći antibakterijski efekat (MIK 0,022 mg/mL, MBK 0,045 mg/mL) u poređenju sa ostalim testiranim sekretima, sa izuzetkom kada su u pitanju sojevi *M. flavus* i *E. coli*, koji su pokazali nešto veću rezistenciju, što je bilo zanemarljivo u odnosu na ostale testirane sekrete. Najveća rezistentnost ispitanih patogenih bakterijskih sojeva je zabeležena nakon tretmana sekretom vrste *C. (C.) sycophanta*, koji je postigao antibakterijski efekat jedino na *E. coli*, što je veoma interesantan rezultat kada uporedimo sa antifungalnim potencijalom sekreta ove vrste, pri čemu se uočava da su humani bakterijski patogeni pokazali viši stepen rezistencije u poređenju sa testiranim mikromicetama.

O prethodnom svedoči činjenica da veći broj testiranih uzoraka nije pokazao efekat na širi spektar ispitanih bakterija. Naime, jedino sekreti vrsta *C. (E.) ullrichii* i *L. (P.) punctatus* su imali efekta na sve testirane sojeve. Međutim, komercijalni antibiotici streptomycin i ampicilin su pokazali znatno veći nivo antibakterijske aktivnosti u svim ispitanim slučajevima, izuzev kada su u pitanju sojevi *L. monocytogenes* i *E. cloacae*, koji su pokazali sličan stepen rezistentnosti u odnosu na streptomycin (MIK 0,016 mg/mL, MBK 0,032 mg/mL) kada uporedimo sa njihovom senzitivnošću u odnosu na sekret *L. (P.) punctatus* (MIK 0,022 mg/mL, MBK 0,045 mg/mL).

Kada govorimo o kratkolančanim masnim kiselinama, poput sirćetne, mravlje, butirične i izobutirične kiseline, do danas je ukazano na njihov antibakterijski potencijal (Ryssel et al., 2009; Huang et al., 2011). Uglavnom je ispitana aktivnost ovih jedinjenja kao produkata fermentacije drugih mikroorganizama, koji se prirodno nalaze u sastavu humanog mikrobioma. Tako, npr. acetat nastaje od piruvata dejstvom acetil koenzima A, a produkuju ga uglavnom enterične bakterije (npr. *Akkermansia muciniphila*, *Bacteriodes* spp., *Bifidobacterium* spp. i dr.). U osnovi njihove aktivnosti leži uloga inhibitora histonske deacetilaze, koja posreduje u modulaciji imunološkog odgovora domaćina, kao i mogućnost direktnog aktiviranja G-kuplovanih receptora (Huang et al., 2011; Ciarlo et al., 2016; Koh et al., 2016).

Sekret vrste *L. (P.) punctatus* sadrži organske komponente, od kojih veći broj pripada masnim kiselinama, poput mravlje i sirćetne, ali postoji i manji udeo palmitinske i oleinske kiseline (Vesović et al., 2015; Nenadić et al., 2016a). Sa druge strane, sekret pigidijalnih žlezda vrste *C. (C.) sycophanta* sadrži salicilaldehid, koji bi mogao imati značajno učešće u antibakterijskom dejstvu. Naime, supstituisani salicilaldehid i njegovi derivati znatno inhibiraju rast i razvoj patogena, poput *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* (Peltari et al., 2007).

5.1.2. Antifungalno dejstvo sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka

Visok antimikrobni potencijal sekreta vrste *L. (P.) punctatus* se ogleda i u njegovom antifungalnom efektu, s obzirom da su MIK i MFK koncentracije imale do 50 puta manje vrednosti u odnosu na sintetički antimikotik bifonazol. U osnovi tako visokog inhibitornog i fungicidnog potencijala može ležati upravo udeo različitih masnih kiselina u sastavu ovog sekreta, prevashodno palmitinske i oleinske za koje je pretpostavljen i ispitan osnovni mehanizam antifungalnog dejstva. Naime, Avis & Bélanger (2001) su utvrdili da masne kiseline direktno interaguju sa ćelijskom membranom kod mikromiceta. Dakle, ova jedinjenja se sa lakoćom inkorporiraju u lipidni dvosloj, čime se fizičkim putem postiže disrupcija, a samim tim i nagli porast fluidnosti membrane. Poremećaj fluidnosti najčešće podrazumeva pojačanu mobilnost acilnih lanaca u membranskom fosfolipidnom dvosloju, čime se postiže promena u membranskoj dinamici, što negativno utiče na membranske vezujuće polipeptide. Nakon konformacionih promena membranskih proteina dolazi do oslobađanja intracelularnih komponenti u ekstracelularni prostor, a masne kiseline mogu interferirati sa različitim citoplazmatičnim enzimima, indirektno i nespecifično. Prethodno rezultuje u kompletnoj ćelijskoj dezorganizaciji.

U slučaju testiranja pojedinih mikromiceta (*A. ochraceus*, *T. viride*), sekret *L. (P.) punctatus* je pokazao približno 20-50 puta jači efekat u odnosu na komercijalni antimikotik ketokonazol, dok je pri testiranju mikromicete *P. ochrochloron*, antifungalno dejstvo ovog sekreta bilo 150 puta veće u odnosu na pomenutu pozitivnu kontrolu.

Sekret vrste *C. (C.) sycophanta* je takođe pokazao jači antifungalni efekat u odnosu na pozitivne kontrole, međutim, vrednosti MIK i MFK su bile značajno veće u odnosu na sekret *L. (P.) punctatus*. Za *C. (C.) sycophanta* je karakteristično prisustvo salicilaldehida u sastavu sekreta pigidijalnih žlezda, koje može biti odgovorno za antifungalni potencijal, kao i u slučaju prethodno razmotrenog antibakterijskog efekta (Pelttari et al., 2007).

Slični rezultati su dobijeni nakon testiranja sekreta *C. (C.) intricatus*, i to isključivo na mikromicete *A. ochraceus*, *T. viride* i *P. ochrochloron*, pri čemu je ketokonazol imao slabije dejstvo od testiranog sekreta. Sve testirane mikromicete su pokazale značajan stepen rezistencije na sekret vrste *C. (E.) ullrichii* (MIK i MFK su bile većih vrednosti u odnosu na *L. (P.) punctatus* i *C. (C.) sycophanta*). *Aspergillus niger*, *P. funiculosum* i *P. verrucosum* var. *cyclopium* su pokazali potpunu rezistenciju na sekrete vrsta *C. (P.) coriaceus* i *A. (A.) parallelepipedus*. Takođe, u slučaju testiranja sekreta vrste *C. (P.) coriaceus*, nije zabeleženo dejstvo na *T. viride*.

5.2. Antitumorski i citotoksični potencijal sekreta pigidijalnih žlezda odabranih vrsta trčuljaka i drugih produkata tvrdokrilaca

Dosadašnja ispitivanja antitumorskog potencijala produkata insekata su bila ograničena na već pomenute polipeptide prisutne u hemolimfi tvrdokrilaca srodnih trčuljcima, ali i drugih insekata. Interesantno je da ovi polipeptidi još nisu ispitani u domenu citotoksičnosti kod pripadnika porodice Carabidae, međutim, ustanovljeno je da predstavnici srodnih porodica tvrdokrilaca, poput Staphylinidae (*Paederus fuscipes* Curtis, 1826), u hemolimfi proizvode bioaktivna jedinjenja, poput pederina, koji poseduje citotoksično dejstvo i sprečava sintezu DNK lanaca i polipeptida u minimalnim koncentracijama (Samani et al., 2014). Međutim, fokus ove studije su prvenstveno sekreti sa pretpostavljenom odbrambenom ulogom, čija su sekundarna dejstva gotovo neispitana. Unutar hemijskog sastava ovih sekreta se mogu identifikovati 1,4-benzokinoni i različiti alkani, alkeni i alkadieni, poput pentadekana, (*Z*)-8-heptadekana 9 ili (7*Z*,9*Z*)-7,9-heptadekadiena (Francke & Dettner, 2005). Naime, poznato je da produkti koji u svom sastavu sadrže benzokinone pokazuju određen stepen citotoksičnosti na tumorske ćelije. Tako, na primer, vrsta *B. rynchopetera* (Tenebrionidae) sintetiše u svojim izlučevinama jedinjenja poput 2-metil-2,5-cikloheksadien-1,4-diona i 2-etil-2,5-cikloheksadien-1,4-diona, kao i znatnu količinu benzokinona. U skorije vreme je potvrđeno da smeša ovakvih jedinjenja pokazuje antiproliferativni efekat kod ćelijskih linija humanog kancera želuca (AGS), kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2), hepatocelularnog karcinoma (HepG2), glioma (U251) i hepatoma (Bel 7402) (Xiao et al., 2017). Prethodno je pomenuto da se ova vrsta tvrdokrilaca

učestalo upotrebljavala u tradicionalnoj kineskoj medicini za lečenje gastritisa, groznica i tumora, što je slučaj i sa vrstom *Ulomoides dermestoides* (Fairmaire, 1893) (Tenebrionidae) (Seabrooks & Longqin, 2017). Naime, dihlorometan, izolovan iz izlučevina *U. dermestoides*, deluje inhibitorno na proliferaciju linije epitelijalnih ćelija humanog karcinoma pluća (A549) (Crespo et al., 2011, citirano u Seabrooks & Longqin, 2017). Benzokinoni su odavno pronađeni i u sekretima pigidijalnog žlezdanog kompleksa trčuljaka, i to u okviru tribusa Brachinini (Eisner et al., 1977), što podstiče ideje o ispitivanju antitumorskog potencijala sekreta pigidijalnih žlezda ove grupe tvrdokrilaca. Kada su u pitanju sekreti pigidijalnih žlezda predstavnika Carabidae, takođe se zapažaju jedinjenja koja mogu biti odgovorna za ovakvu biološku aktivnost. Naročito se moramo osvrnuti na relativni procentalni udeo već pomenutih kratkolančanih karboksilnih masnih kiselina, poput izobutirične kiseline u sastavu sekreta vrste *A. (A.) parallelepipedus* (0,4%) (Lečić et al., 2014) i izobutirične (0,3%), butirične (0,2%) i 2-metil butirične (0,2%) kiseline u sastavu sekreta vrste *C. (E.) ullrichii* (Nenadić et al., 2016a). Naime, pojedini autori sugerišu na postojanje antiproliferativnog efekta butirične kiseline i njenih derivata, kao i izobutirične kiseline na određene humane tumorske ćelije (Nudelman et al., 1991; Entin-Meer, 2005; Kurata et al., 2012). Utvrđeno je da butirična kiselina i njeni derivati, poput (pivaloiloksi)metil butirata, *in vitro* inhibiraju proliferaciju i diferencijaciju humane ćelijske linije HL-60 (mijeloidna leukemija) (Kasukabe et al., 1997). Takođe, (pivaloiloksi)metil butirat je nakon testiranja citotoksičnosti pokazao određeni stepen antitumorske aktivnosti na primarni kancer melanoma (B16F0) (Nudelman et al., 1992). Ovakve studije su pronašle i kliničku primenu, s obzirom da je pokazano da visoke doze ove kiseline nisu toksične. Naime, jednom prilikom utvrđeno je da tretman visokim dozama butirične kiseline kod dece sa gore navedenim oboljenjem izaziva privremenu remisiju, što se pokazalo kao dobar rezultat (Nudelman et al., 1992). Među derivatima koji se koriste u srodnim studijama, nalazi se i natrijum butirat, koji se pokazao kao inhibitor histonske deacetilaze (HDACi), čija je funkcija uklanjanje acetil grupe sa histonskih repova, čime se indukuje kaskada apoptotskih događaja kod različitih humanih tumorskih ćelijskih linija (Kazemi-sefat et al., 2015). Dakle, masne kiseline kratkog lanca (prevashodno butirična i propionska kiselina) mogu delovati kao modulatori kancera i imunološke homeostaze (Koh et al., 2016). Drugi autori su, takođe, ukazali na slične potencijalne

efekte derivata butirične kiseline, poput inhibicije proliferacije, pojačane ekspresije p21 proteina, indukcije apoptotskih događaja i hiperacetilacije, i to na primeru ispitivanja ćelijskih linija glioma (Entin-Meer et al., 2005). Na osnovu izloženog se može definitivno ustanoviti da ključni mehanizam dejstava ovih kiselina podrazumeva pokretanje apoptotskih događaja, i to verovatno putem povećane ekspresije bax proteina aktivacijom JNK/AP1 puta (Sakurazawa & Ohkusa, 2005).

Bitno je napomenuti da posmatrane masne kiseline i njihovi derivati uglavnom predstavljaju biološke produkte mikrobne fermentacije, te se ova jedinjenja retko ispituju kao produkti drugih organizama, što je pomenuto u prethodnim poglavljima. Stoga se vraćamo na značaj ovih jedinjenja poreklom iz sekreta insekata. Međutim, butirična i izobutirična kiselina se produkuju u vrlo malim relativnim procentualnim udelima unutar smeše sekreta trčuljaka. Time se ne zanemaruje potencijalni uticaj preostalih komponenti sekreta, poput angelinske, benzoeve [*C. (E.) ullrichii*], propionske, krotanske i senecioiske kiseline [*A. (A.) parallelepipedus*], dok su metakrilna i tiglinska kiselina prisutne kod sekreta obe navedene vrste u većem procentualnom udelu [čak 78,7% u smeši sekreta *C. (E.) ullrichii*] (Nenadić et al., 2016a). Stoga se može pretpostaviti da je u pitanju potencijalni sinergizam dejstva svih konstituenata unutar smeše.

Testirani sekreti svih posmatranih vrsta trčuljaka u ovoj studiji nisu pokazali značajnu antiproliferativnu aktivnost *in vitro* u odnosu na primarnu netumorsku ćelijsku liniju hepatocita (PLP2), drugim rečima, pokazali su zanemarljiv stepen citotoksičnosti u odnosu na netumorske ćelije (Nenadić et al., 2018). Sa druge strane, kada je u pitanju antikancerogeni potencijal, uviđa se da sekreti vrsta *A. (A.) parallelepipedus* i *C. (E.) ullrichii* nisu dosegli 50% inhibicije ukupne ćelijske proliferacije, što je slučaj i sa sekretom vrste *C.(P.) coriaceus*, unutar koga su identifikovane samo metakrilna i tiglinska kiselina, čije uloge nisu u potpunosti poznate (Nenadić et al., 2016a). Naime, Kurata et al. (2012) su ukazali na značajan stepen citotoksičnog dejstva metakrilne kiseline u odnosu na netumorske ćelije fibroblasta, ali ovakvi rezultati se moraju potkrepiti dodatnim studijama. Sekret vrste *L. (P.) punctatus* skoro da je postigao 50% inhibicije ćelijske proliferacije ($42,77 \pm 3,56\%$) *in vitro*, i to na koncentraciji od 0,1 $\mu\text{g/mL}$, na primeru ćelijske linije adenokarcinoma dojke (MCF7). Naime, prisustvo mravlje i sirćetne kiseline u sastavu ovog sekreta može biti odgovorno za ovakav rezultat (Huang et al., 2011).

Pozitivna kontrola, antikancerogeni lek elipticin, pokazao je mnogo veći antiproliferativni efekat na tumorske ćelije, jer je nakon tretmana ćelijskih linija ovim agensom postignuto 50% inhibicije ukupne ćelijske proliferacije svih testiranih ćelijskih linija, međutim, treba uzeti u obzir da je sekret vrste *L. (P.) punctatus* postigao približno GI₅₀ na oko 12 puta manjoj koncentraciji u odnosu na pozitivnu kontrolu, kada je u pitanju MCF7 linija.

Rezultati ove studije otvaraju mogućnost za dalja ispitivanja antimikrobnog dejstva, prevashodno dejstva pojedinačnih jedinjenja, koja potencijalno mogu biti odgovorna za ovakvu aktivnost, ili se, pak, ova biološka aktivnost može pripisati sinergističnom dejstvu većeg broja komponenti, kako je već pomenuto. Takođe, posmatranje interakcija ovih jedinjenja unutar smeša bi moglo biti značajno u ovakvim studijama. Sami biohemijski putevi i molekularni mehanizmi kojima ova jedinjenja ostvaruju svoju funkciju su presudni u konačnom razumevanju antikancerogenog potencijala, te se tako otvaraju mogućnosti u pravcu ispitivanja biohemijskih puteva koji se ostvaruju prilikom tretiranja ćelija ovakvim prirodnim agensima *in vitro*, što bi bilo dalje upotunjeno *in vivo* testiranjima. Ovakve studije potencijalno mogu značajno doprineti farmakološkim i biomedicinskim ispitivanjima.

5.3. Korelacija između antimikrobne aktivnosti i antitumorskog i citotoksičnog potencijala jedinjenja sekreta pigidijalnih žlezda trčuljaka

Biološke aktivnosti koje su tematika ove disertacije su neosporno međusobno asocirane, što se ogleda prevashodno u povezanosti i interferiranju molekularnih mehanizama, koji posreduju u procesu tih dejstava (Koh et al., 2016; Sahoo & Fujiwara, 2016), a samo ispitivanje citotoksičnosti je neosporno povezano sa utvrđivanjem antimikrobnog potencijala, te je nezaobilazno kod ovakvih proučavanja. Citotoksična studija u ovoj disertaciji ukazuje na veoma nizak stepen citoksičnosti ispitivanih sekreta trčuljaka [*A. (A.) parallelepipedus*, *C. (P.) coriaceus*, *C. (E.) ullrichii*, *L. (P.) punctatus*] na netumorske ćelije. Ovakvi rezultati se mogu smatrati pozitivnim kada ih dovedemo u korelaciju sa antimikrobnom studijom, čime se pretpostavlja da inhibicija rasta ispitanih bakterijskih sojeva i mikromiceta nije posledica citotoksičnosti sekreta, već biološke antimikrobne aktivnosti istih. Sa druge strane, ovi sekret

nisu pokazali značajan antitumorski potencijal, kao što je pomenuto u prethodnom poglavlju. Izuzetkom se može smatrati sekret vrste *L. (P.) punctatus*, koji je postigao približno 50% inhibicije ukupne ćelijske proliferacije MCF7 tumorske ćelijske linije, uz istovremeno zabeleženi visoki antimikrobni (antibakterijski i antifungalni) potencijal u odnosu na humane patogene, kao i nizak citotoksični efekat na netumorske ćelije. Kada se razmotri pojedinačno antifungalna aktivnost, u pojedinim slučajevima su MIK vrednosti bile nekoliko desetina puta manje od pozitivne kontrole, čime je sekret pigidijalnih žlezda ove vrste pokazao bolje dejstvo u odnosu na komercijalni antimikotik ketokonazol. Dakle, u slučaju ovog sekreta, razmatramo paralelno i potencijalnu antitumorsku aktivnost i antimikrobno dejstvo.

Povezanost antimikrobne i antitumorske aktivnosti je najčešće konsekvencija hemijskog sastava sekreta i dejstava pojedinačnih organskih komponenti, koje imaju višestruke aktivnosti, poput kratkolančanih masnih kiselina, a koje funkcionišu kao inhibitori histonske deacetilaze (HDACi), čime mogu delovati kao modulatori kancera i imunološke homeostaze istovremeno (Kazemi-sefat et al., 2015; Koh et al., 2016). Interesantno je da u sastavu sekreta *L. (P.) punctatus* nije zabeleženo prisustvo kratkolančanih masnih kiselina, ali su identifikovane zasićene (palmitinska, stearinska) i nezasićene (oleinska) masne kiseline (Vesović et al., 2015), koje mogu biti odgovorne za antitumorski potencijal ovog sekreta, kako su već prethodno dokumentovane antitumorske aktivnosti ovih jedinjenja (Harada et al., 2002; Carrillo et al., 2012; Mericli et al., 2017). Tako su, npr., Carrillo et al. (2012) u svojoj studiji predstavili mehanizam kojim oleinska kiselina ostvaruje antitumorski efekat. Naime, ova masna kiselina učestvuje u supresiji prekomerne ekspresije onkogena HER2 (erbB-2), koji ima ključnu ulogu u progresiji i metastazama kod nekoliko humanih karcinoma. Takođe, oleinska kiselina može indukovati kaskadu apoptotičkih događaja u ćelijama karcinoma, što se najčešće pojašnjava mehanizmima koji stoje iza ovih procesa. Ti mehanizmi mogu biti povezani sa povećanjem intracelularne ROS produkcije ili aktivnosti kaspaze 3 (Carrillo et al., 2012). Interesantno je da sekret *L. (P.) punctatus* sadrži u svom sastavu i veliki relativni procentualni udeo unidekana (40,4%) i dodecil acetata (34,2%) (Vesović et al., 2015), čija aktivnost nije poznata.

