



**БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ  
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ**

Александра Т. Талевска

**Хемијски састав и биолошка активност екстраката  
слатководног сунђера  
*Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937)**

Докторска дисертација

Београд, 2017.



**FACULTY OF BIOLOGY  
UNIVERSITY OF BELGRADE**

Aleksandra T. Talevska

**Chemical composition and biological activity of the extracts  
of the freshwater sponge  
*Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937)**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2017**

*Мојим родитељима, сестри Елени и мом Јовици*

## Комисија

---

**др Славиша Станковић, ментор**

редовни професор  
Биолошког факултета Универзитета у Београду

---

**др Борис Пејин, ментор**

научни сарадник  
Института за мултидисциплинарна истраживања  
Универзитета у Београду

---

**др Тања Берић, члан**

ванредни професор  
Биолошког факултета Универзитета у Београду

---

**др Ана Ћирић, члан**

виши научни сарадник  
Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић"  
Универзитета у Београду

---

**др Марина Соковић, члан**

научни саветник  
Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић"  
Универзитета у Београду

Датум одбране: \_\_\_\_\_

*Захваљујем се*

*ментору др Славиши Станковићу, редовном професору Биолошког факултета Универзитета у Београду, на указаном поверењу, љубазности, корисним саветима и помоћи коју ми је пружио током студија и израде ове докторске дисертације;*

*ментору др Борису Пејину, научном сараднику Института за мултидисциплинарна истраживања Универзитета у Београду, на предложеној теми, искреној подршци и помоћи у свим фазама израде и писања овог доктората, као и мог даљег усавршавања;*

*члану Комисије др Тањи Берић, ванредном професору Биолошког факултета Универзитета у Београду, на корисним сугестијама и посвећеном времену;*

*члановима Комисије др Ани Ђурић (вишем научном сараднику) и др Марини Соковић (научном саветнику), обе са Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду, пре свега, на конструктивним саветима у писању ове тезе;*

*Институту МОЛ д.о.о. у Старој Пазови, на добронамерној подршци;*

*мојој породици, пријатељима и колегама, на подршци, разумевању и љубави које су ми безрезервно пружали од самог почетка школовања.*

У Београду,  
3. април 2017. године

**Александра Т. Галевска, дипл. инг. биологије**  
E-mail: a\_talevska@yahoo.com

*Very Special Thanks to*

**The Rufford Small Grants Foundation**

Project '**OrO**' - part I: *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937),  
Lake Ohrid

RSG Reference: 16062-1

## Садржај

<b>1. Извод .....</b>	<b>i</b>
<b>2. Апстракт .....</b>	<b>iii</b>
<b>3. Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>4. Анотација .....</b>	<b>vii</b>
<b>5. Увод .....</b>	<b>1</b>
<b>5.1. Сунђери .....</b>	<b>1</b>
5.1.1. Класификација сунђера .....	2
5.1.2. Дистрибуција сунђера .....	4
5.1.2.1. Дистрибуција слатководних сунђера у Р. Македонији .....	5
5.1.2.1.1. Охридско језеро .....	5
5.1.2.1.2. Ендемизам и реликтност Охридског језера .....	6
5.1.2.1.3. Слатководни сунђери у Охридском језеру .....	7
5.1.3. Традиционална медицина .....	10
5.1.4. Феноли .....	11
5.1.5. Испарљива органска једињења .....	12
5.1.6. Биоактивна природна органска једињења сунђера .....	13
5.1.6.1. Антимикробна једињења .....	13
5.1.6.2. Антитуморска једињења .....	14
5.1.6.3. Антиоксидативна једињења .....	14
5.1.6.4. Инхибитори ацетилхолинестеразе .....	14
<b>6. Циљ рада.....</b>	<b>16</b>
<b>7. Материјал и методе .....</b>	<b>17</b>
7.1. Биолошки материјал .....	17
7.2. Екстракција .....	17
7.3. Одређивање хемијског састава .....	18
7.3.1. FTIR спектроскопија .....	18
7.3.2. Једноставни (прости) феноли .....	18
7.3.3. Испарљива органска једињења .....	19
7.3.4. Елементарни састав.....	19
7.4. Одређивање биолошке активности .....	21

7.4.1. Антимикробна активност .....	21
7.4.2. "Anti-quorum sensing" активност .....	22
7.4.3. Антитуморска активност .....	23
7.4.4. Мутагена активност .....	26
7.4.5. Антиоксидативна активност .....	28
7.4.6. Инхибиција ацетилхолинестеразе .....	28
<b>8. Резултати и дискусија .....</b>	<b>30</b>
8.1. FTIR .....	30
8.2. Једноставни (прости) феноли .....	32
8.3. Испарљива органска једињења .....	33
8.4. Елементарни састав .....	35
8.5. Антимикробна активност .....	37
8.6. "Anti-quorum sensing" активност .....	41
8.7. Антитуморска активност .....	44
8.8. Мутагена активност .....	46
8.9. Антиоксидативна активност .....	49
8.10. Инхибиција ацетилхолинестеразе .....	52
<b>9. Закључци .....</b>	<b>55</b>
<b>10. Литература .....</b>	<b>56</b>
<b>11. Биографија .....</b>	<b>69</b>



## 1. Извод

Ова докторска дисертација издваја се по проблематици спроведених истраживања и представља оригиналан научни допринос проучавању хемијског састава и биолошке активности слатководних сунђера. Конкретно, ендемска и реликтна врста *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937) из Охридског језера (Охрид, Република Македонија) у њеном је фокусу.

Према доступним литературним подацима, ради се о пионирском истраживању како на подручју Р. Македоније, тако и шире, у региону Западног Балкана. *In vitro* је "скринован" већи број биоактивности екстракта сунђера *O. rotunda* (антимикробна са "antiquorum sensing" активношћу, антитуморска, цитотоксична, мутагена, антиоксидативна и анти-ацетилхолинестеразна активност) ради процене њиховог потенцијала као новог извора биолошки активних супстанци од значаја у медицини и фармацији.

Генерално, два екстракта (метанолни МЕ и ацетонски АЕ) врсте *O. rotunda* истакла су се по својој биолошкој активности.

Најосетљивија бактерија била је *Bacillus subtilis* (МЕ, МИС и МВС 7,5 µg/mL и 15,0 µg/mL), а најосетљивија гљива *Trichoderma viride* (МЕ, МИС и МФС 7,5 µg/mL и 15,0 µg/mL). Осим тога, МЕ показао се као добар инхибитор продукције пиоцијанина (49,90%), а АЕ формирања биофилма (53,99%) бактеријског соја *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Ниска вредност IC<sub>50</sub> (5,01 µg/mL) и потенцијална селективност, уз одсуство мутагеног потенцијала и токсичности, указују на значај АЕ у потрази за новим терапеутицима природног порекла у третману рака плућа. Заправо, према ћелијама А-549 vs. MRC-5, дати екстракт био је само 2 пута мање активан а око 35 пута селективнији од позитивне контроле доксорубицина, цитостатика у клиничкој употреби.