Slični zaključci proizilaze i kada posmatramo različite biološke aktivnosti jedinjenja poreklom iz biljnih ekstrakata, naročito kada govorimo o sinergizmu većeg broja jedinjenja u smešama (Cheesman et al., 2017).

Ovakve bazične studije otvaraju ideje ka dubljim i detaljnijim istraživanjima, koja bi omogućila sintetisanje analoga u budućnosti (Chen et al., 1997). Sintetički analozi ovakvih, biološki aktivnih jedinjenja iz prirode, mogu biti adekvatniji u terapijskoj primeni. Tako su Ahmad et al. (2009) ispitivali krvni antimikrobni peptid BMAP-27, izveden iz katelicidina, a koji pokazuje efikasnu mikrobicidnu aktivnost i umerenu citotoksičnost prema eritrocitima. Naime, ustanovljeno je da se potencijalno mogu konstituisati analozi ovog peptida, zamenom leucinskog ili fenilalaninskog ostatka sa alaninom. Ovi analozi su pokazali značajno smanjenu citotoksičnost prema eritrocitima (hRBC) i mišijim 3T3 ćelijama u poređenju sa *wt* peptidom. Zanimljiva je činjenica da se prilikom komparacije BMAP-27 peptida i sintetičkih analoga primećuje slična antibakterijska aktivnost na odabrane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske sojeve, koja se ogleda u izazivanju permeabilnosti njihovih ćelija (Ahmad et al., 2009).

Međutim, moramo uzeti u obzir da sama inflamacija i inflamatorni odgovor mogu biti asocirani sa razvojem tumora u ljudskom organizmu, i to posredstvom aktivacije imunih ćelija, uključujući makrofage, neutrofile, dendritske, NK ćelije i T i B limfocite. U dodatku pomenutog, urođene imune ćelije, npr. granulociti (neutrofili, bazofili i eozinofili) i mastociti takođe predstavljaju istaknute komponente premalignih i malignih tkiva i funkcionalno doprinose razvoju kancera, prevashodno zbog oslobađanja potentnih rastvorljivih medijatora, što je presudno u regulaciji preživljavanja i proliferaciji ćelija, angiogenezi, tkivnom remodeliranju, metabolizmu i genomskom integritetu (De Visser, 2006; Van Kempen et al., 2006). Takođe, oslobađanje proinflamatornih citokina, hemokina i proangiogenih medijatora, poput faktora nekroze tumora α (TNF α), interleukina 1 (IL-1) i interleukina 6 (IL-6), igra značajnu ulogu u postinflamatornom odgovoru, što se uobičajeno postavlja u korelaciju sa genezom kancera. Osim navedenog, presudnu ulogu u imunološkom odgovoru i propagaciji kancera nalazimo kod signalnih puteva koji su usko korelisani sa proinflamatornim nuklearnim faktorom transkripcije kapa B (NFkB). Naročito treba istaći da ovaj faktor ima dvojaku ulogu u razvoju tumora, što se ogleda u prevenciji apoptoze ćelija sa malignim potencijalom i stimulaciji produkcije

proinflammatornih citokina od strane ćelija mijeloidnog porekla kod tumora (De Visser, 2006). Veza između imunih ćelija i kancera je poznata duže od jednog veka. Tako, npr. ekstenzivna infiltracija NK ćelija u ljudski želudac ili kolorektalni karcinom je povezana sa progresom tumora. S druge strane, maligna tkiva sadrže infiltrate drugih vrsta imunih ćelija, kao što su makrofazi, kada je u pitanju humani karcinom dojke, i mastociti kod humanog adenokarcinoma pluća i melanoma, što je asocirano sa nepovoljnim kliničkim prognozama (De Visser, 2006). Stoga bi bilo od velikog značaja pronaći rešenje u prirodi u vidu adekvatne formule kojom bi se istovremeno mogao postići antiproliferativni efekat na tumorsko tkivo, ali u okviru kontrolisanog imunskog odgovora. Danas su sve učestalije antimikrobne terapije u lečenju karcinoma, što podrazumeva suzbijanje bakterija koji su asocirani sa karcinomom. Tako npr. infekcije izazvane bakterijom *Bartonella* spp. može indukovati prekomernu proliferaciju ćelija, što se sprečava antibioticima. Antibiotička terapija je uobičajena praksa kod MALT-limfoma (limfom sluzokože), ali i kancera želuca. Međutim, ovi tretmani su efikasni samo u kombinaciji sa konvencionalnim terapijama (Alibek et al., 2012).

5.4. Ekološki odnosi trčuljaka i mikroorganizama iz njihovih staništa

Kako su prethodna istraživanja u sklopu ove studije ukazala na prisustvo antimikrobnog potencijala sekreta pigidijalnih žlezda različitih vrsta trčiljaka na humane patogene (Nenadić et al., 2016a, 2016b, 2017a), otvara se pitanje sekundarne funkcije njihovih sekreta. Premda je osnovna uloga sekreta ovih žlezda trčuljaka odbrana od predatora, ne tako davno je ustanovljen i antimikrobni potencijal istih (Giglio et al., 2009). Osim što postojanje ovakvih studija već objašnjava prvobitnu inspiraciju za ispitivanje biomedicinskog aspekta u sklopu ove disertacije, otvaraju se i ideje za ispitivanja antimikrobnog dejstva sekreta pigidijalnih žlezda trčuljaka na mikroorganizme izolovane iz okruženja ispitivanih insekata, čime bi se potvrdili rezultati prethodnih studija i naposljetku pojasnila biološka aktivnost u ekološkom kontekstu. Odgovor se može dobiti uzevši u obzir evolutivnu adaptaciju na prisustvo patogenih mikroorganizama, prevashodno u stacionarnoj fazi tokom ontogenetskog razvića insekata. Jedinствен primer u

svetu trčuljaka jeste vrsta *Carabus lefebvrei* Dejean, 1826, kod koje se zapaža intenzivna produkcija sekreta abdominalnih žlezda u stadijumu lutke (Giglio et al., 2009).

Već je ranije pomenuto da insekti poseduju različite adaptacije na prisustvo patogena u njihovom staništu (Ravi et al., 2011), kao što su inducibilni humoralni odbrambeni sistem (Toll i IMD signalna kaskada, usled čega dolazi do aktivacije gena koji kodiraju za antimikrobne proteine), strukturne fizičke barijere poput kutikule i peritrofične membrane i melanizacija (deponovanje pigmenta melanina u ćelije patogena) (Ravi et al., 2011; Pandey, 2012). Međutim, u odbrani od potencijalnih patogena iz okoline, insekti koriste i organska jedinjenja koja se sintetišu u pigidijalnim egzokrinim žlezdama (Blum, 1981), kao i oralnim i analnim sekretima (Hoback et al., 2004). Kada se osvrnemo specifično na egzokrine izlučevine kod insekata i njihovu odbrambenu ulogu, naročito kada je u pitanju odbrana od entomopatogena, primetićemo veliki nedostatak u istraživanjima u ovoj oblasti (Hoback et al., 2004).

Konkretno, kada su u pitanju sekreti pigidijalnih žlezda, do sada je utvrđeno prisustvo odbrambene uloge istih od patogena koji se mogu naći u istom staništu, u slučaju nekih vrsta Hydradephaga. Pretpostavlja se da ovi sekreti inhibiraju rast i razvoj mikroorganizama iz akvatične sredine, a koji se često mogu identifikovati kao kontaminanti respiratornih kutikularnih struktura ovih insekata (Kovac & Maschwitz, 1990). Sa druge strane, metaboliti jedne vrste bakterija roda *Bacillus* (*Bacillus sphaericus*) mogu biti izuzetno toksični za neke vrste insekata poput *Anopheles aconitus* Dönitz, 1902, što može biti značajno u biokontroli larvi ovih komaraca, a samim tim i u suzbijanju malarije koju ovi vektori prenose (Suryadi et al., 2016). Međutim, generalno posmatrano, odnos nekih vrsta insekata i mikroorganizama se može drugačije sagledati s obzirom da brojne bakterije imaju značajnu ulogu u digestiji kod insekata, ali i detoksikaciji od sekundarnih produkata biljaka. Chellaram et al. (2012) su ukazali na još jednu, antagonističku funkciju pojedinih mikroorganizama izolovanih iz digestivnog trakta skakavaca. Naime, u crevnom sistemu ovih insekata se mogu identifikovati bakterije, poput *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp. i *E. coli*. Radi se, zapravo, o crevno asociranim mikrobima koji sintetišu sekundarne metabolite i na taj način sprečavaju infekcije koje mogu biti prouzrokovane mikroorganizmima iz spoljnog staništa.

U ovom delu studije je specifično fokus stavljen na pećinsko stanište (Ogorelička pećina, Sićevo, blizu Niša), jer ovu sredinu karakteriše veliki diverzitet mikroorganizama koji dolaze u kontakt sa vrstom *L. (P.) punctatus*, što direktno ukazuje na potencijalno razvijenu strategiju navedenog trčuljka u cilju zaštite od mikroorganizama iz istog staništa. Na funkciju odbrane od potencijalnih patogenih mikroorganizama može upućivati i položaj pigidijalnih žlezda ove vrste, koje su usled orijentisanosti ventralnog posteriornog dela abdomena ka tlu, u neposrednom kontaktu sa guanom. Hipotetički, antimikrobni potencijal sekreta ove vrste se može dovesti u korelaciju sa prisutnošću određenih organskih jedinjenja u samoj smeši sekreta, kao što su mravlja (19,4%) i sirćetna kiselina (0,6%) (Glassman, 1948; Thompson & Hinton, 1997; Desbois & Smith, 2010; Lečić et al., 2014; Nenadić et al., 2016b), što je već prethodno pomenuto.

Guano predstavlja mikrostanište, specifično prevashodno po velikom diverzitetu mikroorganizama, od kojih najveći broj pripada izuzetno patogenim bakterijama i mikromicetama (Korine et al., 1999). Veoma je značajan kada se radi o ekološkim studijama unutar pećina, pa i u domenu ekologije insekata. Visok mikrobijalni diverzitet guana jeste posledica specifičnih sredinskih uslova, odnosno visoke temperature i vlažnosti unutar guana (Rahmawati et al., 2016). Interesantno je da je velika većina identifikovanih bakterija iz guana uključena u proces nitrifikacije, a pored navedenog, bitno je napomenuti da ove bakterije poseduju i gene koji kodiraju različite hitinolitičke enzime (Patil, & Jadhav, 2015), s obzirom da nerastvoreni hitin koriste kao glavni izvor ugljenika. Ovaj podatak je značajno korelisan sa negativnim uticajem ovakvih mikroorganizama na opstanak insekata. Samim tim, danas nailazimo na veliki potencijal njihovog korišćenja u biološkoj kontroli insekata (Bernie, 1989; Kaya et al., 2014; Rahmawati et al., 2016; Padda et al., 2017).

Postojanje antimikrobnog svojstva ovih sekreta u odnosu na mikroorganizme izolovane iz ovakve sredine ukazuje na razvijenu strategiju zaštite i odbrambenog odgovora ovih insekata kada su u kontaktu sa potencijalnim patogenima.

5.4.1. Antibakterijska aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste *L. (P.) punctatus* na izolate iz guana

Guano se odlikuje velikim mikrobiološkim diverzitetom, naročito kada su bakterije u pitanju. Premda je ovakva sredina još sedamdesetih godina prošlog veka označena kao strukturno jednostavna, zahvaljujući velikom diverzitetu mikroorganizama, ona obrazuje jedinstven ekosistem (Poulson, 1972). Prvi podaci o mikrobiološkom sastavu guana datiraju iz 1914. godine (Miller, 1914). Međutim, danas postoji veliki broj različitih studija koje upućuju na mikrobijalni sastav guana, a može se uočiti da dolazi do preklapanja kada su određeni taksoni u pitanju. Ono što je neosporno jeste da se unutar ove mikrobiološke zajednice može identifikovati ogroman broj predstavnika različitih bakterijskih razdela, poput Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Crenarchaeota i Planctomycetes (De Mandal et al., 2015; Banskar et al., 2016). De Mandal et al. (2015) su utvrdili da se kao najdominantniji razdeli bakterija unutar zajednice mikroorganizama guana Roberove pećine (Mahabaleshvar, Maharashtra, Indija) mogu označiti Chloroflexi (29,97%) i Actinobacteria (22,55%). Kao najzastupljeniji taksoni su označeni predstavnici porodica Enterococcaceae (dominantan rod *Enterococcus*), Bacillaceae (dominantan rod *Bacillus*) i Escherichiaceae (Banskar et al., 2016; Newman et al., 2018).

Kako je u rezultatima pomenuto, u prethodnoj našoj paralelnoj zajedničkoj studiji (Kabić, 2016) je utvrđen i analiziran mikrobijalni diverzitet guana, što je predstavljeno filogenetskim stablom u **Prilozima ii a i ii b** disertacije. Kabić (2016) je u guanu Ogoreličke pećine utvrdila prisustvo predstavnika rodova *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Sporosarcina*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Citrobacter*, *Kluyvera* i *Escherichia*. Rezultati filogenetske analize na osnovu gena 16S rRNK među izolatima uzoraka guana su upućivali i na identifikovane potencijalne patogene i antagoniste. Izolati koji su dominantno prisutni u svih pet posmatranih prostorija Ogoreličke pećine su upotrebljeni pri testiranju antimikrobne aktivnosti sekreta vrste *L. (P.) punctatus* u ovoj disertaciji (*E. eurekensis*, *R. jialingiae*, *M. yunnanensis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *L. sphaericus*, *P. polymyxa*, *V. arvi*, *E. fergusonii*, *P. putida*, *C. freundii*, *S. proteamaculans*).

Tako je u ovoj studiji, *in vitro* antibakterijski esej ukazao na određen stepen antibakterijske aktivnosti sekreta pigidijalnih žlezda *L. (P.) punctatus* na 12 odabranih izolata. Uočeno je da su Gram-pozitivni izolati generalno pokazali veći stepen senzibilnosti u poređenju sa Gram-negativnim sojevima, od kojih je *E. fergusonii* pokazala izraženu osetljivost prema sekretu, skoro duplo veću u poređenju sa testiranim antibiotikom. Spektrofotometrijskim očitavanjem MIK i MBK vrednosti je potvrđeno da se kao najosetljiviji izolat ovog testiranja pokazao *E. eurekaensis*, sa najnižom zabeleženom MIK vrednošću od 0,007 mg/mL, uz istovremenu rezistentnost prema antibiotiku streptomycinu, pri najvećoj testiranoj koncentraciji. Ovde je bitno pomenuti da se u sastavu bakterijske zajednice guana, mogu naći i patogeni koji su odgovorni za različita oboljenja značajna u oblasti humane medicine (određeni predstavnici rodova *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i *Citrobacter*). Time možemo objasniti pozadinu značajnog antibakterijskog potencijala sekreta vrste *L. (P.) punctatus* u odnosu na humane patogene, a koji je utvrđen u sklopu prvog dela ove doktorske disertacije (Nenadić et al., 2016b). Naime, laboratorijski soj *L. monocytogenes* i klinički izolat *E. cloacae* su pokazali sličan stepen otpornosti u odnosu na pozitivnu kontrolu streptomycin, kada uporedimo sa rezultatima *in vitro* testiranja antibakterijskog efekta sekreta *L. (P.) punctatus*, koji je pokazao približno isti antibakterijski potencijal u odnosu na pomenutu pozitivnu kontrolu (Nenadić et al., 2016b). Ova biološka aktivnost sekreta mogla bi da predstavlja posledicu dejstva masnih kiselina (mravlje, sirćetne, palmitinske, oleinske) (Lečić et al., 2014; Vesović et al., 2015; Nenadić et al., 2016b).

Ovi sekreti sa pretpostavljenom odbrambenom funkcijom bi mogli da se potencijalno primene i u domenu medicine. Dakle, ova studija otvara mogućnosti za dalja istraživanja mehanizama dejstva ovih sekreta na potencijalne entomopatogene iz iste sredine, što bi detaljnije približilo ovu tematiku stručnjacima, bilo da se radi o ekološkom, bilo o medicinskom aspektu.

5.4.2. Antifungalna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste *L. (P.) punctatus* na mikromicete izolovane sa zidova pećine i iz guana

Deo studije koji se odnosi na posmatranje antifungalnog potencijala sekreta pigidijalnih žlezda troglofilne vrste *L. (P.) punctatus* u odnosu na mikromicete izolovane sa zidova Ogoreličke pećine, neposredno u blizini guana, ukazuje po prvi put na postojanje antifungalne aktivnosti ovih izlučevina. Time se može pretpostaviti da sekundarna funkcija sekreta pigidijalnih žlezda ove vrste se može odnositi na posebnu strategiju odbrane od mikromiceta, odnosno potencijalnih entomopatogena iz istog ekološkog staništa. Identifikovani izolati mikromiceta, poput *T. duclauxi*, *A. brunneouniseriatus*, *R. stolonifer* i *T. viride*, pokazali su znatniju rezistentnost na dejstvo testiranog sekreta u odnosu na *Penicillium* sp (Nenadić et al., 2017a). To bi moglo hipotetički da ukazuje na interakciju ove vrste trčuljka sa vrstama mikromiceta, koje su usled čestog kontakta sa insektom razvile otpornost na prisustvo njegovog sekreta.

Vanderwolf et al. (2013) sugerišu da se među najučestalijim rodovima gljiva, koji se mogu izolovati iz pećinskih staništa, pored *Histoplasma* i *Geomyces*, ubrajaju i *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Beauveria*, *Geotrichum*, *Candida*, *Stachybotrys* i dr. Predstavnicima pomenutih rodova su uključeni u različite ekološke interakcije sa insektima. Naročito su vrste redova Lepidoptera (porodica Nymphalidae, Oecophoridae, Noctuidae, Geometridae i dr.), Hymenoptera i Diptera izložene entomofagnim mikromicetama, jer obično koriste pećine kao skloništa u toku hibernacije. Kubátová & Dvořák (2005) su ustanovili da u najučestalije entomopatogene gljive koje se mogu naći u pećinskim staništima spadaju *Acremonium bacillisporum* (specifični patogen vrsta porodice Culicidae), *Lecanicillium muscarium* [specifični patogen vrste *Scoliopteryx libatrix* (Linnaeus, 1758) iz porodice Erebidae] i *Cordyceps* sp.

Negativni uticaj entomopatogena se obično odnosi na ometanje razvoja i smanjenje fekunditeta, što je pokazano na primeru vrste gljive *Beauveria bassiana*, koja predstavlja vrlo čestog entomopatogena, i to različitih vrsta tvrdokrilaca, poput *Tribolium castaneum* Herbst, 1797 i *Ulomoides dermestoides* (Fairmaire, 1893) (Tenebrionidae) (Pedrini et al., 2010).

Međutim, različite vrste mikromiceta mogu koristiti pećinske insekte i kao izvor nutrijenata (npr. predstavnici rodova *Isaria* i *Beauveria*) (Vanderwolf et al., 2013).

Kada su u pitanju guanofilne mikromicete, mikolozi se najčešće na terenima susreću sa vrstom *Histoplasma capsulatum*. Međutim, Nieves-Rivera et al. (2009) su identifikovali značajan broj mikromiceta izolovanih iz guana pećina u jugozapadnom delu Portorika, među kojima se pomenuta vrsta nije našla. Interesantno je da su ovi autori (2009) iz guana izolovali vrstu *R. stolonifer*, koja je u našoj studiji identifikovana kao mikromiceta izolovana sa zidova Ogoreličke pećine. U prethodnoj našoj nezavisnoj studiji (nepublikovani podaci), utvrđen je diverzitet mikromiceta unutar guana upravo pomenute pećine, što je predstavljeno filogenetskim stablom u prilogu disertacije (**Prilog iii**). Od ukupno 30 uzoraka guana iz 5 prostorija pećine (**Prilog iv**), dokumentovane su mikromicete koje većinski pripadaju podrazdelu Ascomycotina (87,5%). *Mucor racemosus* je identifikovan kao jedini predstavnik podrazdela Zygomycotina, dok je *Peniophora lycii* dokumentovana kao jedina vrsta koja pripada podrazdelu Basidiomycotina. *Meyerozima guilliermondii* je bila jedina identifikovana vrsta kvasca koja je dokumentovana u ovom istraživanju. Najveća broj guanofilnih gljiva u Ogoreličkoj pećini su činili predstavnici rodova *Penicillium* i *Aspergillus* (25%).

Interesantno je da *T. viride* opstaje na zidovima pećina, ali i kao guanofilni mikrob. Ova mikromiceta je pokazala veći stepen senzibiliteta na dejstvo sekreta *L. (P.) punctatus* i u slučaju testiranja na humane patogene, dok je ista vrsta mikromiceta kao prirodni pećinski izolat bila oko 100 puta rezistentnija u odnosu na ispitivani sekret.

Kada je u pitanju testiranje antifungalnog efekta ovog sekreta na guanofilne vrste mikromiceta (*M. guilliermondii*, *A. flavus*, *P. citrinum* i *T. harzianum*), sve ispitane vrste su ostvarile sličan stepen senzibiliteta u odnosu na testirani sekret. Posebno se ističu izolati *P. citrinum* (MIK 0,303 mg/mL, MFK 0,6 mg/mL) i *T. harzianum* (MIK 0,152 mg/mL, MFK 0,303 mg/mL), koji su pokazali viši stepen rezistencije u odnosu na antimikotik nistatin (MIK 0,503 mg/mL, MFK 1,003 mg/mL za *P. citrinum*; MIK 0,252 mg/mL, MFK 0,757 mg/mL za *T. harzianum*). *Aspergillus flavus* je u ovom slučaju pokazao veću rezistenciju u odnosu na testirani sekret u poređenju sa laboratorijskim izolatom ove vrste (Nenadić et al., 2016b). Podaci o

dejstvu pojedinačnih hemijskih komponenti u sastavu sekreta vrste *L. (P.) punctatus*, kao i o dejstvu izlučevina drugih vrsta trčuljaka i tvrdokrilaca, još uvek nisu prisutni u dostupnoj u literaturi.

Ovaj deo studije u celosti sugerise na postojanje pretpostavljene odbrambene funkcije sekreta pigidijalnih žlezda posmatrane vrste trčuljka u odnosu na mikroorganizme koji nastanjuju isto ekološko stanište. Hipotetički se može istaći da, pored pretpostavljene odbrane od potencijalnih predatora, evolucija je ovu adaptaciju razvijala i u pravcu poboljšanja strategije odbrane jedinki od mikroorganizama, tj. potencijalnih entomopatogena iz istog staništa.

Prethodno razmotreni rezultati otvaraju mogućnost za dalja istraživanja na polju odbrane različitih, ne samo troglofilnih vrsta trčuljaka od entomopatogenih mikroorganizama, kao i za istraživanja koja se tiču samog mehanizma odbrane i rezistencije bakterija i mikromiceta. Ovakve studije nas ponovo vraćaju na biomedicinski značaj, čije obrazloženje leži upravo unutar ovog aspekta.

5.5. Morfo-anatomska karakterizacija i histološka analiza pigidijalnog žlezdanog kompleksa odabranih vrsta trčuljaka; primena skenirajuće elektronske i dvofotonski pobuđene nelinearne mikroskopije

Kada se osvrnemo na morfološki aspekt pigidijalnog žlezdanog sistema kod porodice Carabidae, do sada su postignuta značajna saznanja primenom konvencionalne svetlosne mikroskopije (KSM) (Forsyth, 1972; Kanehisa & Murase, 1977; Balestrazzi et al., 1985; Bonacci et al., 2011; Giglio et al., 2011). Detaljniji uvid u spoljašnju morfologiju i unutrašnju morfo-anatomiju je prvi put postignut upotrebom SEM i TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije, u ovoj studiji. Prethodno podrazumeva precizniju opservaciju strukturiranosti površine samog tkiva posmatranih žlezda, što uzima u obzir raspored i orijentaciju uočljivih snopova mišićnih vlakana zida rezervoara, zatim, tačniji i precizniji promer najsitnijih struktura, a koje imaju značaj u fiziologiji ovog sistema. Pomenuto se odnosi na određivanje preciznijeg dijametra sekretornih ćelija i lobusa, najsitnijih radijalnih sabirnih kanala, traheola koje aerišu ceo

kompleks, zatim na precizniji promer glavnog sabirnog kanala i eferentnog kanala, koji izvodi sekret u spoljašnju sredinu. Morfološka studija nalazi značajno mesto unutar ovih istraživanja kako se odgovori na mnoga pitanja u vezi sa fiziologijom ovog sistema pronalaze upravo u ovom aspektu.

5.5.1. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste *A. (A.) parallelepipedus*

Abax (A.) parallelepipedus poseduje takav pigidijalni sistem, kod koga su glavni sabirni kanal, rezervoar i eferentni kanal tipičnog izgleda koji je karakterističan za predstavnike tribusa Pterostichini (Forsyth, 1972). Naime, rezervoari pigidijalnih žlezda predstavnika ovog tribusa, kao i čitave potporodice Pterostichinae, karakterišu se dvorežnjevitom strukturom (Forsyth, 1972). Ovakva struktura podrazumeva postojanje useka u distalnom delu rezervoara, kojim su jasno podeljeni spoljašnja površina i lumen ove strukture na dva dela, što je kod vrsta roda *Abax* Bonelli, 1810 slabo uočljivo, te se na SEM mikrografijama i mikrografijama TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije kod vrste *A. (A.) parallelepipedus* ne zapaža takva forma. Naime, rezervoari ove vrste su više ili manje nepravilne do trougaone ili vrećaste forme. U prethodnim studijama, na mikrografijama dobijenim klasičnom svetlosnom mikroskopijom se uočava nešto drugačija forma rezervoara pigidijalnih žlezda ove vrste, u vidu presavijenih struktura bubrežastog izgleda (Nenadić et al., 2016a). Na dobijenim SEM mikrografijama se primećuje da je tkivo žlezda fragilno i transparentno. Forma rezervoara može biti posledica osetljivosti struktura na pripremu tkiva za SEM ili, pak, forma ove strukture varira između jedinki i populacija. Muskulatura rezervoara nije dobro razvijena kao kod predstavnika roda *Carabus* Linnaeus, 1758. Prethodno se može obrazložiti pretpostavkom da su disekovani primerci ove vrste mlade adultne jedinke, kod kojih pigidijalne žlezde nisu u potpunosti impregnirane hitinom, kao što je slučaj kod starijih adulta. Karakteristike zidova su, takođe, tipične za vrste tribusa Pterostichini (Forsyth, 1972). U ovoj studiji su zabeležene prosečne dimenzije rezervoara iznosile oko 1500 µm (dužina) i 900 µm (širina), dok je kod nekih primeraka zabeležena dužina od oko 900 µm (Nenadić et al., 2016a). Treba uzeti u obzir da dimenzije rezervoara prate proporcionalno dimenziju jedinki, koje variraju unutar populacija ove vrste. Mehanizam

sekrecije podrazumeva izbacivanje kapljica do 3 cm razdaljine. To je deset puta manja distanca u odnosu na distance kod vrsta roda *Carabus* (Nenadić et al., 2016a), što se može smatrati posledicom manje razvijenog mišićnog sloja rezervoara. Prethodno je potvrđeno činjenicom da su mišićna vlakna slabo uočljiva na SEM mikrografijama u odnosu na ostale ispitane predstavnike trčuljaka, kod kojih su snopovi vlakana glatke muskulature gusto pakovani. Eferentni kanal je spiralno zadebljao, sa prosečnim dijametrom od 86 μm . Spiralno zadebljanje može fizički doprineti povećanju pritiska u lumenu kanala, a samim tim i povećanju brzine izlučivanja sekreta u spoljašnju sredinu. Takođe, ovi spiralni grebeni najverovatnije sprečavaju spljoštavanje kanala nakon izlučivanja sekreta. U sekretornom delu sistema pigidijalnih žlezda poseduju oko 7 sekretornih lobusa u grupaciji, koji su manje-više sferičnog oblika, sa sistemom kanalića, oko kojih su gusto pakovane sekretorne ćelije. Dijametar pojedinačnih sekretornih lobusa je u proseku oko 60 μm , dok pojedini dosežu i dijametar od 182 μm . Radijalno postavljeni sabirni kanalići povezuju pojedinačne lobuse, kao i same grupacije lobusa. Prosečni dijametar sabirnih kanalića iznosi oko 16,78 μm , dok je dijametar glavnog sabirnog kanala oko 60 μm , što je ustanovljeno TPEF modalitetom nelinearne mikroskopije. Uočava se prisustvo spiralnih zadebljanja kod radijalnih sabirnih kanala, što se objašnjava pretpostavkom da tako izgrađen sistem kanala omogućava veću brzinu protoka tečnosti sekreta iz sekretornog u sabirni deo. U prethodnoj studiji, klasičnom svetlosnom mikroskopijom je ustanovljeno prisustvo oko 20 sekretornih lobusa, manje-više sferičnog oblika, do deset puta većeg prosečnog dijametra u odnosu na dijametar koji smo ustanovili (oko 500 μm), sa asimetričnim lumenom i gusto zapakovanim sekretornim ćelijama (Nenadić et al., 2016a). Broj sekretornih lobusa je u ovoj studiji dostizao preko 20. Prethodno se može pojasniti pretpostavkom da su jedinke, analizirane u ovoj studiji, bile krupnijih dimenzija, te je i dijametar struktura veći kada uporedimo sa rezultatima prethodne studije (Nenadić et al., 2016a). Takođe, može se primetiti da su sekretorni lobusi dobro aerisani, na šta ukazuje prisustvo brojnih traheola kod svih ispitanih delova ovih struktura. Polni dimorfizam u strukturi pigidijalnih žlezda ove vrste nije ustanovljen.

5.5.2. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste *C. (T.) convexus*

Rezervoari pigidijalnih žlezda vrste *C. (T.) convexus* su bubrežastog izgleda, što je karakteristično za sve predstavnike roda *Carabus* (Forsyth, 1972). Zabeležena dužina ovih struktura u ovoj studiji je iznosila oko 1200 μm , a širina oko 650 μm . Poseduju gusto raspoređena, isprepletana vlakna glatke muskulature, koji se protežu u uzdužnim, poprečnim i kosim pravcima. Sekretorni lobusi su uglavnom sferični, ređe izduženi ili ovoidne forme. U grupaciji postoji okvirno 40-60 lobusa. Svaki lobus je izgrađen od gusto pakovanih sekretornih ćelija, radijalno postavljenih oko centralnog lumena, gde se sekreti iz sekretornih ćelija slivaju putem sitnih kanala. Između centralnog lumena i sekretornih ćelija je smešten sloj ćelija koje nose kanal (duct-carrying cells, engl.). Konvencionalnom svetlosnom mikroskopijom je prethodno utvrđen dijametar pojedinačnih lobusa ove vrste, a koji se kreće između 100-200 μm (Vesović et al., 2017), što se podudara sa podacima koji su dobijeni NLM (prosečan dijametar iznosi između 100 μm i 200 μm). Prosečan dijametar pojedinačnog radijalnog sabirnog kanala iznosi oko 9,4 μm . Uočava se da je dijametar glavnog sabirnog kanala (66 μm) sličan dijamteru koji je utvrđen NLM kod *C. (P.) coriaceus* (50 μm). Ovaj kanal se otvara u oblasti devetog tergita trbuha, u blizini tergo-sternalne suture i njegova dužina kod ove vrste iznosi oko 4 mm (Vesović et al., 2017). Ni u slučaju ove vrste nije zabeležen polni dimorfizam u strukturi pigidijalnih žlezda.

5.5.3. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste *C. (P.) coriaceus*

Kod vrste *C. (P.) coriaceus*, pigidijalni žlezdani sistem se ne razlikuje po obliku značajno od istog kod vrsta *C. (T.) convexus* i *C. (E.) ullrichii*, ali se zapaža da je rezervoar manjih dimenzija (dugačak 2924,24 μm i širok 1876,43 μm) u odnosu na rezervoar kod vrste *C. (E.) ullrichii* (Forsyth, 1972) i dva puta veći u odnosu na rezervoar vrste *C. (T.) convexus* (dugačak 1200 μm i širok 650 μm). Kao i kod ostalih predstavnika roda *Carabus*, rezervoar je izgrađen od jasno definisanih i gusto pakovanih vlakana glatke muskulature različitih debljina (prosečno 75 μm , prema NLM; oko 20 μm prema SEM). Kao i kod drugih predstavnika roda *Carabus*, istiskivanje sekreta u spoljašnju sredinu se obavlja raspršivanjem u vidu spreja, a uz pomoć valvi

(zadebljanja u vidu zalistaka) na samom otvoru eferentnog kanala i pritiska u kanalu. Eferentni kanal je obložen mišićnim slojem, kao i kod drugih ispitanih vrsta u ovoj tezi, a otvara se na antero-lateralnoj ivici devetog abdominalnog tergita (Nenadić et al., 2016a). U ovoj studiji, TPEF modalitetom nelinearne mikroskopije, ali i pomoću SEM je zabeleženo da dijametar eferentnog kanala iznosi oko 100 μm . Na ovom kanalu se uočavaju spiralni grebeni debljine oko 0,68 μm . U sekretornom delu žlezdanog sistema se uočavaju gusto pakovani sekretorni lobusi, raspoređeni u klasterne, povezani sistemom sabirnih kanalića prosečnog dijametra od oko 55 μm , sa tendencijom račvanja u radijalnom pravcu. Klasteri broje sličan broj lobusa kao kod *C. (T.) convexus* (između 40-60), a dijametar sekretornih lobusa iznosi u proseku oko 75 μm , što je u nekim slučajevima duplo manji dijametar u odnosu na sekretorne lobuse kod *C. (T.) convexus*. Nije uočen polni dimorfizam kod adultnih jedinki.

5.5.4. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste *C. (E.) ullrichii*

Pigidijalni sistem vrste *C. (E.) ullrichii* je vrlo sličan sistemu drugih predstavnika roda *Carabus* [*C. (Eucarabus) arcensis* Herbst, 1784, *C. (Mesocarabus) problematicus* Herbst, 1786, *C. (Megodontus) violaceus* Linnaeus, 1758, *C. (T.) convexus*, *C. (P.) coriaceus*] (Forsyth, 1972; Nenadić et al., 2016a; Vesović et al., 2017). Oblik parnih rezervoara je sličan kao kod prethodno pomenutih vrsta roda *Carabus*. Naime, ovoidne su forme, a na posteriornom kraju ove strukture polazi eferentni kanal, na kome se zapažaju spiralni grebeni, što je još uočeno još sedamdesetih godina prošlog veka (Forsyth, 1972). Zidovi rezervoara i eferentnog kanala su izrazito muskulozni. Gusto pakovana vlakna glatke muskulature u vidu snopova, debljine od oko 30 μm , su uglavnom paralelno orijentisani, ali se mogu raspoređivati i u više pravaca, što je prvi put evidentirano skenirajućom elektronskom i nelinearnom mikroskopijom u ovoj studiji. Pređašnja ispitivanja morfo-histološkog plana žlezda klasičnom svetlosnom mikroskopijom ukazuju na izduženi, bubrežasti oblik rezervoara (Nenadić et al., 2016a), pri čemu se zapaža jako izraženo sužavanje na sredini ove strukture. U ovoj studiji se zapaža nešto drugačija forma rezervoara ove vrste. Rezervoar je bubrežaste forme, ali izrazito izdužen. Već je ranije ustanovljeno da zid ove strukture sačinjava više slojeva muskulature, koja funkcioniše kao kompresor. Kod ove vrste,

debljina zidova može iznositi i do 400 μm . Između slojeva mišića i lumena rezervoara nalazi se epidermis, bazalna membrana je okrenuta ka spolja, a zaštitna epikutikula prema unutra (Nenadić et al., 2016a). Rezervoari su krupnijeg dijametra u odnosu na vrste *C. (T.) convexus* i *C. (P.) coriaceus* (Nenadić et al., 2016a; Vesović et al., 2017). U slučaju vrste *C. (E.) ullrichii*, manji broj sekretornih lobusa kompenzuje krupniji dijametar istih. Naime, sekretorni deo žlezdanog sistema ubraja do 50 radijalno raspoređenih sferičnih sekretornih lobusa prosečnog dijametra od oko 116,6 μm , pri čemu se primećuju gusto pakovane sekretorne ćelije. Čitav žlezdani sistem je asociran sa sistemom mnogobrojnih traheola, čiji dijametar u proseku iznosi oko 40 μm , što upućuje na dobru aerisanost tkiva. Ustanovljeno je da ne postoji razlika u strukturi žlezda između polova.

5.5.5. Morfologija pigidijalnog žlezdanog sistema vrste *L. (P.) punctatus*

Pigidijalni žlezdani sistem vrste *L. (P.) punctatus* se umnogome razlikuje od prethodno ispitanih vrsta. Za jedinke ove vrste je karakteristično da poseduju parne, sitnije rezervoare bubrežastog oblika, dužine do 2 mm i širine do 1,5 mm (Nenadić et al., 2016b). Bubrežasti izgled rezervoara se primećuje i na SEM mikrografijama. Primenom SEM dobijen je detaljniji uvid u pigidijalne žlezdane strukture. U slučaju ove studije, rezervoari su dužine od oko 1000 μm i širine od oko 800 μm , što je duplo manje u odnosu na rezultate merenja koji su zabeleženi nakon snimanja svetlosnom mikroskopijom. Moramo uzeti u obzir da se oblik i veličina mogu promeniti tokom pripreme tkiva za SEM, a koje podrazumeva dehidrataciju, odnosno, isušivanje tkiva, bez obzira što veličina može varirati između jedinki koje pripadaju različitim populacijama. Kada posmatramo oblik rezervoara, zapaža se asimetričnost strukture (primećuje se jedan širok i jedan uži deo). Ovakva forma je ustanovljena i nakon primene svetlosne mikroskopije (Nenadić et al., 2016b). Takođe, na svetlosnoj mikroskopiji se uočavaju na samom zidu rezervoara poprečno postavljena gusta kompresorska mišićna vlakna, isprepletana u svim pravcima. Sam zid rezervoara je višeslojan, debljine od oko 300 μm . Uz pomoć SEM je zabeležena prosečna debljina snopova mišićnih vlakana, koja je iznosila oko 20 μm . Debljine snopova mogu varirati, te je na mikrografijama koje su dobijene primenom TPEF modaliteta

nelinearne mikroskopije ustanovljena prosečna debljina od 40 μm . Snopovi mišićnih vlakana su paralelno postavljeni i isprepletani u svim pravcima i u slučaju ove studije. Između mišićnih slojeva i lumena rezervoara, epidermis se pojavljuje sa bazalnom membranom sa spoljne strane, a naborana površina je okrenuta prema lumenu, što se uočava primenom svetlosne mikroskopije. Mišićni eferentni kanal se pruža od rezervoara i sužava se do samog otvora ka spoljašnjoj sredini. Širina eferentnog kanala se poklapa sa podacima iz prethodne studije koja je podrazumevala primenu svetlosne mikroskopije (100 μm) (Nenadić et al., 2016b).