Оба екстракта инхибирала су ензим ацетилхолинестеразу у условима *in vitro* (како *in solid*, тако и *in liquid*), у мери да се могу сматрати могућим извором нових инхибитора овог ензима.

Анализом њиховог хемијског састава дошло се до закључка да би, на првом месту, стероли овог слатководног сунђера могли да буду органска једињења одговорна за разнолику биолошку активност.

Даља истраживања требало би усмерити ка формирању аквакултуре врсте *O. rotunda* у циљу обезбеђивања оптималне количине материјала за изоловање и идентификацију биоактивних принципа и дефинисање њиховог правог произвођача, сам сунђер и/или његови микросимбионти, с акцентом на бактерије.

**Кључне речи:** *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937); екстракти; хемијски састав; биолошка активност; микросимбионти.

**Научна област:** Биологија

**Ужа научна област:** Биологија микроорганизама

**UDK број:** [593.4:[57.6:575.856]]:611/612(043.3)

## 2. Апстракт

Ова докторска дисертација се издвојува по проблематиката на спроведените истражувања и претставува оригинален научен придонес во проучувањето на хемискиот состав и биолошката активност на слатководните сунѓери. Конкретно, во нејзиниот фокус е ендемичниот и реликтен вид *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937) од Охридското Езеро (Охрид, Република Македонија).

Според достапните литературни податоци се работи за пионерско (првично) истражување, како на подрачјето на Р. Македонија, така и пошироко, на регионално ниво (Западен Балкан). *In vitro* е "скринован" ("прикажан") поголем број на биоактивности на екстрактите од сунѓерот *O. rotunda* (антимикробна со "antiquorum sensing" активност, анти-туморска, цитотоксична, мутагена, антиоксидативна и анти-ацетилхолинестеразна активност) за да се процени потенцијалот на овој вид како нов извор на биолошки активни супстанции од важност во медицината и фармацијата.

Генерално, два екстракти (метанолен МЕ и ацетонски АЕ) на видот *O. rotunda* се издвојуваат со својата биолошка активност.

Најчувствителна бактерија беше *Bacillus subtilis* (МЕ, MIC и MBC 7,5 µg/mL и 15,0 µg/mL), а најчувствителна габа *Trichoderma viride* (МЕ, MIC и MFC 7,5 µg/mL и 15,0 µg/mL). Освен тоа, МЕ се покажа како добар инхибитор на продукцијата на пиоцијанин (49,90%), а АЕ при формирањето на биофилм (53,99%) кај бактерискиот сој *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Ниската вредност IC<sub>50</sub> (5,01 µg/mL) и потенцијалната селективност заедно со отсуството на мутагениот потенцијал и токсичноста укажуваат на значењето на АЕ во потрагата за нови лекови од природно потекло за третман на рак на белите дробови. Имено, дадениот екстракт према клетките A-549 беше само со два пати послаба активност, а околу 35 пати поселективен од позитивната контрола доксорубицин, цитостатик во клиничка употреба.

Двата екстракти го инхибираа ензимот во услови *in vitro* (како *in solid*, така и *in liquid*) во количини да може да се сметаат како можен извор на нови инхибитори на овој ензим.

Со анализата на нивниот хемиски состав се дојде до заклучок дека, на прво место, стеролите од овој сунѓер можат да бидат органски соединенија одговорни за широкиот спектар на биолошка активност.

Понатамошните истражувања треба да бидат насочени кон воспоставување на аквакултура на *O. rotunda* со цел да се обезбеди оптимална количина на материјал за изолација и идентификација на биоактивните принципи и дефинирање на нивните вистински производители: дали е тоа самиот сунѓер и/или неговите микросимбионти, со акцент на бактериите.

**Клучни зборови:** *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937); екстракти; хемиски состав; биолошка активност; микросимбионти.

**Научна област:** Биологија

**Потесна научна област:** Биологија на микроорганизмите

**UDK број:** [593.4:[57.6:575.856]]:611/612(043.3)

### 3. Abstract

This doctoral thesis distinguishes by the research conducted representing an original scientific contribution to the study of the chemical composition and biological activity of the freshwater sponges. More precisely, it focusses on the sponge *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937), an endemic and relict species from Lake Ohrid (Ohrid, Republic of Macedonia).

According to available literature data, this is a pioneering study both in R. Macedonia and the region of Western Balkans. A number of bioactivities of the sponge *O. rotunda* extracts (antimicrobial with antiquorum sensing activity, antitumour, cytotoxic, mutagenic, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity) were *in vitro* screened aiming to assess their potential as a new source of biologically active substances of importance for medicine and pharmacy.

In general, two *O. rotunda* extracts (methanol ME and acetone AE) stood out for their promising biological activities.

The most sensitive bacterium and fungus to ME were *Bacillus subtilis* (MIC and MBC 7.5 µg/mL and 15.0 µg/mL, respectively) and *Trichoderma viride* (MIC and MFC 7.5 µg/mL and 15.0 µg/mL, respectively). Moreover, ME and AE were found to be a good inhibitor of the pyocyanin production (49.90%) and biofilm formation (53.99%) by the bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, respectively.

A low IC<sub>50</sub> value (5,01 µg/mL) and its possible selectivity coupled with lack of mutagenic potential and toxicity in the Ames test have indicated the importance of AE in the search for new therapeutics against lung tumour. In comparison with doxorubicin (the known cytostatic used as a positive control), AE was 2-fold less active and almost 35-fold more selective towards A-549 cells vs. healthy (normal) MRC-5 lung cells.

Both extracts inhibited acetylcholinesterase in considerable extent at *in vitro* conditions (both *in solid* and *in liquid*) and may be considered as possible source of novel inhibitors of this enzyme.

The analyses of their chemical compositions have imposed the idea of sterol compounds as the likely sponge's bioactive principles.

Further research should be directed towards the establishment of *O. rotunda* aquaculture (due to ensuring optimal amounts of the biomaterial for isolation and identification of its bioactive principles) and defining true producer(s) of biologically active molecules: the sponge itself and/or its microsymbiont(s), with stress on bacteria.

**Keywords:** *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937); extracts; chemical composition; biological activity; microsymbionts.

**Research field:** Biology

**Specific research field:** Biology of Microorganisms

**UDK No.:** [593.4:[57.6:575.856]]:611/612(043.3)

#### 4. Аннотация

Настоящая докторская диссертация выделяется проблематикой проведенных исследований и представляет собой оригинальный научный вклад в исследование химического состава и биологической активности пресноводных губок. А именно, она посвящена эндемичному и реликтовому виду *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937), обитающему в Охридском озере (Охрид, Республика Македония).

Исходя из доступных литературных источников, речь идет о пионерском (первичном) исследовании как на территории Республики Македонии, так и на более широком ареале, на региональном уровне Западные Балканы. В пробирке (*in vitro*) «проведен скрининг» (представлено) большое количество видов биоактивность экстракты губок *O. rotunda* (антимикробная с активностью "antiquorum sensing", противоопухолевая, цитотоксическая, мутагенная, антиоксидантная и анти-ацетилхолинестеразная активность) для того, чтобы оценить потенциал этого вида в качестве нового источника биологически активных субстанций, имеющих значение для медицины и фармации.

Обычно два экстракты (метанольного, МЕ и ацетонски АЕ) вида *O. rotunda* выделяется своей биологической активностью. Самой чувствительной бактерией оказалась сенная палочка – *Bacillus subtilis* (МЕ, MIC и MBC 7,5 µg/mL и 15,0 µg/mL), а самым чувствительным грибком – *Trichoderma viride* (МЕ, MIC и MFC 7,5 µg/mL и 15,0 µg/mL). Кроме того, МЕ зарекомендовал себя как хороший ингибитор при выработке пиоцианина (49,90%), АЕ созданию биопленки (53,99%) у вида бактерии синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Низкое значение IC<sub>50</sub> (5,01 µg/mL), и потенциал избирательность вместе с отсутствием мутагенных потенциал и токсичности указывают на важность АЕ в поиске новых лекарственных препаратов природного происхождения для лечения рака легких. Экстракт в соответствии с данной клетки А-549 был только в два раза слабее активность, и примерно в 35 раз более селективным, чем положительный контроль доксорубицин химиотерапии при клиническом применении.

Экстракты ингибирует фермент в условиях, в лабораторных условиях (таких, как в твердом, так и в жидкости) в количествах, можно рассматривать как возможный источник новых ингибиторов этого фермента.

Анализ их химического состава наложили идею стеролов соединений в качестве ключевых принципов биоактивных губки.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на установление *O. rotunda* аквакультуры (за счет обеспечения оптимальных количеств биоматериала для выделения и идентификации его биоактивных принципов) и определение истинного производителя (ей) биологически активных молекул: губку себя и/или его микросимбионт(ы), со стрессом на бактерии.

**Ключевые слова:** *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937); экстракты; химический состав; биологическая активность; микросимбионты.

**Научный область:** Биология

**Узкое научный область:** Биология микроорганизмов

**Индекс УДК:** [593.4:[57.6:575.856]]:611/612(043.3)



# УВОД

## 5. Увод

### 5.1. Сунђери

Сунђери су искључиво акватичне животиње и хране се филтрирањем воде (Vacelet & Boury-Esnault 1995). Проток воде унутар ових организама једносмеран је: наиме, вода улази кроз ситне поре и излази кроз оскулум. Честице хране (бактерије, једноћелијске алге и остали планктон) узимају фагоцитозом; дигестија се одвија у посебним ћелијама, а хранљиве материје дистрибуирају се у мезофилу. Сунђери дишу читавим телом користећи кисеоник растворен у води; немају нервни, дигестивни и циркулаторни систем (Lévi 1970; Krunic 1977; Müller 2003; Moore 2006; Fish & Fish 2011).

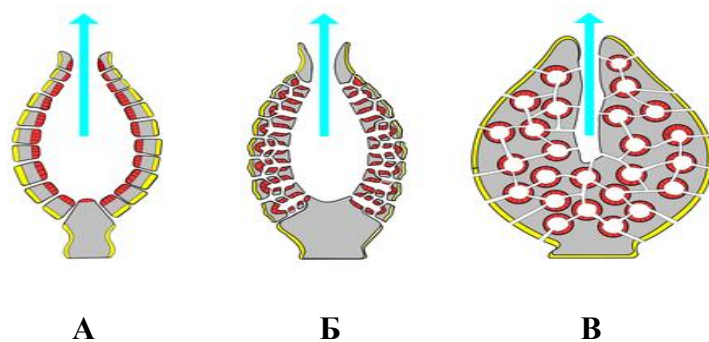
Генерално, одрасли сунђери потпуно су непокретни (седентарни): везани су било за стене и/или камење, било за водене биљке на дну. Обично живе независно или у колонијама неправилног облика. Ови организми могу бити асиметрични или радијално симетрични, различитих величина, боја и облика (на пример, у облику чаше, лопте, дрва, цеви и цилиндра), као и без облика (аморфни). Потребно је истаћи да је више истраживања указало на покрете одраслих јединка сунђера проистеклих из координираних покрета њихових ћелија. Скелет сунђера може бити изграђен од органске материје (специјална протеинска влакна названа спонгин) и минералне супстанце (кречњак или силицијум) са коморама или разгранатим елементима – спикулама (Radović & Petrov 2001).

Њихово размножавање одвија се на два начина: бесполно (асексуално) и полно (сексуално). Бесполно се размножавају путем спољних пупољака (појављују се у касно лето и остају на телу мајке током зиме; када дође пролеће, пупољак се откида од мајке, те наставља да живи као независна одрасла јединка причвршћена за камење). Неке врсте сунђера формирају унутрашње пупољке назване гемуле који могу да преживе изузетно неповољне услове, док остатак организма одумире. Полно размножавање одвија се сједињавањем мушких и женских полних ћелија у мезофилу. Оплођена јајна ћелија развија се у ларву која може директно да се настани и трансформише у одрасли сунђер; неко време, међутим, може бити планктонска (Verquist 1978; Jamieson 2015).

### 5.1.1. Класификација сунђера

Класификација сунђера заснива се на карактеристичним особинама скелета укључујући облик и величину саставних елемената – спикула и влакана. По грађи тела, деле се на аскон, сикон и леукон тип; ова подела, међутим, не дефинише таксономске групе (Sindičić & Konjević 2014).

Аскон тип у облику је једноставне цеви перфориране порама са јединим отвором ка спољашњој средини на оскулуму. Сикон тип већи је од аскона: има цевасто тело и један оскулум. Код овог типа сунђера зид тела је дебљи, а поре за пенетрацију су дуже и формирају систем једноставних канала. Леукон тип чини маса ткива пенетрирана бројним каналима – ово су највећи и најсложенији сунђери (Слика 1) (Krunić 1977; Berquist 1978).



Слика 1. Грађа тела сунђера: А. Аскон Б. Сикон В. Леукон

Филум Porifera састоји се од око 15000 живих врста, подељених у три различите класе:

#### 1. Класа Hexactinellida (стакласти сунђери)

Скелет им је од четири и/или шест истакнутих спикула од силицијум-диоксида које су најчешће спојене у виду мреже или кутије. Величине од 10 до 30 cm, док им боја најчешће варира од беле до наранџасте. Неке врсте ових сунђера формирају гребене.