Prethodne studije ukazuju na postojanje sferične forme sekretornih lobusa, pri čemu se zapaža blaga reniformnost na njihovom poprečnom preseku. Grupacije su konstituisane od oko 60-70 ovakvih sekretornih lobusa (Forsyth, 1972; Nenadić et al., 2016b). U centru svakog sekretornih lobusa je smešten sabirni lumen, na koji se sa spoljašnje strane naslanja sloj ćelija koje nose kanal. Na vrh ovih ćelija naslanja se gust sloj sekretornih ćelija, koje su radijalno postavljene okolo (Nenadić et al., 2016b). Prosečni dijametar sekretornih lobusa iznosi 200 μm . Uz pomoć SEM i TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije je postignut uvid u elipsoidnu formu sekretornih lobusa na poprečnom preseku, što ukazuje na mogućnost postojanja i druge forme pored sferične i reniformne. Od sekretornih lobusa polaze sabirni kanalići, koji su radijalno orijentisani, prosečnog dijametra od oko 20 μm . Sabirni kanali se susiće u glavni sabirni kanal, dijametra od 130 μm , na kome se uočavaju spoljašnji spiralni režnjevi (debljine oko 633,65 nm). Lumen ovog kanala iznosi 32,5 μm , odnosno četvrtinu njegovog ukupnog dijametra, što u pretpostavci ukazuje na veću brzinu protoka sekreta do rezervoara. Glavni sabirni kanal, prosečne dužine od oko 12,5 mm (Nenadić et al., 2016b), uliva se u rezervoar na njegovom medijalnom delu, odnosno konkavnoj zoni koja se naziva hilum (Rossini et al., 1997). Prethodno nije utvrđen polni dimorfizam u strukturi žlezda (Nenadić et al., 2016b), što je potvrđeno i u ovoj studiji.

5.5.6. Komparacija morfoloških struktura pigidijalnog žlezdanog kompleksa između posmatranih vrsta trčuljaka i poređenje različitih mikroskopskih tehnika

Pigidijalne žlezde predstavljaju strukture koje su slične kod svih predstavnika porodice Carabidae. Međutim, dužina, dijametar i struktura glavnog sabirnog kanala i eferentnog kanala, kao i karakteristike rezervoara i zalistaka koji se nalaze na otvoru ovog sistema u spoljašnju sredinu se razlikuju od tribusa do tribusa (Forsyth, 1972). Tako je npr. oblik rezervoara kod većine predstavnika ove porodice bubrežastog izgleda, međutim, pojedine vrste, kod kojih pigidijalne žlezde proizvode sekret koji sadrži mravlju kiselinu, poseduju dodatni dorzalni režanj na rezervoaru, za koji se smatra da ima ulogu zadržavanja lipidne faze surfaktanta sekreta (Will et al., 2000), što nije primećeno u slučaju rezervoara vrste *L. (P.) punctatus*, koja proizvode sekret u čijem se sastavu nalazi mravlja kiselina (19,4%) (Vesović et al., 2015). Dakle, ovde nalazimo moguću korelaciju između strukture i hemijskog sastava sekreta koji se sintetise u ovim žlezdama (Will et al., 2000). Takođe, kada se osvrnemo na strukturu sekretornih lobusa, uočava se varijabilnost u brojnosti istih kod različitih vrsta. Tako, kod pojedinih vrsta susrećemo svega do 20 izduženih sekretornih lobusa, dok je kod drugih sekretorni deo pigidijalnog žlezdanog sistema izgrađen čak od preko 200 malih sferičnih sekretornih lobusa (Kanehisa & Murase, 1977). Samim tim je nezaobilazno povlačenje paralele u strukturiranosti pigidijalnih žlezda između vrsta različitih potporodica i tribusa trčuljaka. Prethodno može ukazivati na različite adaptabilnosti u zavisnosti od okruženja jedinki i frekventnosti predatora sa kojima se susreću. Ono što se uočava jeste već pretpostavljena sličnost u strukturiranosti žlezda kod predstavnika roda *Carabus*. Očigledno je da rezervoari predstavnika ovog roda uglavnom ne pokazuju značajne razlike u obliku, uzimajući u obzir alteracije u veličini, što je pojašnjeno činjenicom da veličina žlezda proporcionalno prati veličinu jedinki određene vrste. Dakle, sve posmatrane strukture unutar ovog žlezdanog sistema kod vrsta *C. (E.) ullrichii*, *C. (P.) coriaceus* i *C. (T.) convexus* su, pored međusobne sličnosti, pokazale i određen stepen homologije sa žlezdanim strukturama drugih predstavnika roda *Carabus* (Forsyth, 1972). U svakom slučaju, kod svih predstavnika tog roda se uočava forma rezervoara koja je karakteristična za sve pripadnike potporodice Carabinae (Forsyth, 1972). Takođe, slični rezultati u posmatranju morfologije žlezda navedenih vrsta su postignuti u prethodnim studijama primenom klasične

svetlosne mikroskopije (Nenadić et al., 2016a; Vesović et al., 2017). Međutim, u ovoj studiji su dobijeni podaci o mikrostrukturi pigidijalnih žlezdanih kompleksa studiranih vrsta (promer najsitnijih sabirnih kanalića i traheola koje aerišu ovaj sistem, raspored i orijentacija snopova mišićnih vlakana tkiva rezervoara). Naime, podaci o rasporedu i orijentaciji kompresorskih vlakana glatke muskulature ovih žlezda su od velike važnosti u dodatnim razmatranjima fiziologije istih, jer muskularne kontrakcije rezervoara igraju ključnu ulogu u njegovom pražnjenju i izbacivanju sekreta u spoljašnju sredinu (Forsyth, 1970; Smith et al., 1996). Za razliku od Carabinae i većeg broja drugih potporodica, kod predstavnika Brachininae i Paussinae se uočava redukcija eferentnog kanala, te funkciju raspršivanja sekreta u spoljašnju sredinu preuzima visokosklerotizovana reakciona komora, u kojoj dolazi do produkcije enzima koji katalizuju reakciju između vodonik-peroksida i hidrokinona, pri čemu nastaju benzokinoni, molekularni kiseonik i voda (Schildknecht et al., 1968a; Eisner et al., 2000; Di Giulio et al., 2015).

Kod vrsta roda *Carabus*, kao i kod ostalih ispitanih vrsta trčuljaka u ovoj studiji, na SEM mikrografijama se uočava prisustvo velikog broja traheola različitih dijametara, što ukazuje na visok stepen aerobnog metabolizma ovog sistema (Giglio et al., 2011). Možemo pretpostaviti da je stepen aerisanosti praćen veličinom pigidijalnog žlezdanog sistema. Takođe, uočava se da je prisustvo velikog broja sabirnih kanalića praćeno manjim dimenzijama istih, što važi i kada su sami sekretorni lobusi u pitanju (vrste koje poseduju krupnije sekretorne lobuse, poseduju mali broj jedinica u klasteru, što je posebno primećeno kod predstavnika roda *Carabus*).

Mikrografije dobijene pomoću TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije upućuju na prisustvo tkiva u sastavu žlezda koje ima sposobnost autofluorescencije. Ova činjenica ukazuje na značajan udeo miozina u sastavu ovog tkiva, ali i na impregniranost žlezdanog tkiva hitinom kod adultnih jedinki. Zahvaljujući ovoj pojavi, laboratorijska priprema tkiva za TPEF modalitet nelinearne mikroskopije je pojednostavljena, čime je izbegnuto potencijalno oštećenje, za razliku od obrade i pripreme tkiva kada je u pitanju primena SEM. Međutim, neosporna je činjenica da je SEM najpogodnija mikroskopska metoda u posmatranju spoljašnje morfologije pigidijalnih žlezda. Ova tehnika omogućava detaljan uvid u oblik rezervoara, njegovu površinsku strukturiranost, kao i uvid u druge detalje vezane za morfološku strukturu žlezda (npr. dijametar i

finija struktura radijalnih sabirnih kanala, sekretornih lobusa, glavnog sabirnog kanala i eferentnog kanala). S druge strane, upotreba TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije se pokazala kao najprikladnija metoda u ispitivanju unutrašnje strukture žlezda (npr. prečnik i druge dimenzije rezervoara, debljina zida rezervoara pojedinih vrsta, dijametar i uvid u poprečni presek sekretornih lobusa, dijametar radijalnih sabirnih kanalića, glavnog sabirnog kanala i eferentnog kanala, raspored, orijentacija i dijametar snopova mišićnih vlakana). Ovom tehnikom je po prvi put omogućeno da bez prethodne pripreme tkiva, koja podrazumeva sečenje, bojenje i obeležavanje istog, dobijemo detaljne trodimenzionalne informacije o strukturi pigidijalnih žlezda (prečnik unutrašnjih mikrostruktura). Prethodno ukazuje na neospornu prednost nelinearne mikroskopije (TPEF modalitet) u odnosu na SEM i klasičnu svetlosnu mikroskopiju. Kombinacija SEM i TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije omogućava najadekvatniju opservaciju spoljašnje i unutrašnje morfologije ovih bioloških struktura.

Kako je reč o žlezdama koje su varijabilne u strukturi od tribusa do tribusa unutar porodice Carabidae, definitivno se osobine ovih žlezda mogu smatrati pouzdanim karakteristikama pri razmatranju filogenije ove grupe tvrdokrilaca (Forsyth, 1972). Pored pomenutog, dobro izučen morfo-anatomski aspekt daje osnovu za detaljnije istraživanje fiziologije ovog pigidijalnog žlezdanog sistema i njegove funkcije u prirodi, što može naći primenu u nauci o materijalima u budućnosti, s obzirom da insekti generalno predstavljaju dobre model organizme (Schroeder et al., 2018), ali i pomoći da bolje razumemo funkciju samih sekreta pigidijalnih žlezda, što u daljim koracima može imati medicinski i ekološki potencijal.

6. ZAKLJUČCI

Prirodni produkti poreklom iz različitih organizama i njihova primena danas definitivno predstavljaju veliki izazov u naučnim istraživanjima, kao i potencijalno rešenje mnogobrojnih komplikacija u terapijama raznih oboljenja. Kako bismo podobnije ispitali osnovu ovakvih jedinjenja, pre bilo kakve potencijalne primene u farmakološkim istraživanjima, neophodno je osvrnuti se na njihovu primarnu funkciju i ekološki značaj.

Na osnovu ove studije se može izvesti nekoliko zaključaka, koji su međusobno usko korelisani:

- Ispitivani sekreti pigidijalnih žlezda odabranih vrsta iz porodice Carabidae poseduju određen stepen antimikrobne aktivnosti u odnosu na testirane humane patogene.
- Najveći stepen antibakterijskog dejstva je zabeležen nakon tretiranja humanih patogena sekretom pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus*. Sojevi *M. flavus* i *E. coli* su pokazali nešto veću rezistenciju u odnosu na ostale testirane patogene. Najmanji stepen antibakterijske aktivnosti je utvrđen u slučaju sekreta pigidijalnih žlezda *C. (C.) sycophanta*, gde je zabeležena i najveća rezistentnost ispitanih patogenih sojeva. U ovom slučaju je antibakterijski efekat postignut samo pri testiranju *E. coli*. Sekreti pigidijalnih žlezda ostalih testiranih vrsta trčuljaka nisu pokazali efekat u odnosu na sve ispitane bakterijske sojeve, izuzev kada je u pitanju sekret vrste *C. (E.) ullrichii*, koji je dejstvo postigao na izrazito visokim MIK i MBK vrednostima. Komercijalni antibiotici su generalno pokazali veći nivo antibakterijskog dejstva u odnosu na testirane sekrete.
- Izražena antifungalna aktivnost sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* je postignuta na veoma niskim MIK i MFK, koje su podrazumevale do 5 puta manje vrednosti u odnosu na sintetički antimikotik bifonazol. U slučaju testiranja pojedinih mikromiceta (*A. ochraceus*, *T. viride*), ovaj sekret je pokazao približno 20-50 puta jači efekat u odnosu na komercijalni antimikotik ketokonazol. Takođe, nakon tretiranja vrste *P. ochrochloron* ovim sekretom, ustanovljen je oko 150 puta veći antifungalni potencijal u odnosu na navedeni antimikotik. Sekret pigidijalnih žlezda vrste *C. (C.) sycophanta* je

pokazao približno istu antifungalnu aktivnost u poređenju sa sekretom vrste *L. (P.) punctatus*, pri čemu je zapaženo da su mikromicete *P. ochrochloron* i *P. verrucosum* var. *cyclopium* pokazale veću senzibilnost u slučaju sekreta *L. (P.) punctatus*. Antimikotik ketokonazol je, takođe, pokazao slabije antifungalno dejstvo u komparaciji sa sekretom pigidijalnih žlezda vrste *C. (C.) intricatus*, i to isključivo nakon testiranja mikromiceta *A. ochraceus*, *T. viride* i *P. ochrochloron*. Sve testirane mikromicete su pokazale značajan stepen rezistencije na sekret vrste *C. (E.) ullrichii*. Ustanovljeno je da su *A. niger*, *P. funiculosum* i *P. verrucosum* var. *cyclopium* postigli potpunu rezistenciju na sekrete vrsta *C. (P.) coriaceus* i *A. (A.) parallelepipedus*. Takođe, sekret pigidijalnih žlezda vrste *C. (P.) coriaceus* nije ostvario antifungalnu aktivnost u odnosu na *T. viride*.

- Nakon citotoksičnog eseja, ustanovljeno je da su sekreti pigidijalnih žlezda ispitivanih vrsta trčuljaka dosegli niske procenete inhibicije proliferacije primarnih ćelija hepatocita (PLP2). Takođe, pri testiranju antiproliferativnog efekta na tumorske humane ćelijske linije, testirani sekreti nisu dosegli GI₅₀ vrednost. Jedino je sekret vrste *L. (P.) punctatus* dosegao približno 50% inhibicije ćelijske proliferacije MCF7 ćelijske linije, na najvećoj koncentraciji. Pozitivna kontrola elipticin se generalno pokazala kao efikasnija pri testiranju u odnosu na testirane sekrete.
- Prilikom ispitivanja antimikrobnog dejstva sekreta pigidijalnih žlezda vrste *L. (P.) punctatus* na bakterije i mikromicete izolovane sa zidova pećine i iz guana, ustanovljen je značajan antimikrobni potencijal istog. Među odabranim testiranim bakterijskim sojevima iz guana, Gram-pozitivni izolati su generalno pokazali veću osetljivost u poređenju sa Gram-negativnim izolatima. Utvrđeno je da se izolat *E. eurekensis* pokazao kao najsenzibilniji, sa istovremenom ostvarenom rezistentnošću prema antibiotiku streptomycinu pri najvišoj testiranoj koncentraciji. Izolat *E. fergusonii* je pokazao izraženu osetljivost prema sekretu, gotovo duplo veću u poređenju sa antibiotikom streptomycinom. Sve ispitane vrste mikromiceta iz guana su pokazale sličan stepen senzibiliteta u odnosu na testirani sekret, pri čemu je postignuto efikasnije antifungalno dejstvo sekreta na *P. citrinum* i *T. harzianum* u poređenju sa antimikotikom nistatinom.

Kao najosetljiviji izolat sa zidova pećine u odnosu na testirani sekret, pokazao se *Penicillium* sp.

- Utvrđeno je da primena SEM i TPEF modaliteta nelinearne mikroskopije obezbeđuje detaljni uvid u spoljašnju i unutrašnju morfologiju pigidijalnih žlezda ispitivanih vrsta trčuljaka u poređenju sa konvencionalnom svetlosnom mikroskopijom. Uspešno je uspostavljen protokol u vezi sa pripremom žlezdanog tkiva trčuljaka za primenu navedenih mikroskopskih tehnika, određeni su dijametar i raspored određenih mikrostruktura (npr. snopova mišićnih vlakana unutar zida rezervoara) i dobijene su trodimenzionalne informacije o strukturi pigidijalnih žlezda posmatranih vrsta. Ustanovljeni dijametri mikrostruktura mogu imati značaj u podobnijem ispitivanju funkcionisanja ovog žlezdanog sistema, naročito kada uzmemo u obzir unutrašnju strukturu sabirnih kanala, njihov promer i promer spiralnih zadebljanja na zidovima istih, kao i eferentnog kanala i mišićnih vlakana u sastavu zida rezervoara. Polni dimorfizam u strukturi žlezda nije uočen. Zapažena je pretpostavljena sličnost u morfologiji pigidijalnih žlezda analiziranih predstavnika roda *Carabus* [*C. (E.) ullrichii*, *C. (P.) coriaceus* i *C. (T.) convexus*]. Kod ovih vrsta se uočava forma rezervoara koja je karakteristična za sve predstavnike potporodice Carabinae. Na poprečnom preseku sekretornih lobusa jedinki vrste *L. (P.) punctatus* je uočeno da ove strukture mogu imati i elipsoidnu formu, pored već prethodno utvrđenog sferičnog i bubrežastog oblika. Ustanovljeno je da dimenzije rezervoara mogu varirati između jedinki iste vrste, pri čemu veličina ovih struktura proporcionalno prati njihovu veličinu tela.

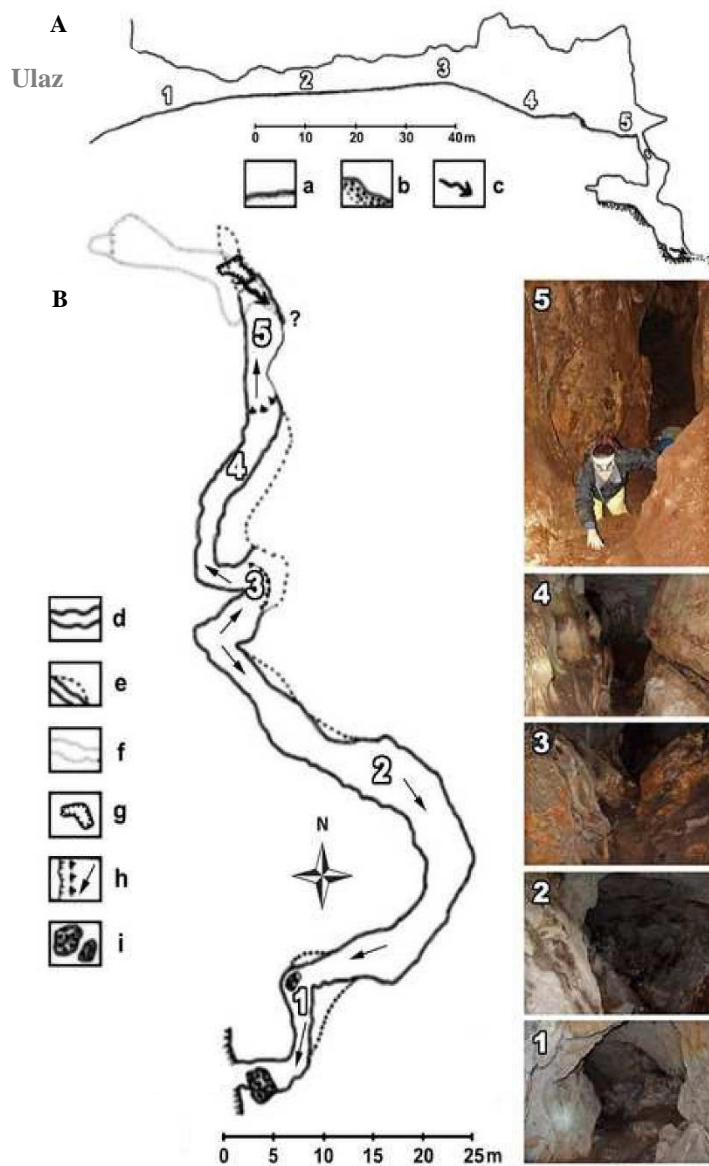
Dakle, može se zaključiti da je citotoksični esej ukazao na zanemarljiv stepen toksičnosti smeše ovog sekreta, što je dalo jasniju potvrdu antimikrobne aktivnosti. Takođe, ovom studijom je i pretpostavljen mogući antitumorski potencijal, koji bi trebalo dodatno u budućnosti ispitati na primeru sekreta vrste *L. (P.) punctatus*, ali i drugih neistraženih vrsta. Pored pomenutog, detaljniji uvid u morfo-anatomski aspekt pruža osnovne temelje za podobnije istraživanje pigidijalnih žlezda na planu njihove fiziologije i funkcije u prirodi, a samim tim i na planu potencijalne primene produkata ovih struktura u biomedicini.

Iz navedenog možemo pretpostaviti da nam budućnost donosi nove poduhvate i nove ideje koje će čoveka kao takvog staviti u drugi plan, kada će se i on sam vratiti prirodnim postulatima, odakle je njegov *fizis* isključivo potekao. Ovo otvara vrata ka novim istraživanjima na polju terapija u dalekoj budućnosti. Moderne naučne studije o potencijalnim terpeutskim funkcijama insekata upućuju na to da ovi organizmi mogu postati važan resurs za otkrivanje novih lekova u bliskoj budućnosti (Feng et al., 2009). Definitivno je da danas ne možemo izvoditi zaključke *a priori* na osnovu pojedinih stanovišta, te se u novije vreme i sa rapidnim razvojem tehnologije i različitih metoda sve više primenjuje integrativni pristup koji podrazumeva različite naučne grane. Ta saznanja ne samo da pružaju određene prednosti čovečanstvu direktno, već i omogućavaju pronalazak rešenja u očuvanju prirode, a samim tim i prirodnih resursa.

Nakon ovakvih studija, ostaje činjenica da su karabide, kao i ostali pripadnici insekata, invertebrata i životinja uopšte, zapravo deo prirode koja nas okružuje i da zaštitom i proučavanjem ove taksonomske grupe, kao i ostalih predstavnika, zapravo proučavamo sebe i svoju svest o očuvanju ekvilibrijuma u prirodi, što posledično može biti od nezanemarljivog značaja za čovečanstvo.

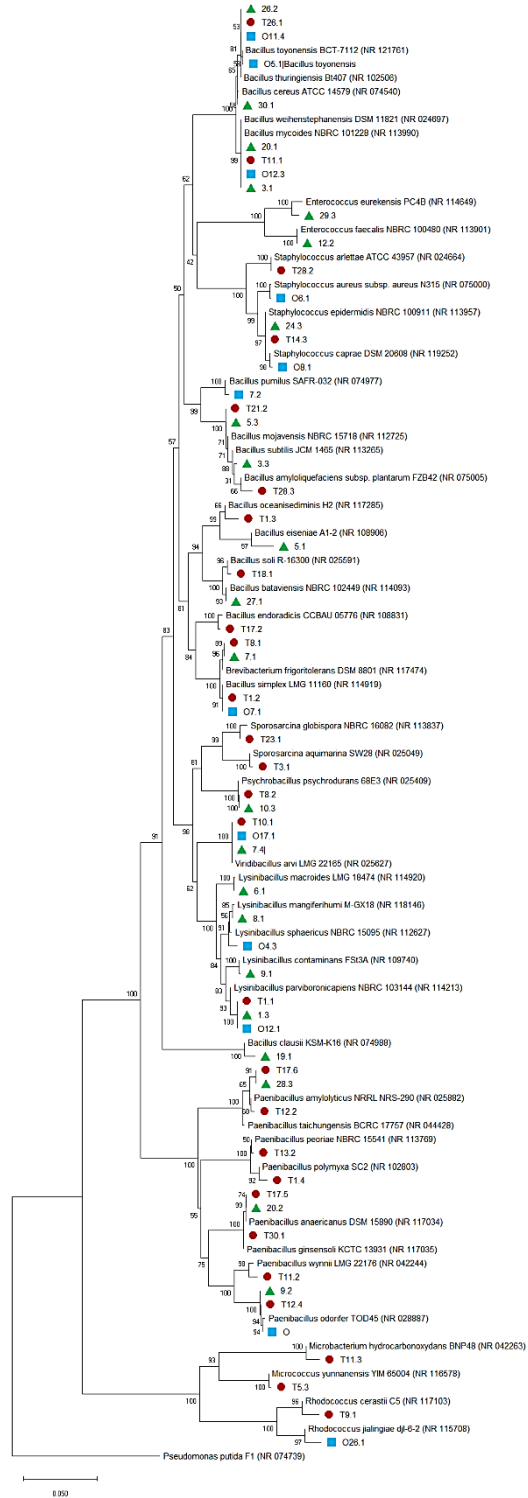
7. PRILOZI

Prilog i



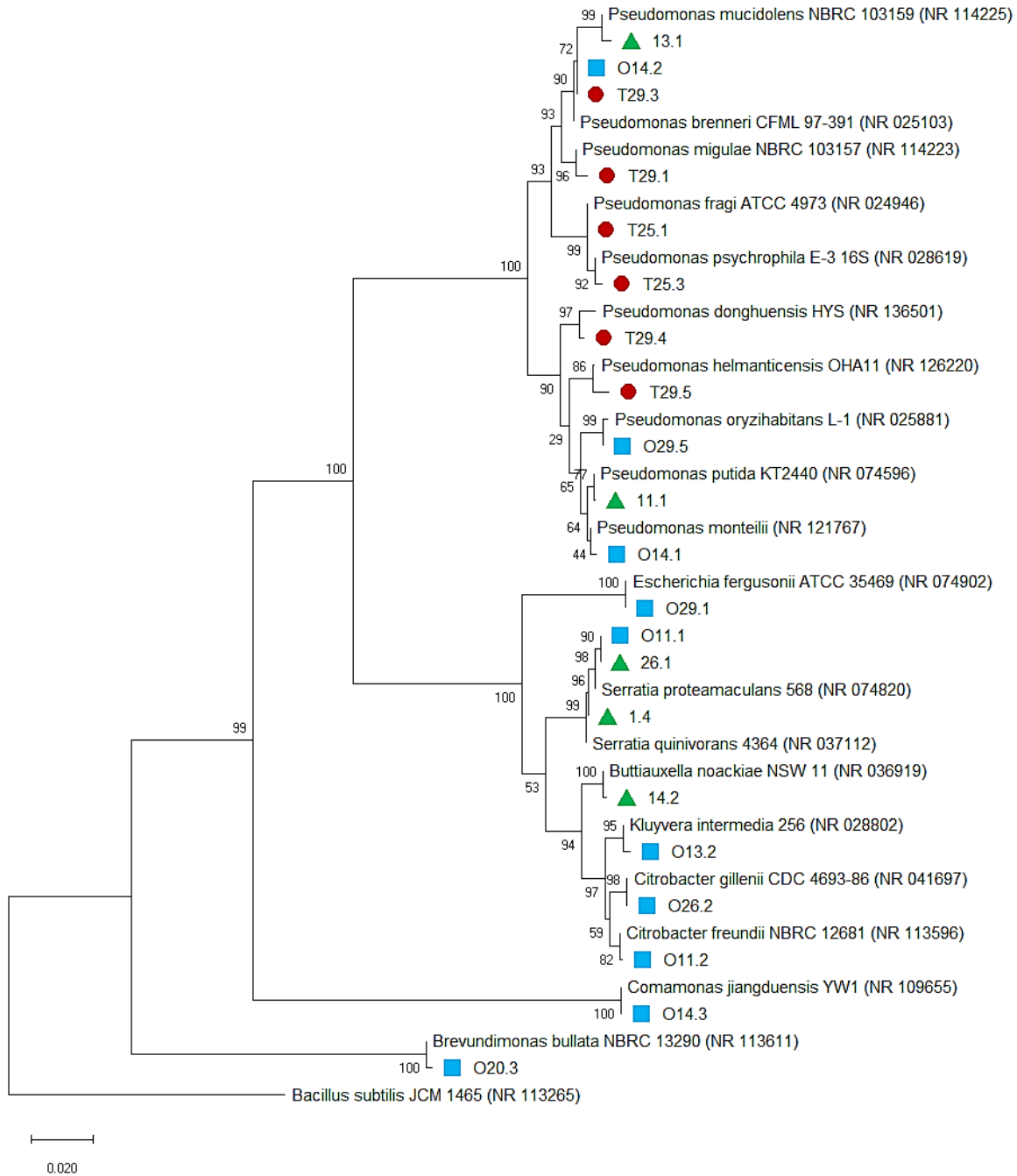
Longitudinalni profil (A) i plan Ogoreličke pećine (B). 1-5 - tačke uzorkovanja; (a) glina sa sitnim šljunkom; (b) krupan šljunak; (c) pravac podzemnog toka; (d) glavni kanal; (e) gornji erozivni horizont; (f) niži nivo (nivo jame); (g) deo kanala koji obuhvata najnižu tačku, odnosno jamu; (h) nagib; (i) blokovi (Nenadić et al., 2017a, modifikovano prema Nešić et al., 2008).

Prilog ii



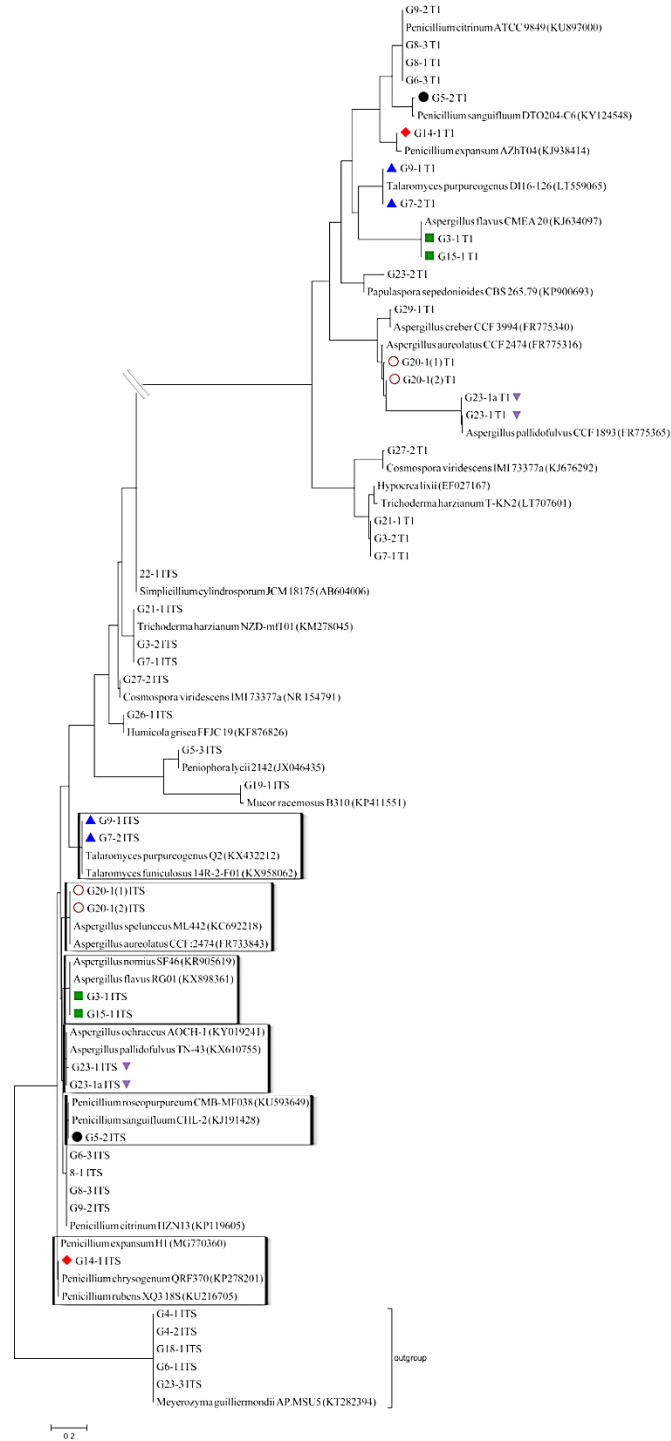
Molekularna filogenetska analiza bakterija iz guana, dobijena metodom maksimalne verodostojnosti (maximum likelihood, engl.) na osnovu 16S rRNK.

Prilog iib



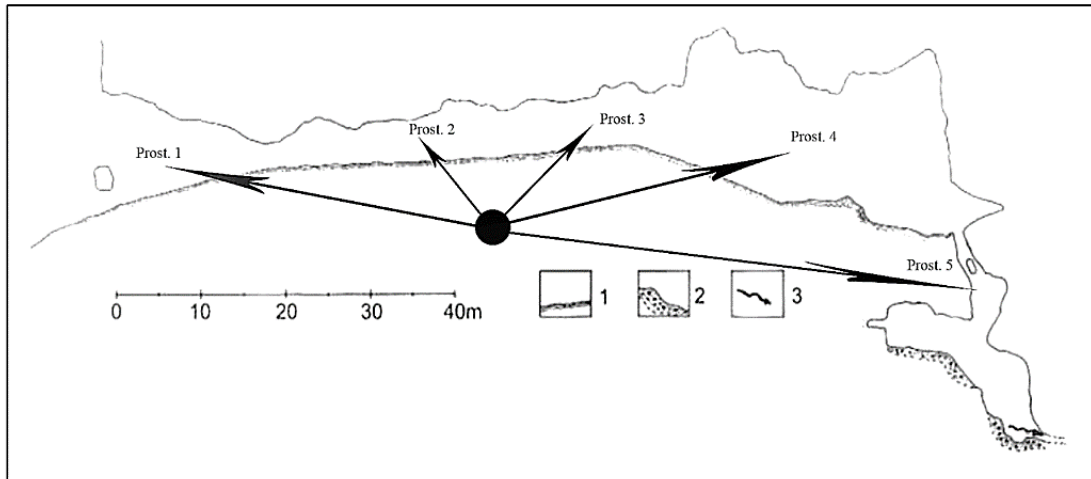
Molekularna filogenetska analiza bakterija iz guana, dobijena metodom maksimalne verodostojnosti (maximum likelihood, engl.) na osnovu 16S rRNK.

Prilog iii



Molekularna filogenetska analiza mikromiceta iz guana, dobijena metodom maksimalne verodostojnosti (maximum likelihood, engl.) na osnovu 5,8 S rRNK, 28 S RNK i β -tubulin gena (T1).

Prilog iv



Ime vrste	Prost. 1	Prost. 2	Prost. 3	Prost. 4	Prost. 5
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma harzianum</i>	+	+	+	+	+
<i>Penicillium citrinum</i>	+	+	+	+	+
<i>Penicillium sanguifluum</i>	+	+	+	+	-
<i>Peniophora lycii</i>	+	-	+	+	+
<i>Penicillium expansum</i>	-	-	+	+	+
<i>Simplicillium cylindrosporum</i>	-	-	+	+	+
<i>Mucor racemosus</i>	-	+	+	+	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+	-	+		+
<i>Aspergillus aureolatus</i>	+	-	-	+	-
<i>Aspergillus pallidofulvus</i>	+	-	-	+	-
<i>Talaromyces purpureogenus</i>	-	+	-	-	+
<i>Papulaspora sepedonioides</i>	-	-	-	+	+
<i>Aspergillus creber</i>	-	-	-	-	+
<i>Humicola grisea</i>	-	-	-	-	+
<i>Cosmospora viridescens</i>	-	-	-	-	+

Zastupljenost identificovanih mikromiceta iz guana u okviru različitih prostorija Ogoreliške pečine.

Prilog v.



Primerak vrste *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828) na zidu Ogoreličke pećine (Nenadić et al., 2017a).

Lista skraćenica stručnih pojmova

CPD - kritična tačka sušenja (critical point drying, engl.)

DMSO - dimetil sulfoksid

ek - eferentni kanal pigidijalnih žlezda

FBS - serum fetusa govečeta (fetal bovine serum, engl.)

GC-MS - gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom

GI₅₀ - koncentracija koja dovodi do inhibicije 50% ukupne ćelijske proliferacije

gsk - glavni sabirni kanal pigidijalnih žlezda

HeLa - ćelijska linija cervikalnog karcinoma

HepG2 - ćelijska linija hepatocelularnog karcinoma

icl - intercelularni lumeni

INT - *p*-jodonitrotetrazolijum (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolijum hlorid (*p*-jodonitrotetrazolijum violet boja)

k - kružna zadebljanja na zidu eferentnog kanala pigidijalnih žlezda

KSM - konvencionalna svetlosna mikroskopija

LB - Luria-Bertani Broth podloga

lek - lumen eferentnog kanala pigidijalnih žlezda

lsk - lumen sabirnog kanala pigidijalnih žlezda

m - mišićna vlakna rezervoara pigidijalnih žlezda

MA - Malt Agar

MBK - minimalna baktericidna koncentracija

MCF-7 - ćelijska linija adenokarcinoma dojke

MEB - tečni sladni ekstrakt (Malt Extract Broth, engl.)

MEA - sladni ekstrakt agar (Malt Extract Agar, engl.)

MFK - minimalna fungicidna koncentracija

MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

NC - negativna kontrola

NCI-H460 - ćelijska linija nesitnoćelijskog karcinoma pluća

NLM - nelinearna mikroskopija

PDA - krompir dekstrozni agar (Potato Dextrose Agar, engl.)

PGS - sekret pigidijalnih žlezda

pH - aktivnost vodonikovih jona u rastvoru

PLP 2 - primarna kultura hepatocita poreklom iz jetre svinje (primary porcine liver cells, engl.)

ppsk - poprečni presek sabirnog kanala pigidijalnih žlezda

r - rezervoar pigidijalnih žlezda

ROS - reaktivne kiseonične vrste (reactive oxygen species, engl.)

sé - sekretorne ćelije pigidijalnih žlezda

SD - standardna devijacija

SE - standardna greška

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija

sk - sabirni kanal pigidijalnih žlezda

sl - sekretorni lobus pigidijalnih žlezda

sp - spiralna zadebljanja u unutrašnjosti glavnog sabirnog kanala pigidijalnih žlezda

SRB - sulforodamin B esej

STP - streptomycin

SV - srednja vrednost

TCA - trihlorosirćetna kiselina (trichloroacetic acid, engl.)

TPEF - dvofotonski ekscitovana fluorescencija (two photon excited fluorescence, engl.)

tr - traheola

TSB - Tryptic Soy Broth podloga

8. LITERATURA

Adur, J., Carvalho, H.F., Cesar, C.L. & Casco, V.H. (2016) Nonlinear microscopy techniques: principles and biomedical applications. pp. 121-149. *In: Stanciu, S.G. (Ed.): Microscopy and Analysis. IntechOpen, London.* <http://dx.doi.org/10.5772/63451>

Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. & Sussman, A.S. (1973) *The Fungi: An Advanced Treatise.* Academic Press, New York, 504 pp.