## 2. Класа *Calcarea* (кречњачки сунђери)

Скелет им је од калцијум-карбоната (кречњака), у облику мреже или шестоугаоника. По правилу, мањи су од 10 cm, углавном једнолични по боји, уз пар изузетака. Сунђери ове класе обухватају сва три основна типа грађе сунђера, за разлику од друге две класе (*Hexactinellida* и *Demospongiae*), којима припадају само леукон типови.

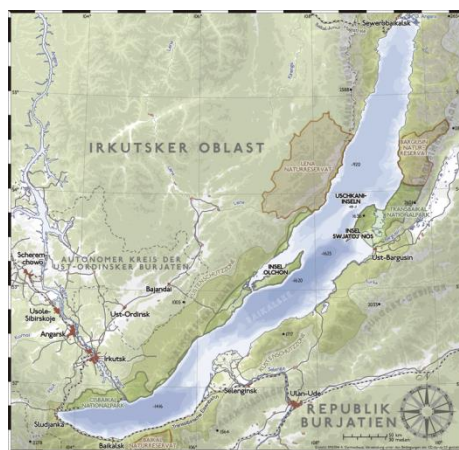
## 3. Класа *Demospongiae* (обични сунђери)

Највећа класа у овом филуму (обухвата 90% свих врста сунђера). Скелет им је изграђен од протеина спонгина, минерала силицијума или њихове комбинације. Када су присутне силицијумске спикеле, другачијег су облика од спикела стакластих сунђера. Известан број представника светлих је боја, са великом разноликошћу облика тела. Ради се о релативно великим примерцима – највећа врста достиже преко 1 m (3,3 m) у пречнику.

Проучавањем фосилних остатака ових организама установљено је да је реч о животињама које су се населиле у старој ери. Најстарији фосилни остаци скелета сунђера стари су око 580 милиона година. Наиме, верује се да су сунђери постојали 30 до 50 милиона година пре камбријске експлозије, периода у коме се развио огроман број вишећелијских организама (Sindičić & Konjević 2014). Филум *Porifera* сматра се структурно најједноставнијом и најстаријом групом *Metazoa*; има неразјашњену филогенетску историју и проблематичну таксономију (Delage & Hérouard 1899; Fromont & Bergquist 1990; Soest & Van 1990; Li et al. 1998).

### 5.1.2. Дистрибуција сунђера

Сунђери представљају разнолику групу бескичмењака дистрибуирану широм света. Могу се наћи у скоро свим воденим стаништима – морским и слатководним срединама, од плитке воде до екстремних дубина. Иако су, пре свега, карактеристични за морску средину, око 250 врста настањују слатководна станишта као што су језера, фјордови, реке, притоке, потоци и вештачке акумулације (Hooper & van Soest 2002). Слатководни сунђери добро су прилагођени ширем спектру еколошких услова. Тако, на пример, ови организми преовлађују у бенталним заједницама водених екосистема.



Слика 2. Бајкалско језеро

([https://sh.wikipedia.org/wiki/Bajkalsko\\_jezero](https://sh.wikipedia.org/wiki/Bajkalsko_jezero); преузета дана 01.05.2016. године)

Бајкалско језеро веома је познато управо по слатководним сунђерима (Слика 2). Већина врста припада ендемској фамилији Lubomirskiidae, док се мањи број убраја у космополитску фамилију Spongillidae. У периоду од 1993. до 2001. године у овом језеру укупно је прикупљено 1539 сунђера сврстаних у 2 фамилије, 7 родова и 14 врста, док су поједини примерци остали неklasификовани због таксономске конфузије (Masuda 2009).

Слатководни сунђери изгледају корасто због разгранатих сићушних бодљи (попут грана на дрвету) које њихову површину чине грубом. Величина им се обично креће од неколико милиметара до десетак центиметара, са бојама у распону од бежбраон до сивозелене; могу бити и бели. Премда на први поглед грубо изгледају, заправо су веома крхки и меки на додир.

### 5.1.2.1. Дистрибуција слатководних сунђера у Р. Македонији

У природним језерима Републике Македоније (Охридском, Преспанском и Дојранском) до сада је описано неколико врста слатководних сунђера који припадају родовима *Ephydatia*, *Eunapius*, *Ochridaspongia*, *Ochridaspongilla* и *Spongilla* (Табела 1) (Хаџишче 1953).

Табела 1. Дистрибуција слатководних сунђера у природним језерима Републике Македоније (Хаџишче 1953)

Сунђер	Охридско језеро	Преспанско језеро	Дојранско језеро
<i>Ephydatia fluviatilis</i>	–	–	+
<i>Eunapius fragilis</i>	+	+	–
<i>Ochridaspongia rotunda</i>	+	–	–
<i>Ochridaspongia interlithonis</i>	+	–	–
<i>Ochridospongilla stankovici</i>	+	–	–
<i>Spongilla carteri v. dojranensis</i>	–	–	+
<i>Spongilla lacustris</i>	?	+	+
<i>Spongilla prespensis</i>	–	+	–
<i>Spongilla stankovici</i>	+	–	–

" + " - постоји у језеру; " – " - не постоји у језеру; " ? " - претпоставка

#### 5.1.2.1.1. Охридско језеро

Охридско језеро убраја се међу најстарија језера на свету, заједно са Бајкалским језером, Каспијским језером, Тангањиком, Њасом и неким језерима на Целебесу. Упркос томе што су геолошки подаци о пореклу и старости језера прилично оскудни, већина геолога верује да је Охридско језеро тектонског порекла, настало пре краја терцијарне ере – плиоцена (Слика 3) (Станковић 1959; Albrecht & Wilke 2008).



Слика 3. Охридско језеро са назначеним локалитетом где су прикупљени узорци сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Први писани подаци о језеру потичу из прве половине прошлог века. Међутим, прва значајна истраживања језера датирају из друге половине 19-ог века. Охридско језеро, смештено у Охридској котлини, заузима крајњи југозападни део Р. Македоније, а мањим делом припада Р. Албанији (**Табела 2**).

Табела 2. Опште геоморфолошке и хидролошке карактеристике Охридског језера (Станковић 1959; Albrecht & Wilke 2008)

<b>Локација</b>	41°05' N, 20°45' E
<b>Надморска висина</b>	693,17 m
<b>Површина</b>	358,20 km <sup>2</sup>
<b>Запремина</b>	58,64 km <sup>3</sup>
<b>Максимална дужина</b>	30,50 km
<b>Максимална ширина</b>	14,80 km
<b>Максимална дубина</b>	288,70 m
<b>Просечна дубина</b>	161,30 m
<b>Дужина обале</b>	87,53 km
<b>Провидност воде</b>	20 m
<b>Ретенционо време</b>	83,61 године

Прихрањивање језера претежно је изворском водом. Постоје многобројна карстна, површинска и сублакустрична врела која снабдевају језеро водом. У језеро се улива 40 река од којих су 23 на албанској, а 17 на македонској обали. Код Струге из језера истиче река Црни Дрим која, заправо, представља његов једини површински истек.