Ahmad, A., Azmi, S., Srivastava, R.M., Srivastava, S., Pandey, B.K., Saxena, R., Bajpai, V.K. & Ghosh, J.K. (2009) Design of nontoxic analogues of cathelicidin-derived bovine antimicrobial peptide BMAP-27: the role of leucine as well as phenylalanine zipper sequences in determining its toxicity. *Biochemistry.* 48(46): 10905-10917. <https://doi.org/10.1021/bi9009874>

Alibek, K., Bekmurzayeva, A., Mussabekova, A. & Sultankulov, B. (2012) Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review. *Infectious Agents and Cancer.* 7(33): 1-10. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-7-33>

Ansari, Z., Miller, D. & Galor, A. (2013) Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment. *Current Fungal Infection.* 7(3): 209-218. <https://doi.org/10.1007/s12281-013-0150-110.1007/s12281-013-0150-1>

Arndt, E.M., Moore, W., Lee, W-K. & Ortiz, C. (2015) Mechanistic origins of bombardier beetle (*Brachinini*) explosion-induced defensive spray pulsation. *Science.* 348(6234): 563-567. <https://doi.org/10.1126/science.1261166>

Arnesen, L.P.S., Fagerlund, A. & Granum P.E. (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews.* 32(4): 579-606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112>

Attygalle, A.B., Meinwald, J., Liebherr, J.K. & Eisner, T. (1991) Sexual dimorphism in the defensive secretion of a carabid beetle. *Experientia*. 47(3): 296-299. <https://doi.org/10.1007/BF01958165>

Attygalle, A.B., Wu, X., Maddison, D.R. & Will, K.W. (2009) Orange/lemon-scented beetles: opposite enantiomers of limonene as major constituents in the defensive secretion of related carabids. *Naturwissenschaften*. 96: 1443-1449. <https://doi.org/10.1007/s00114-009-0596-8>

Attygalle, A.B., Wu, X., & Will, K.W. (2007) Biosynthesis of tiglic, ethacrylic, and 2-methylbutyric acids in a carabid beetle, *Pterostichus (Hypherpes) californicus*. *Journal of Chemical Ecology*. 33(5): 963-970.

Avgin, S.S. & Luff, M.L. (2010) Ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as bioindicators of human impact. *Munis Entomology & Zoology*. 5: 209-215.

Avis, T.J. & Bélanger, R.R. (2001) Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid *cis*-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2): 956-960. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.956-960.2001>

Balestrazzi, E., Valcurone Dazzini, M.L., De Bernardi, M., Vidari, G., Vita-Finzi, P. & Mellerio, G. (1985) Morphological and chemical studies on the pygidial defence glands of some Carabidae (Coleoptera). *Naturwissenschaften*. 72(9): 482-484. <https://doi.org/10.1007/BF00441073>

Banskar, S., Bhute, S.S., Suryavanshi, M.V., Punekar, S. & Shouche, Y.S. (2016) Microbiome analysis reveals the abundance of bacterial pathogens in *Rousettus leschenaultii* guano. *Scientific Reports*. 6: 36948. <https://doi.org/10.1038/srep36948>

Barnes, B.J., Wiederhold, N.P., Micek, S.T., Polish, L.B. & Ritchie, D.J. (2003) *Enterobacter cloacae* ventriculitis successfully treated with cefepime and gentamicin: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy*. 23(4): 537-542.

Baron, S. (1996) Medical Microbiology. 4th Edition. University of Texas Medical Branch, Galveston, 1273 pp.

Baskin, T.I., Orr, T.J., Jercinovic, M. & Yoshida, M. (2014) Sample preparation for scanning electron microscopy: the surprising case of freeze drying from tertiary butanol. *Microscopy Today*. 22: 36-39. <https://doi.org/10.1017/S1551929514000522>

Beheshti, N. & McIntosh, A.C. (2006) A biomimetic study of the explosive discharge of the bombardier beetle. *International Journal of Design & Nature and Ecodynamics*. 1(1): 61-69.

Benndorf, D., Müller, A., Bock, K., Manuwald, O., Herbarth, O. & von Bergen, M. (2008) Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*. *Allergy*. 63(4): 454-460. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01603>

Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2012) The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*. 72(1): 1-401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>

Bernie, S.D. (1989) Bats, bacteria and biotechnology. *Bats*. 7(1): 3-4.

Berntsen, H.F., Bogen, I.L., Wigestrang, M.B., Fonnum, F., Walaas, S.I. & Moldes-Anaya, A. (2017) The fungal neurotoxin penitrem A induces the production of reactive oxygen species in human neutrophils at submicromolar concentrations. *Toxicology*. 392: 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.008>

Beutel, R. (1997) Phylogenese and Evolution der Coleoptera (Insecta), ins besondere der Adepfaga. *Abhandlungen und Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*. 31: 1-164.

Blum, M.S. (1981) Chemical defenses of arthropods. Academic Press, New York, 562 pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-108380-9.X5001-7>

Blum, M. S. (1996). Semiochemical parsimony in the Arthropoda. *Annual Review of Entomology*. 41: 353-374. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.002033>

Bonacci, T., Brandmayr, P., Zetto, T., Perrotta, I.D., Guarino, S., Peri, E. & Colazza, S. (2011) Volatile compounds released by disturbed and undisturbed adults of *Anchomenus dorsalis* (Coleoptera, Carabidae, Platynini) and structure of the pygidial gland. *ZooKeys*. 81:13-25. <https://doi.org/10.3897/zookeys.81.1122>

Bottone, E.J. (2010) *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(2): 382-398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>

Brandmayr, P. & Zetto-Brandmayr, T. (1979) The evolution of parental care phenomena in pterostichine ground beetles with special reference to the genera *Abax* and *Molops* (Col. Carabidae). pp. 35-49. *In*: den Boer, P.J., Thiele, H.-U. & Weber, F. (Eds.): On the Evolution of Behaviour in Carabid Beetles. Miscellaneous Papers 18. Landbouwhogeschool, Wageningen.

Bray, D.F. (2000) Critical point drying of biological specimens for scanning electron microscopy. pp. 235-241. *In*: Williams, J.R. & Clifford, A.A. (Eds.): Supercritical Fluid Methods and Protocols. Humana Press, Totawa. <https://doi.org/10.1385/1-59259-030-6:235>

Breed, R.S., Murray, E.G.D. & Smith, N.R. (1957) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7th Ed). The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1094 pp.

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S. & Morse, S.A. (2007) *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. A Lange Medical Book, 24th Edition. McGraw-Hill, New York, 818 pp.

Bulet, P., Cociancich, S., Reuland, M., Sauber, F., Bischoff, R., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., Hetru, C. & Hoffmann, J.A. (1992) A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). *European Journal of Biochemistry*. 209(3): 977-984.

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L. & Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*. 23: 329-344.

Bulet, P. & Stöcklin, R. (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters*. 12: 3-11. <https://doi.org/doi:10.2174/0929866053406011>

Burse, A., Frick, S., Schmidt, A., Buechler, R., Kunert, M., Gershenzon, J., Brandt, W. & Boland, W. (2008) Implication of HMGR in homeostasis of sequestered and *de novo* produced

precursors of the iridoid biosynthesis in leaf beetle larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 76-88. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ibmb.2007.09.006>

Calhelha, R.C., Ferreira, I.C.F.R., Peixoto, D., Abreu, R.M.V., Vale-Silva, L.A., Pinto, E., Lima, R.T., Alvelos, M.I., Vasconcelos, M.H. & Queiroz, M.J. (2012) Aminodi(hetero)arylamines in the thieno[3,2-b]pyridine series: synthesis, effects in human tumor cells growth, cell cycle analysis, apoptosis and evaluation of toxicity using non-tumor cells. *Molecules*. 17(38): 3834-3843. <https://doi.org/10.3390/molecules17043834>

Carrillo, C., Cavia, M.M. & Alonso-Torre, S. (2012) Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review. *Nutricion Hospitalaria*. 27(6): 1860-1865. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6010>

Cheesman, M.J., Ilanko, A., Blonk, B. & Cock, I.E. (2017) Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Reviews*. 11(22): 57-72.

Chellaram, C., Venkatesh, S., Prem Anand, T., Kuberan, G., Alex John, A. & Priya, G. (2012) Antimicrobial properties of insect gut associated bacteria. *World Journal of Medical Sciences*. 7(4): 260-263. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjms.2012.7.4.6661>

Chen, H.M., Wang, W., Smith, D. & Chan, S.C. (1997) Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1336: 171-179.

Cherniack, E.P. (2010) Bugs as drugs, part 1: insects, the “new” alternative medicine for the 21st century). *Alternative Medicine Review*. 15(2): 124-135.

Chernysh, S., Kim, S.I., Bekker, G., Pleskach, V.A., Filatova, N.A., Anikin, V.B., Platonov, V.G. & Bulet, P. (2002) Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(20): 12628-12632. <https://doi.org/10.1073/pnas.192301899>

Choi, M., Kwok, S.J.J. & Yun, S.H. (2015) *In vivo* fluorescence microscopy: lessons From observing cell behavior in their native environment. *Physiology (Bethesda)*. 30(1): 40-49. <https://doi.org/10.1152/physiol.00019.2014>

Ciarlo, E., Heinonen, T., Herderschee, J., Fenwick, C., Mombelli, M., Le Roy, D. & Roger, T. (2016) Impact of the microbial derived short chain fatty acid propionate on host susceptibility to bacterial and fungal infections *in vivo*. *Scientific Reports*. 6: 37944. <https://doi.org/10.1038/srep37944>

Clarke, E., Levin, D.B., Kavanaugh, D.H. & Reimchen, T.E. (2001) Rapid evolution in the *Nebria gregaria* group (Coleoptera: Carabidae) and the paleogeography of the Queen Charlotte Islands. *Evolution*. 55: 1048-1418. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00662.x>

CLSI (2009) Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard, 8th Edn. CLSI Publication M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

Cole, R. (2014) Live-cell imaging. The cell's perspective. *Cell Adhesion & Migration*. 8(5): 452-459.

Crespo, R., Villaverde, M.L., Girotti, J.R., Güerci, A., Juárez, M.P. & De Bravo, M.G. (2011) Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 136: 204-209.

Crowson, R.A. (1981) *The Biology of the Coleoptera*. Academic Press, London, 802 pp.

Ćurčić, S.B., Brajković, M.M. & Ćurčić, B.P.M. (2007) *The Carabids of Serbia*. Institute of Zoology, Faculty of Biology, University of Belgrade; Committee for Karst and Speleology, Serbian Academy of Sciences and Arts; Department of Conservation Biology, Vegetation- and Landscape Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Vienna & UNESCO MAB Committee of Serbia, Belgrade-Vienna, 1083 pp.

Ćurčić, S. & Stanković, M. (2011) The ground beetles (Coleoptera: Carabidae) of the Zastavica Special Nature Reserve (Serbia). *Acta entomologica serbica*. 16: 61-79.

Dagenais, T.R.T. & Keller, N.P. (2009) Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 22(3): 447-465. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>

Dai, B.D., Wang, Y., Li, D.D., Xu, Y., Liang, R.M., Zhao, L.X., Cao Y.B., Jia, J.H. & Jiang, Y.Y. (2012) Hsp90 is involved in apoptosis of *Candida albicans* by regulating the calcineurin-caspase apoptotic pathway. *PLoS ONE.* 7(9): e45109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045109>

Daouk, K.D., Dagher, M.S. & Sattout, J.E. (1995) Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection.* 58: 1147-1149. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.10.1147>

Dean, J., Aneshansley, D.J., Edgerton, H.E. & Eisner, T. (1999) Defensive spray of the bombardier beetle: a biological pulse jet. *Science.* 248(4960): 1219-1221.

Degenkolb, T., Düring, R.A. & Vilcinskis, A. (2011) Secondary metabolites released by the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*: chemical analyses and possible ecological functions. *Journal of Chemical Ecology.* 37: 724-735. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9978-4>

De Leon, M.P., Montecillo, A.D., Pinili, D.S., Siringan, M.A.T. & Park, D.-S. (2018) Bacterial diversity of bat guano from Cabalyorisa Cave, Mabini, Pangasinan, Philippines: a first report on the metagenome of Philippine bat guano. *PLoS ONE.* 13(7): e0200095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205947>

De Mandal, S., Zothansanga, Panda, A.K., Bisht, S.S. & Kumar, N.S. (2015) First report of bacterial community from a Bat Guano using Illumina next-generation sequencing. *Genom Data.* 4: 99-101. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.04.001>

Desbois, A.P. & Smith, V.J. (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 85: 1629-1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>

Desender, K., Dufrêne, M., Loreau, M., Luff, M.L. & Maelfait, J.-P. (Eds.) (1994) Carabid Beetles: Ecology and Evolution. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 476 pp.

Dettner, K. (1985) Ecological and phylogenetic significance of defensive compounds from pygidial glands of Hydradephaga (Coleoptera). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 137: 156-171.

Dettner, K. (1987) Chemosystematics and evolution of beetle chemical defences. *Annual Review of Entomology*. 32(1): 17-48. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.000313>

Dettner, K. (2014). Chemical ecology and biochemistry of Dytiscidae. pp. 235-306. In: Yee, D. A. (Ed.): Ecology, Systematics, and the Natural History of Predaceous Diving Beetles (Coleoptera: Dytiscidae). Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9109-0_6

De Visser, K.E., Eichten, A. & Coussens, L.M. (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*. 6: 24-37. <https://doi.org/10.1038/nrc1782>

Diba, K., Korbacheh, P., Mirhendi, S.H. & Rezaie, S. (2007) Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 23(6): 867-872.

Di Giulio, A., Muzzi, M. & Romani, R. (2015) Functional anatomy of the explosive defensive system of bombardier beetles (Coleoptera, Carabidae, Brachininae). *Arthropod Structure & Development*. 44(5): 468-490. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2015.08.013>

Douglas, A.E. (2011) Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe*. 10(4): 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.001>

Drobniewski, F.A. (1993) *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*. 6(4): 324-338.

Egerton, R.F. (2005) Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM. Springer, New York, 202 pp. <https://doi.org/10.1007/b136495>

Eisner, T., Aneshansley, D.J., Eisner, M., Attygalle, A.B., Alsop, D.W. & Meinwald, J. (2000) Spray mechanism of the most primitive bombardier beetle (*Metrius contractus*). *Journal of Experimental Biology*. 203: 1265-1275.

Eisner, T., Aneshansley, D.J., Yack, J., Attygalle, A.B. & Eisner, M. (2001) Spray mechanism of crepidogastrine bombardier beetles (Carabidae; Crepidogastrini). *Chemoecology*. 11(4): 209-219. <https://doi.org/10.1007/PL00001853>

Ekbom, B.S., Wiktelius, S. & Chiverton, P. A. (1992) Can polyphagous predators control the bird cherryoat aphid (*Rhopalosiphum padi*) in spring cereals? *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 65: 215-223. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb00674.x>

Ellis, M.B. & Ellis, J.P. (1997) *Microfungi on Land Plants. An Identification Handbook*. Richmond Publishing, Slough.

Entin-Meer, M., Rephaeli, A., Yang, X., Nudelman, A., VandenBerg, S.R. & Haas-Kogan, D.A. (2005) Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radio sensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics*. 4: 1952-1961. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0087>

Erwin, T.L. (1985) The taxon pulse: a general pattern of lineage radiation and extinction among carabid beetles. pp. 437-472. *In*: Ball, G.E. (Ed.): *Taxonomy, Phylogeny and Zoogeography of Beetles and Ants*. W. Junk, Dordrecht-Boston.

Evans, M.E.G. (1977) Locomotion in the Coleoptera, Adephaga, especially Carabidae. *Journal of Zoology*. 181: 189-226. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1977.tb03237.x>

Fàbrega, A. & Vila, J. (2013) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(2): 308-341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>

Faye, I., Pye, A., Rasmuson, T., Boman, H.G. & Boman, I.A. (1975) Simultaneous induction of antibacterial activity and selection synthesis of some hemolymph proteins in

diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infection and Immunity*. 12(6): 1426-1438.

Feng, Y., Zhao, M., He, Z., Chen, Z. & Sun, L. (2009) Research and utilization of medicinal insects in China. *Entomological Research*. 39(5): 313-316. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2009.00236.x>

Forsyth, D.J. (1970) The ultrastructure of the pygidial defence glands of the carabid *Pterostichus madidus* F. *Journal of Morphology*. 131: 397-416. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051310404>

Forsyth, D.J. (1972) The structure of the pygidial defence glands of Carabidae (Coleoptera). *Transactions of the Zoological Society of London*. 32: 249-309. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1972.tb00029.x>

Francke, W. & Dettner, K. (2005) Chemical signalling in beetles. pp: 85-166. *In*: Schulz, S. (Ed.): The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II. Topics in Current Chemistry. Volume 240. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

French, B.W. & Elliott, N.C. (1999) Temporal and spatial distribution of ground beetle (Coleoptera: Carabidae) assemblages in grasslands and adjacent wheat fields. *Pedobiologia*. 43: 73-84.

Ghannoum, M.A. & Rice, L.B. (1999) Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 501-517.

Ghilarov, M.S. (1958) Biologhicheski aktivnye veshchestva, vydeljaemye nasekomymi. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2: 208-216.

Giglio, A., Brandmayr, P., Dalpozzo, R., Sindona, G., Tagarelli, A., Talarico, F., Brandmayr, T.Z. & Ferrero, E.A. (2009) The defensive secretion of *Carabus lefebvrei* Dejean, 1826 pupa (Coleoptera, Carabidae): gland ultrastructure and chemical identification. *Microscopy Research and Technique*. 72(5): 351-361. <https://doi.org/10.1002/jemt.20660>

Giglio, A., Brandmayr, P., Talarico, F. & Zetto, T. (2011) Current knowledge on exocrine glands in carabid beetles: structure, function and chemical compounds. *ZooKeys*. 100: 193-201. <https://doi.org/10.3897/zookeys.100.1527>

Gilbert, J.A., Quinn, R.A., Debelius, J., Xu, Z.Z., Morton, J., Garg, N., Jansson, J.K., Dorrestein, P.C. & Knight, R. (2016) Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*. 535(7610): 94-103. <https://doi.org/10.1038/nature18850>

Giuliani, A., Pirri, G. & Nicoletto, S. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*. 2(1): 1-33. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>

Glassman, H.N. (1948) Surface active agents and their application in bacteriology. *Bacteriological Reviews*. 12: 105-148.

Gongalsky, K.B. & Cividanes, F.J. (2008) Distribution of carabid beetles in agroecosystems across spatial scales – a review. *Baltic Journal of Coleopterology*. 8: 15-30.

Gravesen, S. (1979) Fungi as a cause of allergic disease. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 34: 135-154. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1979.tb01562.x>

Grzywacz, A., Góral, T., Szpila, K. & Hall, M.J.R. (2014) Confocal laser scanning microscopy as a valuable tool in Diptera larval morphology studies. *Parasitology Research*. 113(11): 4297-4302. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4125-0>

Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L., Silva-Pereira, I. & Kyaw, C.M. (2013) Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*. 4: 353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>

Habib, F., Rind, R., Durani, N., Bhutto, L.A., Buriro, R.S., Tunio, A., Aijaz, N., Lakho, S.A., Bugti, A.G. & Shoaib, M (2015) Morphological and cultural characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from different animal species. *Applied Environmental and Biological Sciences*. 5(2): 15-26.

Hanel, H. & Raether, W. (1988) A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*. 31: 148-154.

Harada, H., Yamashita, U., Kurihara, H., Fukushi, E., Kawabata, J. & Kamei, Y. (2002) Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer Research*. 22(5): 2587-2590.

Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. & Kredics, L. (2013) *Trichoderma* as a human pathogen. pp. 292-313. In: Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh, U.S., Mukherjee, M. & Schmoll, M. (Eds.): *Trichoderma - Biology and Applications*. CABI, Wallingford.

Helmchen, F. & Denk, W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*. 2(12): 932-940.

Hoback, W.W., Bishop, A.A., Kroemer, J., Scalzitti, J. & Shaffer, J.J. (2004) Differences among antimicrobial properties of carrion beetle secretions reflect phylogeny and ecology. *Journal of Chemical Ecology*. 30(4): 719-729. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000028427.53141.41>

Holliday, A.E., Mattingly, T.M. & Holliday, N.J. (2015) Defensive secretions of larvae of a carabid beetle. *Physiological Entomology*. 40(2): 131-137. <https://doi.org/10.1111/phen.12096>

Homburg, K., Drees, C., Gossner, M.M., Rakosy, L., Vrezec, A. & Assmann, T. (2013) Multiple glacial refugia of the low-dispersal ground beetle *Carabus irregularis*: molecular data support predictions of species distribution models. *PLoS ONE*. 8: 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061185>

Hoover, E.E. & Squier, J.A. (2013) Advances in multiphoton microscopy technology. *Nature Photonics*. 7(2): 93-101. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.361>

Hou, C.T., Ciegler, A. & Hesseltine, C.W. (1972) New mycotoxin, trichotoxin A, from *Trichoderma viride* isolated from southern leaf blight-infected corn. *Applied Microbiology*. 23(1): 183-185.

Huang, C.B., Altimova, Y., Myers, T.M. & Ebersole, J.L. (2011) Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*. 56(7): 650-665. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.011>

Huang, J., Cavanaugh, T. & Nur, B. (2013) An introduction to SEM operational principles and geologic applications for shale hydrocarbon reservoirs. pp. 1-6. *In*: Camp, W., Diaz, E. & Wawak, B. (Eds.): *Electron Microscopy of Shale Hydrocarbon Reservoirs*. Memoir 102. AAPG, Tulsa.

Hubbard, H.G. (1898) Insect life in Florida caves. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 4: 394.

Hůrka, K. (1996) Carabidae of the Czech and Slovak Republics. Kabourek, Zlín, 565 pp.

Hwang, J.S., Lee, J., Kim, Y.J., Bang, H.S., Yun, E.Y., Kim, S.R., Suh, H.J., Kang, B.R., Nam, S.H., Jeon, J.P., Kim, I. & Lee, D.G. (2009) Isolation and characterization of a defensin-like peptide (coprisin) from the dung beetle, *Copris tripartitus*. *International Journal of Peptides*. 2009: 136284. <https://doi.org/10.1155/2009/136284>

Inkson, B.J. (2016) Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. pp. 17-43. *In*: Hübschen, G., Altpeter, I., Tschuncky, R. & Herrmann, H.-G. (Eds.): *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. Woodhead Publishing, Cambridge. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>

Iyyappan, V., Nagarajan, D. & Ramesh Kumar, T. (2016) Scanning electron microscopic studies on the defense gland system of *Pheropsophus hilaris* (Coleoptera: Carabidae). *International Journal of Current Research*. 8(5): 31398-31401.

Jung, J.W., Baeck, S.-J., Perumalsamy, H., Hansson, B.S., Ahn, Y.-J. & Kwon, H.W. (2015) A novel olfactory pathway is essential for fast and efficient blood-feeding in mosquitoes. *Scientific Reports*. 5: 13444. <https://doi.org/10.1038/srep13444>

Kabić, J. (2016) Mikrobijalni diverzitet guana iz pećina Srbije. Master rad. Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet, Beograd, 53 pp.

Kanat, M. & Özbolat, M. (2006) Mass production and release of *Calosoma sycophanta* L. (Coleoptera: Carabidae) used against the pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Schiff.) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae), in biological control. *Turkish Journal of Zoology*. 30: 181-185.

Kanehisa, K. & Kawazu, K. (1982) Fatty acid components of the defensive substances in acid-secreting carabid beetles. *Applied Entomology and Zoology*. 17(4): 460-466. <https://doi.org/10.1303/aez.17.460>

Kanehisa, K. & Murase, M. (1977) Comparative study of the pygidial defensive systems of carabid beetles. *Applied Entomology and Zoology*. 12(3): 225-235. <https://doi.org/10.1303/aez.12.225>

Kanehisa, K. & Shiraga, T. (1978) Morphological study of the defensive systems of carabid beetles. *Berichte des Ohara Instituts für landwirtschaftliche Biologie, Okayama Universität*. 17: 83-94.

Karp, R.D. (1996) Inducible humoral immune defense responses in insects. pp. 67-87. In: Rinkevich, B. & Müller, W.E.G. (Eds.): *Invertebrate Immunology. Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Vol. 15. Springer, Berlin-Heidelberg.

Karuppusamy, S. & Rajasekaran, K.M. (2009) High throughput antibacterial screening of plant extracts by resazurin redox with special reference to medicinal plants of Western Ghats. *Global Journal of Pharmacology*. 3(2): 63-68.

Kasukabe, T., Rephaeli, A. & Honma, Y. (1997) An anti-cancer derivative of butyric acid (pivalyloxmethyl buterate) and daunorubicin cooperatively prolong survival of mice inoculated with monocytic leukaemia cells. *British Journal of Cancer*. 75(6): 850-854.

Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T. & Turkes, T. (2014) Bat guano as new and attractive chitin and chitosan source. *Frontiers in Zoology*. 11(1): 59-69. <https://doi.org/10.1186/s12983-014-0059-8>

Kazemi-sefat, N.A., Mohammadi, M.M., Hadjati, J., Talebi, S., Ajami, M. & Daneshvar, H. (2015) The cytotoxicity of a short chain fatty acid histone deacetylase inhibitor on HCT116 human colorectal carcinoma cell line. *MedCrave Online Journal of Immunology*. 2: 00034.

Keehnen, N.L.P., Rolff, J., Theopold, U. & Wheat, C.W. (2017) Insect antimicrobial defences: a brief history, recent findings, biases, and a way forward in evolutionary studies. *Advances in Insect Physiology*. 52: 1-33.

Klaus, A.V., Kulasekera, V.L. & Schawaroch, V. (2003) Three-dimensional visualization of insect morphology using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Microscopy*. 212: 107-121. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2003.01235.x>

Koch, P.B., Behnecke, B., Weigmann-Lenz, M. & Ffrench-Constant, R.H. (2000) Insect pigmentation: activities of beta-alanyldopamine synthase in wing color patterns of wild-type and melanic mutant swallowtail butterfly *Papilio glaucus*. *Pigment Cell Research*. 8: 54-58.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. (2016) From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*. 165(6): 1332-1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>

Koivula, M.J. (2011) Useful model organisms, indicators, or both? Ground beetles (Coleoptera, Carabidae) reflecting environmental conditions. *ZooKeys*. 100: 287-317. <https://doi.org/10.3897/zookeys.100.1533>

Kokot, B., Štrancar, J. & Urbančič, I. (2015) Two-Photon Fluorescence Microscopy. Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 11 pp.

Korine, C., Izahi, I. & Arad, Z. (1999) Is the Egyptian fruit bat *Rousettus aegyptiacus* a pest in Israel? An analysis of the bat's diet and implications for its conservation. *Biological Conservation*. 88: 301-306.

Kotze, D.J., Brandmayr, P., Casale, A., Dauffy-Richard, E., Dekoninck, W., Koivula, M.J., Lövei, G.L., Mossakowski, D., Noordijk, J., Paarmann, W., Pizzolotto, R., Saska, P., Schwerk, A., Serrano, J., Szyszko, J., Taboada, A., Turin, H., Venn, S., Vermeulen, R. & Zetto,

T. (2011) Forty years of carabid beetle research in Europe – from taxonomy, biology, ecology and population studies to bioindication, habitat assessment and conservation. *ZooKeys*. 100: 55-148. <https://doi.org/10.3897/zookeys.100.1523>

Kovac, D. & Maschwitz, U. (1990) Secretion-grooming in aquatic beetles (Hydradephaga): a chemical protection against contamination of the hydrofuge respiratory region. *Chemoecology*. 1: 131-138.

Kubátová, A. & Dvořák, L. (2005) Entomopathogenic fungi associated with insect hibernating in underground shelters. *Czech Mycology*. 57(3-4): 221-237.

Kurata, S., Morishita, K., Kawase, T. & Umemoto, K. (2012) Cytotoxic effects of acrylic acid, methacrylic acid, their corresponding saturated carboxylic acids, HEMA, and hydroquinone on fibroblasts derived from human pulp. *Dental Materials Journal*. 31: 219-225.

Kwon-Chung, K.J. & Sugui, J.A. (2013) *Aspergillus fumigatus* - what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathogens*. 9(12): 1-4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743>

Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J.L., Wicker, C., Reichhart, J.M., Dunbar, B., Lepage, P., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J., Fothergill, J. & Hoffmann, D. (1989) Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 262-266. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.262>

Lečić, S., Čurčić, S., Vujisić, L., Čurčić, B., Čurčić, N., Nikolić, Z., Anđelković, B., Milosavljević, S., Tešević, V. & Makarov, S. (2014) Defensive secretion in three ground-beetle species (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *Annales Zoologici Fennici*. 51(3): 285-300. <https://doi.org/10.5735/086.051.0301>

Lee, H. & Lee, D.G. (2018) Novel approaches for efficient antifungal drug action. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(11): 1771-1781. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07002>

Lee, S., Brown, R.L. & Monroe, W. (2009) Use of confocal laser scanning microscopy in systematics of insects with a comparison of fluorescence from different stains. *Systematic Entomology*. 34(1): 10-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.00451.x>

Lee, S.Y., Moon, H.J., Kawabata, S., Kurata, S., Natori, S. & Lee, B.L. (1995) A sapecin homologue of *Holotrichia diomphalia*: purification, sequencing and determination of disulfide pairs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 18: 457-459. <https://doi.org/10.1248/bpb.18.457>

Lee, Y.S., Yun, E.K., Jang, W.S., Kim, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Ryu, K.S., Seo, S.J., Kim, C.H. & Lee, I.H. (2004) Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Molecular Biology*. 13: 65-72.

Limay-Rios, V., Miller, J.D. & Schaafsma, A.W. (2017) Occurrence of *Penicillium verrucosum*, ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin in on-farm stored winter wheat from the Canadian Great Lakes Region. *PLoS ONE*. 12(7): e0181239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181239>

Liwa, A.C. & Jaka, H. (2015) Antimicrobial resistance: mechanisms of action of antimicrobial agents. pp. 876-885. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.): *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Formatex Research Center, Badajoz.

Lövei, G.L. & Sunderland, K.D. (1996) Ecology and behaviour of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Annual Review of Entomology*. 41: 231-256. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.001311>

Lundgren, L.G., Lehman, R.M. & Chee-sanford, J. (2007) Bacterial communities within digestive tracts of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 100(2): 275-282.

Matsumoto, B. & Adams, B. (2002) *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy* (2nd Ed.). *Methods in Cell Biology*. Academic Press, San Diego.

McIntosh, A.C. & Lawrence, J. (2018) The extraordinary design of the bombardier beetle - a classic example of biometrics. pp. 268-276. *In: Whitmore, J.H. (Ed.): Proceedings of the Eighth International Conference on Creationism. Creation Science Fellowship, Pittsburgh.*

McIntosh, A.C. & Prongidis, P. (2010) Further biomimetic challenges from the bombardier beetle: the intricate chemical production system. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*. 138: 265-272. <https://doi.org/10.2495/DN100231>

Merikli, F., Becerb, E., Kabadayı, H., Hanoglu, A., Hanoglu, D.Y., Yavuz, D.O., Ozeke, T. & Vatansever, S. (2017) Fatty acid composition and anticancer activity in colon carcinoma cell lines of *Prunus dulcis* seed oil. *Pharmaceutical Biology*. 55(1): 1239-1248. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1296003>

Miller, C.F. (1914) On the composition and value of bat guano. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 6(8): 664-665. <https://doi.org/10.1021/ie50068a015>

Miron, D., Battisti, F., Silva, F.K, Lana, A.D., Pippi, B., Casanova, B., Gnoatto, S., Fuentefria, A., Mayorga, P. & Schapoval, E.E.S. (2014) Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 24(6): 660-667. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.014>

Moon, H.J., Lee, S.Y., Kurata, S., Natori, S. & Lee, B.L. (1994) Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. *Journal of Biochemistry*. 116: 53-58.

Moore, B. P. (1979) Chemical defence in carabids and its bearing on phylogeny. pp. 193-203. *In: Erwin, T.L., Ball, G.E. & Whitehead, D.R. (Eds.): Carabid Beetles: Their Evolution, Natural History and Classification. Dr. W. Junk, London.* https://doi.org/10.1007/978-94-009-9628-1_9

Morgan, E.D. (2004) Biosynthesis in Insects. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 200 pp. <https://doi.org/10.1039/9781847550262>

Mulligan, S. & MacVicar, B.A. (2007) Two-photon fluorescence microscopy: basic principles, advantages and risks. pp. 881-889. In: Méndez-Vilas, A. & Díaz, J. (Eds.). Modern Research and Educational Topics in Microscopy. Formatex Research Center, Badajoz.

Muntañola-Cvetković, M. (1987) Opšta mikologija. Naučna knjiga, Beograd, 320 pp.

Murdock, C.C., Paaijmans, K.P., Cox-Foster, D., Read, A.F. & Thomas, M.B. (2012) Rethinking vector immunology: the role of environmental temperature in shaping resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 10(12): 869-876. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2900>

Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M. & Vilcinskas, A. (2016) Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 371: 1-9. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>

Nenadić, M., Ljaljević-Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Ćirić, A., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijević, M., Vesović, N., Živković, N. & Ćurčić, S. (2017a) Antifungal activity of the pygidial gland secretion of *Laemostenus punctatus* (Coleoptera: Carabidae) against cave-dwelling micromycetes. *The Science of Nature*. 104(5-6): 52. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1474-4>

Nenadić, M., Soković, M., Calhelha, R.C., Ferreira, I.C.F.R., Ćirić, A., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2018) Inhibition of tumour and non-tumour cell proliferation by pygidial gland secretions of four ground beetle species (Coleoptera: Carabidae). *Biologia*. 73(8): 787-792. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0082-x>

Nenadić, M., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Tešević, V., Todosijević, M., Vujisić, L., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2017b) The pygidial gland secretion of the forest caterpillar hunter, *Calosoma* (*Calosoma*) *sycophanta*: the antimicrobial properties against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101(3): 977-985. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8082-7>

Nenadić, M., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijević, M., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2016a) Antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of three ground beetle species (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *The Science of Nature*. 103(3-4): 34. <https://doi.org/10.1007/s00114-016-1358-z>

Nenadić, M., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijević, M., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2016b) Antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of the troglomorphic ground beetle *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828) (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *Bulletin of Entomological Research*. 106(4): 474-480. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000109>

Nešić, D., Pavićević, D., Zatezalo, A., Mijatović, M. & Grubač, B. (2008) Rezultati kompleksnih istraživanja Ogoreličke pećine. *Zaštita prirode*. 59: 51-66.

Newman, M.M., Kloepper, L.N., Duncan, M., McInroy, J.A. & Kloepper, J.W. (2018) Variation in bat guano bacterial community composition with depth. *Frontiers in Microbiology*. 9(9): 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00914>

Niemelä, J. (Ed.) (1996) Population Biology and Conservation of Carabid Beetles. Proceedings of the 3rd International Symposium of Carabidology, Kauniainen, Finland. *Annales Zoologici Fennici*. 33: 1-241.

Nieves-Rivera, A.M., Santos-Flores, C.J., Dugan, F.M. & Miller, T.E. (2009) Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. *International Journal of Speleology*. 38(1): 61-70.

Nixon, W.C. (1971) The general principles of scanning electron microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*. 261(837): 45-50.

Ntwasa, M., Goto, A. & Kurata, S. (2011) Coleopteran antimicrobial peptides: prospects for clinical applications. *International Journal of Microbiology*. 2012: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/101989>

Nudelman, A., Ruse, M., Aviram, A., Rabizadeh, E., Shaklai, M., Zimra, Y. & Rephaeli, A. (1992) Novel anticancer prodrugs of butyric acid. *Journal of Medicinal Chemistry*. 35: 687-694.

Osawa, S., Su, Z.-H. & Imura, Y. (2002) Molecular Phylogeny and Evolution of Carabid Ground Beetles. Philosophy Press, Tokyo, 175 pp.

Padda, K.P., Puri, A. & Chanway, C.P. (2017) *Paenibacillus polymyxa*: a prominent biofertilizer and biocontrol agent for sustainable agriculture. pp. 165-191. In: Meena, V.S., Mishra, P.K., Bisht, J.K. & Pattanayak, A. (Eds.): *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore.

Panday, J.P. & Tiwari, R.K. (2012) An overview of insect hemocyte science and its future application in applied and biomedical fields. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2(3): 82-105.

Paoletti, M.G., Mazzon, L., Martinez-Sañudo, I., Simonato, M., Beggio, M., Dreon, A.L., Pamio, A., Brilli, M., Dorigo, L., Engel, A.S., Tondello, A., Baldan, B., Concheri, G. & Squartini, A. (2013) A unique midgut-associated bacterial community hosted by the cave beetle *Cansiliella servadeii* (Coleoptera: Leptodirini) reveals parallel phylogenetic divergences from universal gut-specific ancestors. *BMC Microbiology*. 13: 129. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-129>

Paoli, M. & Haase, A. (2018) *In vivo* two-photon imaging of the olfactory system in insects. *Methods in Molecular Biology*. 1820: 179-219. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8609-5_15

Patil, N.S. & Jadhav, J.P. (2015) Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. *Chemosphere*. 128: 231-235. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.038>

Paulussen, C., Hallsworth, J.E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W.C., Hamill, P.G., Blain, D., Rediers, H. & Lievens, B. (2016) Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*. 10(2): 296-322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>

Pavan, M. (1968). *Defensive Secretions of Arthropoda*. European Research Office, United States Army, U. S. Clearinghouse for Federal Scientific and Technical Information, Frankfurt am Main, 234 pp.

Peltari, E., Lehtinen, M. & Elo, H. (2011) Substituted salicylaldehydes as potential antimicrobial drugs: minimal inhibitory and microbicidal concentrations. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 66(11-12): 571-580. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-7-806>

Perrone, G. & Susca, A. (2017) *Penicillium* species and their associated mycotoxins. pp. 107-119. In: Moretti, A. & Susca, A. (Eds). *Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*, Vol. 1542. Humana Press, New York.

Pfohl-Leszkowicz, A. & Manderville, R. (2007) Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51(1): 61-99. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>

Pitt, J.I. (1979) The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 634 pp.

Potts, G.R. & Vickerman, G.P. (1974) Studies on the cereal ecosystem. *Advances of Ecological Research*. 8: 107-197. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60278-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60278-0)

Poulson, T.L. (1972) Bat guano ecosystems. *Bulletin of the National Speleological Society*. 72: 55-59.

Rabasović, M.D., Pantelić, D.V., Jelenković, B.M., Čurčić, S., Rabasović, M.S., Vrbica, M., Lazović, V., Čurčić, B.P.M. & Krmpot, A.J. (2015) Nonlinear microscopy of chitin and chitinous structures: a case study of two cave-dwelling insects. *Journal of Biomedical Optics*. 20(1): 16010. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.1.016010>

Rahmawati, H., Purnomo, A.J., Umniyatie, S., Pramiadi, D. & Sari, N. (2016) Identification and characterization of chitinase enzyme producing bacteria from bat guano and its potential to inhibit the growth of fungus *Colletotrichum* sp. cause anthracnose on the chili by *in vitro*. *International Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engineering*. 3(2): 249-254. <http://dx.doi.org/10.15242/IJAAEE.U0516208>

Rainio, J. & Niemelä J. (2003) Ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as bioindicators. *Biodiversity and Conservation*. 12: 487-506.

Rana, R.L., Hoback, W.W., Nor Aliza, A.R. & Bedick, J. (1997) Pre-oral digestion: a phospholipase A2 associated with oral secretions in adult burying beetles, *Nicrophorus marginatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*. 118(2): 375-380. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00105-3)

Raper, B.K. & Fennell, D.I. (1965) The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 686 pp.

Ratcliffe, N., Azambuja, P. & Mello, C.B. (2014) Recent advances in developing insect natural products as potential modern day medicines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014: 1-21. <https://doi.org/10.1155/2014/904958>

Ravi, C., Jeyashree, A. & Renuka Devi, K. (2011) Antimicrobial peptides from insects: an overview. *Research in Biotechnology*. 2(5): 1-7.

Ribera, I., McCracken, D.I., Foster, G.N., Downie, I.S. & Abernethy, V.J. (1999) Morphological diversity of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in Scottish agricultural land. *Journal of Zoology*. 247: 1-18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1999.tb00188.x>

Ristivojević, P., Dimkić, I., Trifković, J., Berić, T., Vovk, I., Milojković-Opsenica, D. & Stanković, S. (2016) Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics. *PLoS ONE*. 11(6): e0157097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157097>

Robertson, M. & Postlethwait, J.H. (1986) The humoral antibacterial response of *Drosophila* adults. *Developmental and Comparative Immunology*. 10(2): 167-179.