Према термичком режиму, Охридско језеро спада у ред хладних олигомиктичких језера, са појавом тоталне олигомиксије сваких 6-7 година, за време веома хладних зима праћених јаким ветровима (Станковић 1959). Осим тога, у погледу растворених хемијских супстанци (кисеоник и угљен-диоксид; реакције воде – рН), вода језера стратифицирана је у вертикалном смеру. Са трофичке тачке гледишта, ово језеро спада у категорију олиготрофних језера сиромашних неорганским и органским материјама.

#### **5.1.2.1.2. Ендемизам и реликтност Охридског језера**

Резултати дуготрајних и континуираних флористичких и фаунистичких истраживања Охридског језера указују да га, захваљујући великој старости (плиоцен), дугом временском континуитету постојања, сталности услова живота и

географској изолованости, карактерише изобиље ендемског биодиверзитета флоре и фауне (Hadzisce 1956).

Од укупног броја ендемских врста (212) у Охридском језеру, 182 односе се на животиње (Albrecht & Wilke 2008). Већина ових врста припада филумима Amphipoda (90% ендемита) и Porifera (80% ендемита).

### 5.1.2.1.3. Слатководни сунђери у Охридском језеру

Порекло и еволуција слатководних сунђера генерално су мало истражени, а њихов биодиверзитет вероватно још увек није у целости процењен (Manconi & Pronzato 2002; Itskovich et al. 2006). У сваком случају, требало би истаћи да је фауна сунђера са Балкана (укључујући Охридско језеро) била предмет досадашњих истраживања (Arndt 1923, 1937, 1938; Hadzisce 1953; Gilbert & Hadzisce 1984). У Охридском језеру живи 5 врста слатководних сунђера од којих су 4 ендемске (80%), конкретно *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937) (Табела 3), *Ochridaspongia interlithonis* (Gilbert & Hadzisce, 1984), *Ochridospongilla stankovici* (Gilbert & Hadzisce, 1984) и *Spongilla stankovici* (Arndt, 1938) (Albrecht & Wilke 2008). С друге стране, врста *Eunapius fragilis* (Leidy, 1851) распрострањена је и у другим језерима на Балкану.

Табела 3. Систематска припадност сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Царство	Animalia
Подцарство	Parazoa
Тип	Porifera
Подтип	Cellularia
Класа	Demospongiae
Подкласа	Ceractinomorpha
Ред	Haplosclerida
Подред	Spongillina
Фамилија	Malawispongiidae
Род	<i>Ochridaspongia</i>
Врста	<i>Ochridaspongia rotunda</i>

Кроз биолошки материјал који су му 1937. године доставили Волски (Wolski) и Кенк (Kenk), немачки зоолог Волтер Арнт (Walther Arndt) први пут се сусрео са до тада непознатим сунђером *O. rotunda* који је описао као нов (у контексту рода и врсте), уз став да се ради о реликту терцијарне фауне Европе и



Азије. Даља истраживања структуре и биологије овог сунђера потврдила су назначене закључке (Arndt 1938; Hadzisce 1953; Gilbert & Hadzisce 1975, 1977).

*O. rotunda* (у Р. Македонији шире позната као округли охридски сунђер) представља ендемску и реликтну врсту лоптастог (мало спљоштеног) облика веће ширине (дијаметра) у односу на висину. До сада сакупљени примерци обично су били дијаметра око 13 cm, а висине око 7,5 cm (Hadzisce 1953).



Слика 4. Сунђер *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937)

Овај сунђер на горњој површини најчешће има једно централно веће удубљење (у области највеће ширине) са бројним оскулумима, док на ободу има неколико мањих преоскуларних поља. Код неких јединки ова поља могу потпуно одсуствовати, док друге имају и по десетак преоскуларних поља распоређаних по целој површини сунђера. Понекад се централна удубљења могу продужити по целој висини, тј. до основе сунђера. Сходно томе, може се рећи да врста *O. rotunda* има облик дебелог ђеврека (Слика 4) (Pejin et al. 2014d).

У случајевима када су удубљења (која почињу на горњој површини сунђера) продужена по целој његовој висини, преоскуларна поља нису распоређена по целој његовој спољашњости, већ се налазе у унутрашњој удубљеној површини где се сусреће или неколико већих или већи број мањих (до 40) преоскуларних поља дубљих од околне површине сомотастиг изгледа.

*O. rotunda* је сунђер светложуте до смеђе боје, распрострањен до горње границе сублиторала Охридског језера (у појасу харе, на дубини од 30 m до 80 m, па чак и до 100 m), са највећом густином у љуштурној зони; не јавља се у литоралном региону.



Слика 5. Станиште сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Може бити причвршћен на каменчићима или комадима дрвета, али се најчешће налази на шкољци *Dreissena polymorpha* (Слика 5). Стога је при риболову педесетих и шездесетих година прошлог века често долазило до извлачења велике количине датог сунђера (Надџишче 1953). Данас, међутим, не долази до његовог "случајног" сакупљања, што потенцијално указује на смањену густину и распрострањење (Слика 6).



Слика 6. "Случајно" сакупљени примерци сунђера *Ochridaspongia rotunda* током риболова

### 5.1.3. Традиционална медицина

Као лекове, сунђере су користили Александријски лекари, а њихову медицинску употребу описао је и римски историчар Плиније. Сматрало се да могу да помогну код стимулације коагулације крви, анестезирања (успављивања) пацијената, у лечењу болести срца и уједа отровних животиња. Такође, ови организми помињу се и у контексту сунчаница, лечења свих врста рана, прелома костију, болова у стомаку, инфективних болести и тумора тестиса, па чак и као импланти након операције дојке (Arndt 1938; Iwu & Wootton 2002).

Још од 18-ог века руски, украјински и пољски лекари користили су свеже примерке слатководног сунђера Бадиага (*Spongilla fluviatilis*) за лечење различитих болести. Овај сунђер имао је примену у третману повреда главе, коже, болести плућа и реуматизма, а у неким деловима света и у лечењу болести срца (Schröder 1942). Официјалски (Oficjalski) (1937) је открио да лек Бадиага не представља само један сунђер, већ мешавину неколико врста слатководних сунђера специфичних за конкретни регион. У Пољској, исти се састојао од праха врста *Euspongilla lacustris*, *Ephydatia fluviatilis* и *Meyenia muelleri*, док је руска варијанта овог лека представљала мешавину сунђера *E. lacustris*, *E. fluviatilis*, *Spongilla fragilis* и *Carterius stepanowi*.