Rolff, J. & Reynolds, S.E. (2009) *Insect Infection and Immunity*. Oxford University Press, Oxford, 253 pp.

Rork, A.M., Mikó, I. & Renner, T. (2019) Pygidial glands of *Harpalus pensylvanicus* (Coleoptera: Carabidae) contain resilin-rich structures. *Arthropod Structure & Development*. 49: 19-25.

Rosales, C. (2017) Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. pp. 179-212. *In: Shields, V.D.C. (Ed.): Insect Physiology and Ecology. IntechOpen, London.* <https://doi.org/10.5772/67107>

Rossini, C., Attygalle, A.B., González, A., Smedley, S.R., Eisner, M., Meinwald, J. & Eisner, T. (1997) Defensive production of formic acid (80%) by a carabid beetle (*Galerita lecontei*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 94(13): 6792-6797. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6792>

Roy, S., Saha, S. & Pal, P. (2015) Insect natural products as potential source for alternative medicines - a review. *World Scientific News.* 19: 80-94. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-52>

Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schäfer, T., Wiedemann, G. & Oehlbauer, M. (2009) The antimicrobial effect of acetic acid—an alternative to common local antiseptics? *Burns.* 35(5): 695-700. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.11.009>

Sahoo, B.R. & Fujiwara, T. (2016) Membrane mediated antimicrobial and antitumor activity of cathelicidin 6: structural insights from molecular dynamics simulation on multi-microsecond scale. *PLoS ONE.* 11(7): e0158702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158702>

Sakurazawa, T. & Ohkusa, T. (2005) Cytotoxicity of organic acids produced by anaerobic intestinal bacteria on cultured epithelial cells. *Journal of Gastroenterology.* 40(6): 600-609.

Samani, F., Monfared, A.S., Zabihi, E., Khafri, S., Karimi, M. & Niaki, H.A. (2014) Evaluation of the effects of paederus beetle extract and gamma irradiation on HeLa cells. *The Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 17(4): 303-306.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S. & Frisvad, J.C. (2004) Introduction to Food- and Airborne Fungi (7th Ed.). ASM Press, Washington, DC, 389 pp.

Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010) Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.

Sanderson, M.J., Smith, I., Parker, I. & Bootman, M.D. (2014) Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2014(10): 1042-1065. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>

Santos, S.I.C.O., Mathew, M. & Loza-Alvarez, P. (2009) Real time imaging of femtosecond laser induced nano-neurosurgery dynamics in *C. elegans*. *Optic Express*. 18(1): 364-377.

Schierling, A. & Dettner, K. (2013) The pygidial defense gland system of the Steninae (Coleoptera, Staphylinidae): morphology, ultrastructure and evolution. *Arthropod Structure & Development*. 42: 197-208.

Schildknecht, H.W., Maschwitz, U. & Winkler, H. (1968) Zur Evolution der Carabiden Wehrdrüsensekrete. Über Arthropoden-Abwehrstoffe XXXII. *Naturwissenschaften*. 55: 112-117. <https://doi.org/10.1007/BF00624238>

Schildknecht, H. & Weis, K. H. (1962) Die Abwehrstoffe einiger Carabiden insbesondere von *Abax ater*. XII. Mitteilung über Insektenabwehrstoffe. *Zeitschrift für Naturforschung B: Chemical Sciences*. 17(7): 439-447. <https://doi.org/10.1515/znb1962-0706>

Schroeder, T.B.H., Houghtaling, J., Wilts, B.D. & Mayer, M. (2018) It's not a bug, it's a feature: functional materials in insects. *Advanced Materials*. 30(19): e1705322. <https://doi.org/10.1002/adma.201705322>

Schuhmann, B., Seitz, V., Vilcinskas, A. & Podsiadlowski, L. (2003) Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 53(3): 125-133.

Seabrooks, L. & Hu, L. (2017) Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 7(4): 409-426. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.05.001>

Sixma, T.K., Pronk, S.E., Kalk, K.H., Wartna, E.S., van Zanten, B.A., Witholt, B. & Hol, W.G. (1991) Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature*. 351(6325): 371-377. <https://doi.org/10.1038/351371a0>

Smith, D.S., Gupta, B.L. & Smith, U. (1966) The organization and myofilament array of insect visceral muscles. *Journal of Cell Science*. 1: 49-57.

So, P.T.C. (2002) Two-photon fluorescence light microscopy. pp. 1-5. *In: Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd. & Nature Publishing Group, Basingstoke.

Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D. & Van Griensven, L.J.L.D. (2010) Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*. 15: 7532-7546.

Soković, M.D., Glamočlija, J.M., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vukojević, J.B., Jovanović, D., Bulajić, N. & Kataranovski D.S. (2007) Experimentally induced dermatomycoses at rats and treatment with *Lavandula angustifolia* essential oil. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad*. 113: 249-254.

Spangler, B.D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiology Reviews*. 56(4): 622-647.

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H. & Boman, H.G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. 292(5820): 246-248.

Steven, P., Koop, N. & Hüttmann, G. (2008) Confocal microscopy vs. two-photon microscopy: imaging of ocular surface pathologies. *Proceedings of SPIE*. 6860: 686023. <https://doi.org/10.1117/12.76365>

Suryadi, B.F., Yanuwidi, B. & Suharjono, S. (2016) Evaluation of entomopathogenic *Bacillus sphaericus* isolated from Lombok beach area against mosquito larvae. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(2): 148-154.

Thiele, H.U. (1977). *Carabid Beetles in Their Environments*. Springer, Berlin-Heidelberg, 369 pp.

Thompson, J.L. & Hinton, M. (1997) Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on Salmonellas in the crop. *British Poultry Science*. 38(1): 59-65. <https://doi.org/10.1080/00071669708417941>

Tonk, M., Vilcinskas, A. & Rahnamaeian, M. (2016) Insect antimicrobial peptides: potential tools for the prevention of skin cancer. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100: 7397-7405. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7718-y>

Trautner, J. & Geigenmüller, K. (1987) Illustrated Key to the Cicindelidae and Carabidae of Europe. Josef Margraf, Aichtal, 488 pp.

Turin, H., Penev, L.D. & Casale, A. (2003) The Genus *Carabus* in Europe. A Synthesis. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow, 536 pp.

Valeur, B. & Berberan-Santos, M. (2012) Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH, Weinheim, 592 pp.

Vanderwolf, K.J., Malloch, D., McAlpine, D.F. & Forbes, G.J. (2013) A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *International Journal of Speleology*. 42: 77-96. <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.9>

Van Kempen, L.C.L., de Visser, K.E. & Coussens, L.M. (2006) Inflammation, proteases and cancer. *European Journal of Cancer*. 42: 728-734. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.004>

Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(3): 584-640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>

Veith, M., Lorenz, M., Boland, W., Simon, H.M. & Dettner, K. (1994) Biosynthesis of iridoid monoterpenes in insects: defensive secretions from larvae of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Tetrahedron*. 50(23): 6859-6874. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81338-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81338-7)

Venn, S.J., Kotze, J.D. & Niemelä, J. (2003) Urbanization effect carabid diversity in boreal forests. *European Journal of Entomology*. 100: 73-80. <https://doi.org/10.14411/eje.2003.015>

Ventola, C.L. (2015) The antibiotic resistance crisis. Part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 40(4): 277-283.

Vesović, N., Ćurčić, S., Vujisić, L., Nenadić, M., Krstić, G., Perić-Mataruga, V., Milosavljević, S., Antić, D., Mandić, B., Petković, M., Vučković, I., Marković, Đ., Vrbica, M., Ćurčić, B. & Makarov, S. (2015) Molecular diversity of compounds from pygidial gland secretions of cave-dwelling ground beetles: the first evidence. *Journal of Chemical Ecology*. 41(6): 533-539. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0593-7>

Vesović, N., Vujisić, L., Perić-Mataruga, V., Krstić, G., Nenadić, M., Cvetković, M., Ilijin, L., Stanković, L. & Ćurčić, S. (2017) Chemical secretion and morpho-histology of the pygidial glands in two Palaearctic predatory ground beetle species: *Carabus (Tomocarabus) convexus* and *C. (Procrustes) coriaceus* (Coleoptera: Carabidae). *Journal of Natural History*. 51(9-10): 545-560. <https://doi.org/10.1080/00222933.2017.129318>

Vrbica, A., Petrović, A., Pantelić, D., Krmpot, A.J., Rabasović, M.D., Pavlović, D., Jovanić, S., Guéorguiev, B., Goranov, S., Vesović, N., Antić, D., Marković, Đ., Petković, M., Stanisavljević, L. & Ćurčić, S. (2018) The genus *Pheggomisetes* Knirsch, 1923 (Coleoptera: Carabidae: Trechinae) in Serbia: taxonomy, morphology and molecular phylogeny. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 183(2): 347-371. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlx078>

Vukojević, J. (2000) Praktikum iz mikologije i lihenologije. NNK International, Beograd, 244 pp.

Walsh, M.C., Geraert, P.A., Maillard, R., Kluess, J. & Lawlor, P.G. (2012) The effect of a non-starch polysaccharide-hydrolysing enzyme (Rovabio® Excel) on feed intake and body condition of sows during lactation and on progeny growth performance. *Animal*. 6(10): 1627-1633. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000237>

Wang, C., Chen, T., Zhang, N., Yang, M., Li, B., Lü, X., Cao, X. & Ling, C. (2009) Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting IkappaBalpha kinase-NFkappaB. *Journal of Biological Chemistry*. 284(6): 3804-3813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807191200>

Wanger, A., Chavez, V., Huang, R.S.P., Wahed, A., Actor, J.K. & Dasgupta, A. (2017) *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology. A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice*. Elsevier, Amsterdam, 304 pp.

Watanabe, T. (2002) *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species (2nd Ed.)*. CRC Press, Boca Raton, 504 pp.

Welch, R.A. (2006) The genus *Escherichia*. *Prokaryotes*. 6: 60-71. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_3

White, W.B. & Culver, D.C. (2012) *Encyclopedia of Caves*. 2nd Ed. Academic Press, San Diego, 966 pp.

Will, K.W., Attygalle, A.B. & Herath, K. (2000) New defensive chemical data for ground beetles (Coleoptera: Carabidae): interpretations in a phylogenetic framework. *Biological Journal of the Linnean Society*. 71: 459-481. <https://doi.org/10.1006/bijl.2000.0456>

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P. & Edmond, M.B. (2004) Nosocomial bloodstream infections in us hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*. 39: 309-317. <https://doi.org/10.1086/421946>

Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M. & Crous, P.W. (2013) *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*. 75(1): 171-212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>

Wu, Q., Patočka, J. & Kuča, K. (2018) Insect antimicrobial peptides. *Toxins*. 10: 461-488. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>

Xiao, H., Dong, J.-W., Zhou, D.-J., Wu, X.-M., Luo, J.-R., Zhang, C.-G., Guo, N.-N., Li, Y., Cai, L. & Ding, Z.-T. (2017) Cytotoxicity of the defensive secretion from the medicinal insect *Blaps rynchopetera*. *Molecules*. 23(10): 1-8. <https://doi.org/10.3390/molecules23010010>

Xylander, W.E.R. (2009) Antibacterial substances and characteristics of the haemolymph of Chilopoda and Diplopoda (Myriapoda, Arthropoda). *Soil Organisms*. 81: 413-429.

Yi, H.Y., Chowdhury, M., Huang, Y.D. & Yu, X.Q. (2014) Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(13): 5807-5822. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>

Zapata, F. & Hera, C. (1995) Enhancing nutrient management through use of isotope techniques. pp. 83-105. *In: Nuclear Techniques in Soil-Plant Studies for Sustainable Agriculture and Environmental Preservation. Proceedings of an International Symposium On Nuclear and Related Techniques in Soil-Plant Studies on Sustainable Agriculture and Environmental Preservation, Vienna, 17-21 October 1994.* International Atomic Energy Agency, Vienna.

Zhang, Z.T. & Zhu, S.Y. (2009) Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila*. *Insect Molecular Biology*. 18(5): 549-556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00907.x>

Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z.L. & Joy, D. (2006) Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). pp. 1-40. *In: Zhou, W. & Wang, Z.L. (Eds.): Scanning Microscopy for Nanotechnology.* Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1

Zill, S., Frazier, S.F., Neff, D., Quimby, L., Carney, M., DiCaprio, R., Thuma, J. & Norton, M. (2000) Three-dimensional graphic reconstruction of the insect exoskeleton through confocal imaging of endogenous fluorescence. *Microscopy Research and Technique*. 48: 367-384. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(20000315\)48:6<367::AIDJEMT7>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(20000315)48:6<367::AIDJEMT7>3.0.CO;2-Y)

Zipfel, W.R., Williams, R.M. & Web, W.W. (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*. 21: 1369-1377. <https://doi.org/10.1038/nbt899>

Internet adrese

Pristupano u februaru 2017. i septembru 2018:

<http://carabidae.org>

<http://insects.nature4stock.com>

<http://www.biolib.cz>

<http://www.researchgate.net>

9. BIOGRAFIJA

Master biolog Marija Z. Nenadić rođena je u Beogradu 01.09.1989. godine. Osnovnu školu „Janko Veselinović“ i Osmu beogradsku gimnaziju je završila u Beogradu. Tokom srednjoškolskih dana počinje da se bavi biološkim istraživanjima i učestvuje na republičkim takmičenjima. Nagrađivana je od strane Fonda za mlade talente Republike Srbije 2006. (prvo mesto) i 2007. godine (drugo mesto). Takođe, 2007. godine učestvuje i na međunarodnom takmičenju u Sankt Peterburgu, na kome je ostvarila zapažen uspeh. Nakon završetka gimnazije, upisuje Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu školske 2008/09. godine. Tokom osnovnih akademskih studija, učestvuje u mnogobrojnim projektima iz različitih bioloških disciplina i postaje član Studentskog parlamenta i Saveta Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 28. septembra 2012. godine. Iste godine upisuje master akademske studije, modul Neurobiologija, na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku Instituta za fiziologiju i biohemiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta. U toku master akademskih studija je dobila sertifikat o pohađanju kursa „Laboratory animal welfare“, koji je organizovao Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet (Senior programme manager, Europe Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals). Master akademske studije je završila 10. oktobra 2013. godine odbranom master rada pod nazivom „Ćelijski markeri neuroinflamacije i neurodegeneracije u mozgu pacova dve godine nakon globalne moždane ishemije“.

Doktorske akademske studije na istom fakultetu (modul Entomologija) je upisala školske 2013/14. godine. Od 01. decembra 2018. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik, a od 14.06.2019. godine kao istraživač-saradnik na Katedri za zoologiju beskičmenjaka i entomologiju Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta preko međunarodnog projekta „Bioinspirisani materijali za fotonske senzore i bezbednosne uređaje“ [Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Ministarstvo nauke i tehnologije Narodne Republike Kine, evidencioni broj I-2, rukovodioci dr Branislav Jelenković, dopisni član SANU i dr Žang Vang (2018-)]. Govori engleski, nemački, slovački i španski jezik. Član je Entomološkog društva Srbije i Srpskog biološkog društva.

Marija Nenadić je učesnik jednog međunarodnog naučnog projekta:

„Bio-inspirisani materijali za fotonske senzore i bezbednosne uređaje (I-2)“, rukovodioci dr Branislav Jelenković, dopisni član SANU i dr Žang Vang, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Ministarstvo nauke i tehnologije Narodne Republike Kine) (2018-).

Autor je 7 naučnih radova [pet radova iz kategorije M21 (na četiri rada je bila prvi autor), jednog rada iz kategorije M22, jednog rada iz kategorije M23 (kao prvi autor)], kao i tri naučna saopštenja sa skupova međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34) (na dva je bila prvi autor).

10. SPISAK RADOVA PROISTEKLIH IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

RADOVI OBJAVLJENI U NAUČNIM ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA (M20)

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) (8)

1. **Nenadić, M.**, Ljaljević-Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Ćirić, A., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijević, M., Vesović, N., Živković, N. & Ćurčić, S. (2017) Antifungal activity of the pygidial gland secretion of *Laemostenus punctatus* (Coleoptera: Carabidae) against cave-dwelling micromycetes. *The Science of Nature*, 104 (5-6), 52. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1474-4>

Multidisciplinary sciences (18/62); *IF*₂₀₁₅: 1,773

2. **Nenadić, M.**, Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Tešević, V., Todosijević, M., Vujisić, L., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2017) The pygidial gland secretion of the forest caterpillar hunter, *Calosoma* (*Calosoma*) *sycophanta*: the

antimicrobial properties against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (3), 977-985. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8082-7>

Biotechnology and applied microbiology (44/160); IF₂₀₁₆: 3,420

3. **Nenadić, M.**, Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijević, M., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2016) Antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of three ground beetle species (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *The Science of Nature*, 103 (3-4), 34. <https://doi.org/10.1007/s00114-016-1358-z>

Multidisciplinary sciences (14/57); IF₂₀₁₄: 2,098

4. **Nenadić, M.**, Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Perić-Mataruga, V., Tešević, V., Vujisić, L., Todosijević, M., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2016) Antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of the troglomorphic ground beetle *Laemostenus (Pristonychus) punctatus* (Dejean, 1828) (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *Bulletin of Entomological Research*, 106 (4), 474-480. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000109>

Entomology (15/92); IF₂₀₁₄: 1,910

Radovi u međunarodnom časopisu (M23) (3)

5. **Nenadić, M.**, Soković, M., Calhelha, R.C., Ferreira, I.C.F.R., Ćirić, A., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2018) Inhibition of tumour and non-tumour cell proliferation by pygidial gland secretions of four ground beetle species (Coleoptera: Carabidae). *Biologia*, 73 (8): 787-792. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0082-x>

Biology (66/85); IF₂₀₁₆: 0,759

ZBORNICI SA MEĐUNARODNIH NAUČNIH SKUPOVA (M30)

Saopštenja sa skupova međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34) (0,5)

6. **Nenadić, M.**, Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Tešević, V., Vujisić, L., Vesović, N. & Ćurčić, S. (2019) The pygidial gland secretions of ground beetles (Insecta: Coleoptera: Carabidae): antimicrobial and antitumour activity of the natural products. 2nd Balkans-China Mini-Symposium on Natural Products and Drug Discovery, Book of Abstracts, Belgrade, Serbia, 11-13 April 2019, 43.
7. **Nenadić, M.**, Krmpot, A., Vesović, N., Rabasović, M., Ćurčić, S., Pavlović, D., Lačković, V., Savić-Šević, S. & Pantelić, D. (2018). Assessment of three microscopic techniques in observing morphology of pygidial glands of ground beetles. Electron Microscopy of Nanostructures ELMINA2018 Conference, Book of Abstracts, Belgrade, Serbia, 27-29 August 2018, 252-254.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Марија Ненадић

број индекса Б3031/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Антимикробни и анти туморски потенцијал секрета и морфолошка
карактеризација жлезданих структура пигидијалних жлезда одабраних врста
трчуљака (Coleoptera: Carabidae)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 24.6.2019.

М. Ненадић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Ненадић

Број индекса Б3031/2013

Студијски програм Биологија, модул: Ентомологија

Наслов рада Антимикробни и антитуморски потенцијал секрета и морфолошка карактеризација жлезданих структура пигидијалних жлезда одабраних врста трчуљака (Coleoptera: Carabidae)

Ментори: проф. др Срећко Ђурчић и др Ана Ђирић

Потписана Марија Ненадић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 24.6.2019.

С. Ненадић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Антимикробни и антитуморски потенцијал секрета и морфолошка карактеризација

жлезданих структура пигидијалних жлезда одабраних врста трчуљака (Coleoptera:

Carabidae)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 24.6.2019.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.