У западном свету, сируп Стодал (на бази врсте *Spongia officinalis*) користи се као хомеопатски препарат у третману сувог кашља и астме.

У оквиру народне (етно) медицине на европском тлу коришћен је органски скелет разних сунђера као, на пример, врста *Spongia cerata* или *Spongia gelatina* (за лечење рана), *Spongia compressa* (за блокирање обилних крварења), као и врста *Spongia jodoformiata* или *Spongia salicylata* (за дезинфекцију рана). До краја 19-ог века, сунђери су се уобичајно користили и у хирургији (Müller et al. 2004).

У Р. Македонији рибари на Дојранском језеру преко лета сакупљају веће примерке сунђера *E. fluviatilis* ("жута трава") (Слика 7) које суше и употребљавају (издробљене у праху и помешане с уљем) као лек против прехладе и реуматизма (Хацишче 1953).



Слика 7. *Ephydatia fluviatilis*

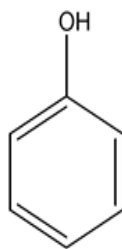
Такође, и морски сунђери користе се у традиционалној медицини. Тако на пример, у кинеској традиционалној медицини помиње се лек у чији састав улази 10-20% екстраката морских сунђера *Dysidea villosa* и *Xestospongia muta*. Овај природни лек стимулише и одржава имунитет, а погодан је и за превенцију рака (Patent 2013).

Фармацеутско интересовање за сунђере потиче из раних 1950-их година, са открићем нуклеозида спонготимидина и спонгоуридина у морском сунђеру *Cryptotethia crypta* који су били основа за синтезу Ага-С (првог антитуморског лека инспирисаног живим светом мора) и антивирусног лека Ага-А (Sipkema et al. 2005; Sinko et al. 2012).

#### 5.1.4. Феноли

Феноли представљају бројну групу секундарних метаболита (Слика 8). Посебна пажња посвећује се биоактивним фенолима из морских сунђера са антимикуробном активношћом. Дибромофеноли изоловани из врсте *Dysidea granulosa* показали су високу антибактеријску активност широког спектра у условима *in vitro*, нарочито према метицилин-резистентним и сензитивним сојевима *Staphylococcus aureus*, као и на ванкомицин резистентне и сензитивне представнике родова *Enterococcus* и *Bacillus* sp. (Shridhar et al. 2009). Поред тога, у једној врсти рода *Dysidea*, као и сунђеру *Lamellodysidea herbacea* (Hanif et al. 2007; Zhang et al. 2008) идентификовани су нови полибромовани дифенил естри са инхибиторном активношћу на бактеријски сој *Streptomyces* 85E.

С друге стране, феноли слатководних представника сунђера још увек представљају недовољно испитану класу органских једињења.



Слика 8. Једноставни (прости) фенол

### 5.1.5. Испарљива органска једињења

Испарљива једињења представљају органске супстанце које због ниске тачке кључања испаравају на собној температури. Многобројна су, разноврсна (по хемијској структури) и практично опште присутна. Дуже времена искључиво су испитиване испарљиве компоненте копнених биљака, као и феромони инсеката; упркос томе, данас у литератури има података како о испарљивим једињењима морских алги, тако и о испарљивим компонентама сунђера маринског порекла (De Rosa et al. 2002a, 2002b, 2003; Nechev et al. 2002).

Етарска уља обично представљају мање или више комплексне смеше лако испарљивих органских једињења које се уобичајно користе у традиционалној медицини, посебно у ароматерапији. По правилу, ради се о биоактивним смешама са антивирусном, антибактеријском, антифунгалном, антиоксидативном и/или антимутагеном активношћу (Idaomar et al. 2002; Tere et al. 2004).

Тако, на пример, сунђери рода *Ircinia* (конкретно, врсте *Ircinia campana*, *Ircinia felix* и *Ircinia strobilina*) садрже високе концентрације линеарних фураносестертерпенских тетронских киселина. Осим тога, продукују и испарљива једињења мале молекулске масе попут диметил-сулфида, метил-изоцијанида и метил-изотиоцијаната која им дају карактеристичан (непријатан) мирис белог лука. Недавно је указано да им се хемијска одбрана од предатора не базира на напоменутих киселинама, већ управо на тим малим испарљивим органским молекулима (Pawlik et al. 2002).

Тек у последње време пажња се обраћа и на испарљива једињења слатководних бескичмењака, укључујући сунђере и бриозе (Pejin et al. 2014a). Nakarada (2013) указао је на обилност алкохола, алдехида и кетона међу испарљивим компонентама слатководне бриозе *Hyalinella punctata*. Требало би истаћи и податак да су смеше датих једињења показале високу анти-хидроксил радикалску активност у условима *in vitro*.

### **5.1.6. Биоактивна природна органска једињења сунђера**

Сунђери су богат извор структурно јединствених и биолошки посебно активних органских једињења (природних производа). Дате супстанце фармаколошки су значајне због потенцијалне примене у виду лекова у терапији већег броја обољења, укључујући рак. Између осталог, код моринских представника, истиче се присуство необичних стерола, масних киселина, деривата аминокиселина (који су често халогени), цикличних пептида, алкалоида и крајње разноликих терпеноида, као што су сесквитерпеноидни хидрохинони и хинони (Dembitsky et al. 2003; Pejin et al. 2013a, 2013d).

#### **5.1.6.1. Антимикробна једињења**

Већ изван период сведоци смо проблема повећане мултирезистентности на антибиотике и фунгициде. С друге стране, значајан број научних радова указује на изузетан антимикробни потенцијал екстракта сунђера у условима *in vitro*, с акцентом на селективност према бактеријама (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије), гљива и/или вирусима. Примера ради, ареноскларени А-С, природна органска једињења изолована из сунђера *Arenosclera brasiliensis*, инхибиторно су деловала на 12 бактеријских сојева (клиничких изолата) резистентних на стандардне антибиотике (Blunt et al. 2007).

Спрам слатководног екосистема, актуелни литературни подаци истичу органске екстракте бриоза као потенцијалне изворе нових антимикробних супстанци са већим терапеутским ефектом (Pejin et al. 2012b, 2015a).

### 5.1.6.2. Антитуморска једињења

Из сунђера изолован је и већи број инхибитора протеин киназа природног порекла. Осим код тумора, повишени нивои датих ензима запажени су код псоријазе и артритиса. Вредна помена су и друга антитуморска једињења са другачијим механизмом деловања, као што су специфични и неспецифични инхибитори раста туморских ћелија.

У постојећој литератури има јако мало података који се односе на антитуморску активност слатководних сунђера (Pejin 2011).

### 5.1.6.3. Антиоксидативна једињења

Антиоксиданси представљају природна или синтетичка једињења која могу одложити или спречити поједина оштећења проузрокована оксидативним стресом.

Примера ради, током испитивања сунђера *Aaptos* sp. изоловани су аптамини, супстанце са антиоксидативним потенцијалом које би могле да се користе у лечењу кардиоваскуларних и бубрежних болести, болести централног нервног система, разних инфекција, дијабетеса типа 2, дегенеративних болести, септичког шока и/или рака, ако се исто потврди у предклиничким и клиничким студијама (Shubina et al. 2010).

### 5.1.6.4 Инхибитори ацетилхолинестеразе

Ацетилхолинестераза (AChE) представља ензим одговоран за хидролизу ацетилхолина у холинергичним синапсама у централном и периферном нервном систему. Абнормална активност датог ензима један је од фактора одговорних за Алцхајмерову болест, најчешћи узрок сенилне деменције у трећем (животном) добу. У ствари, инхибитори AChE (по хемијском саставу, махом алкалоиди) још увек се сматрају најбољим палијативним лековима у третману ове болести. Скорија истраживања, међутим, указала су да поједини тио деривати аварола (конкретно, деривати са карбоксилном групом у молекулу), главног секундарног метаболита медитеранског сунђера *Dysidea avara*, умерено инхибирају (1  $\mu$ g) AChE *in solid* тј. у тесту на танком слоју (Pejin et al. 2008). Ако се у обзир узме хемијска природа аварола (која је различита од алкалоидне; ради се о

сесквитерпеноидном хидрохинону са преуређеним дриманским скелетом), добијени експериментални подаци у многоме добијају на тежини и значају.

За инхибиторе овог ензима пореклом из слатководних сунђера у литератури практично нема релевантних података.



## **ЦИЉ РАДА**

## 6. Циљ рада

Примарни циљ ове докторске дисертације биће *in vitro* "скрининг" одабраних биолошких активности екстракта слатководног сунђера *O. rotunda* /антимикробне са "anti-quorum sensing" активношћу, антитуморске, мутагене, антиоксидативне и анти-ацетилхолинестеразне/ ради процене њиховог медицинског потенцијала као могућих нових извора биоактивних органских једињења природног порекла.

Одредиће се и елементарни хемијски састав дате врсте, испарљива органска једињења, као и садржај укупних једноставних (простих) фенола.

Инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом прелиминарно ће се хемијски окарактерисати екстракти са најпотентнијом биолошком активношћу.

## **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

## 7. Материјал и методе

### 7.1. Биолошки материјал

Узорак сунђера *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937) сакупљен је на Охридском језеру, локалитет Вели Даб у јуну 2013. и септембру 2014. године (Слика 9). Одговарајући ваучер примерак (LO ORO 006) чува се у Хидробиолошком заводу (Охрид, Република Македонија), на Одељењу за ципринидну фауну.



Слика 9. Охридско језеро, локалитет Вели Даб

### 7.2. Екстракција

Дати биолошки материјал осушен је на ваздуху, уситњен и екстрахован (по три пута) са водом и органским растварачима (метанол, етил-ацетат, ацетон и метилен-хлорид) респективно, у току 1 h на собној температури. По упаравању до сува, екстракти су чувани на температури од  $-20^{\circ}\text{C}$ , ради даље употребе.

### 7.3. Одређивање хемијског састава

#### 7.3.1. FTIR спектроскопија

Хемијски састав метанолног и ацетонског екстракта врсте *O. rotunda* прелиминарно је одређен помоћу инфрацрвене спектроскопије са Фуријевом трансформацијом (FTIR). Наиме, одговарајући спектар снимљен је техником АТР (од енгл. Attenuated Total Reflection) на инструменту Nicolet 6700 FTIR спектрометар (Thermo Scientific).

#### 7.3.2. Једноставни (прости) феноли

За одређивање садржаја једноставних (прости) фенола употребљена је стандардна метода SRPS ISO 6439:1997/B за хидроксилне деривате бензена и аналогна једињења (три независна мерења). Осушен и уситњен узорак слатководног сунђера *O. rotunda* (20 g) најпре је 24 h стајао у закисељеном раствору. Потом је уследила водена дестилација (због елиминације евентуалних сметњи), а затим UV-VIS спектрофотометријска анализа.

Концентрација једноставних (прости) фенола у испитиваном узорку (која је одговарала измереној вредности апсорбанце њиховог раствора) одређена је помоћу калибрационе криве.

Садржај фенола (mg/kg) израчунат је на основу следеће формуле:

$$\text{mg фенола/kg} = A \times R/k$$

где је

**A** – измерена апсорбанца узорка

**k** – коефицијент правца калибрационе криве

**R** – фактор разблажења

Добијен резултат приказан је као средња вредност са стандардном грешком.

### 7.3.3. Испарљива органска једињења

Испарљива органска једињења у осушеном биолошком материјалу одређена су помоћу "headspace" GC-MS анализе на инструменту Agilent 7890A са аутосамплером Agilent GC Sampler 80 и колоном HP-INNOWax (30 m×0,32 mm×0,25 µm). Носећи гас био је хелијум (4,57 mL/min), а температура је била линеарно програмирана од 40°C до 200°C (3°C/min). EIMS спектри снимани су у распону од 40 Da до 550 Da.

Компоненте су идентификоване поређењем њихових ретенционих индекса и масених спектра са онима из литературе (базе података NIST 5 и Wiley 7), као и методом RTL, уз употребу базе података RTL Adams. Ретенциони индекси одређени су стандардном методом користећи ретенциона времена *n*-алкана ињектованих након испитивања узорка под истим условима (Van Den Dool & Kratz 1963).

### 7.3.4. Елементарни састав

Минерали (Na, K, Mg и Ca) у осушеном узорку *O. rotunda* одређени су на атомском апсорпционом спектрофотометру, а анјони (нитрати и нитрити) јоноизмењивачком хроматографијом. За процену садржаја тешких метала (Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn, Se, Cd, Hg и Pb), металоида (As, Si и Al) и једног неметала (S) употребљене су одговарајуће Епине (EPA) методе (**Табеле 4 и 5**). Све анализе урађене су у трипликату, а резултати су представљени као средња вредност са мерном несигурношћу.

Табела 4. Атомска апсорпциона спектроскопија

Параметар	Стандардна метода	Техника
Натријум	EPA M 273.1:1974	пламена
Калијум	EPA M 258.1:1974	пламена
Хром	EPA M 218.1 и 2:1978	пламена
Бакар	EPA M 220.1 и 2:1978	пламена
Гвожђе	EPA M 236.1 и 2:1978	пламена
Манган	EPA M 243.1 и 2:1978	пламена
Никал	EPA M 249.1 и 2:1978	пламена
Цинк	EPA M 289.1 и 2:1978	пламена
Селен	EPA M 270.2:1978	графитна
Кадмијум	EPA M 213.1:1978	пламена
Жива	EPA M 245.1:1974	хладих пара
Олово	EPA M 239.1:1978	пламена
Алуминијум	EPA M 202.2:1978	графитна
Арсен	EPA M 206.2:1978	Кивета

Табела 5. Остале методе

Параметар	Стандардна метода	Техника
Магнезијум	ISO 14911:1998	катјонска хроматографија
Калцијум	ISO 14911:1998	катјонска хроматографија
Силицијум	EPA M370.1:1978 SRPS ISO 2598-1:1997	спектрофотометрија гравиметрија
Сумпор	ISO 4689:1986	Гравиметрија
Нитрата	EPA M 300.0	јоноизмењивачка хроматографија
Нитрита	EPA M 300.0	јоноизмењивачка хроматографија

## 7.4. Одређивање биолошке активности сунђера

### 7.4.1. Антимикробна активност

У "скринингу" антимикробне активности екстраката коришћена је модификована микродилуциона метода (Espinel-Ingroff 2001; CLSI 2009). Преконоћне културе бактерија гајене су на подлози TSB (37°C), а гљиве у медијуму SDB (37°C). Ћелијске суспензије ( $1,0 \times 10^6$  ћелија/mL и  $1,0 \times 10^5$  ћелија/mL за бактерије и гљиве, респективно) стандардизоване су применом дензитометра DEN1В (Biosan, Литванија); до употребе, инокулуми су чувани на хладном (4°C). Ради процене минималних инхибиторних и бактерицидних/фунгицидних концентрација (MIC и MBC/MFC, респективно), "скриновани" екстракти серијски су разблажени у медијуму TSB/SDB у микротитар плочама (96 отвора) са равним дном (Спектар, Чачак). Због лакше визуализације резултата, у бунарчиће је додато по 40  $\mu$ L *p*-јодонитротетразолијум боје (INT, I 8377-Sigma, САД) (Tsukatani et al. 2012). Вредност MIC представља најмању концентрацију на којој није било видљивог раста бактерија и гљива. Вредности MBC/MFC одређиване су реинокулисањем по 10  $\mu$ L у 100  $\mu$ L стерилног медијума у микротитар плочама које су инкубиране додатна 24 h на 37°C. Концентрација која убија 99,5% бактерија/гљива узета је као вредност MBC/MFC. Комерцијални антибиотици (стрептомицин и ампицилин) и фунгициди (кетоконазол и бифоназол) употребљени су као позитивне контроле.

Антибактеријски "скрининг" обухватио је по четири Грам-негативне (*Enterobacter cloacae* хумани изолат, *Escherichia coli* ATCC 35210, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) и Грам-позитивне бактерије (*Bacillus cereus* клинички изолат, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *Micrococcus flavus* ATCC 10240 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538). Урађен је и "скрининг" на осам гљива (*Aspergillus fumigatus* ATCC 1022, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Aspergillus ochraceus* ATCC 12066, *Aspergillus versicolor* ATCC 11730, *Candida albicans* хумани изолат, *Penicillium funiculosum* ATCC 36839, *Penicillium ochrochloron* ATCC 9112 и *Trichoderma viride* IAM 5061).



#### 7.4.2. "Anti-quorum sensing" активност

За тест микроорганизам одабран је изолат бактеријског соја *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 депонован у микотеци Одељења за биљну физиологију Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду. Дати "скрининг" обухватио је процену инхибиције синтезе зеленог пигмента пиоцијанина (продукт соја *P. aeruginosa* PAO1), антибиофилм активност, као и тестове покретљивости.

##### Пиоцијанин

"Скрининг" утицаја екстраката *O. rotunda* на синтезу пиоцијанина одређен је применом модификоване методе по Сандију (Sandy) и Фунг-Јиу (Foong-Yee) (2012). У епрувете са преконоћном културом *P. aeruginosa* PAO1 (5 mL), стандардизоване на  $OD_{600nm} = 0,2$ , додате су различите концентрације екстраката растворених у 5% DMSO ( $\leq MIC$ ), а потом су инкубиране 24 h на 37°C. Након инкубације, третиране културе екстраховане су хлороформом (3 mL), уз додатак чисте хлороводоничне киселине (1 mL). Апсорбанца екстрахованог органског слоја (односно, пигмента пиоцијанина) мерена је спектрофотометријски на таласној дужини од 520 nm (Shimadzu UV1601, Јапан). Резултати добијени помоћу формуле ( $OD_{520}/OD_{600} \times 100$ ) изражени су као проценат инхибиције синтезе пиоцијанина. Дати експеримент поновљен је три пута, а као позитивна контрола употребљен је стрептомицин.

##### Антибиофилм

Антибиофилм активност одређена је по модификованој методи Степановића и сарадника (2000). Преконоћна култура стандардизована је дензитометром на финалну концентрацију од  $1,0 \times 10^6$  ћелија/mL. Биофилм је формиран у микротитар плочама са адхезивним дном, додатком 100  $\mu L$  ћелијске суспензије наведеног микроорганизма и 100  $\mu L$  субинхибиторних концентрација екстраката, уз 24 h инкубацију на температури од 37°C. Након инкубације, садржај плоче одстрањен је пипетирањем, а сваки бунарчић три пута је испран пуфером. Адхериране ћелије фиксиране су сушењем на ваздуху. По сушењу, у сваки бунарчић пипетирано је

100  $\mu\text{L}$  кристал виолет боје из сета за бојење по Граму (Bio-Merieux, Француска). Бојење је трајало 15 min, након кога су плоче три пута испране и осушене на ваздуху. Да би се боја ресуспендовала, у сваки бунарчић додато је по 100  $\mu\text{L}$  96% етанола. Инхибиција је одређена на аутоматизованом ELISA читачу на таласној дужини од 570 nm.

Процент инхибиције рачунат је по следећој формули:

$$[(\text{OG}_{\text{контрола}} - \text{OG}_{\text{узорак}})/\text{OG}_{\text{контрола}}] \times 100$$

где је

**OG** – оптичка густина или апсорбанца

#### Тестови покретљивости

Тестови покретљивости урађени су по модификованој методи истих аутора (Sandy & Foong-Yee 2012). У петри плочама са 10 mL медијума додате су субинхибиторне концентрације одабраних екстраката. По инокулацији (1  $\mu\text{L}$ ) преконоћном културом *P. aeruginosa* PAO1 ( $1,0 \times 10^8$  ћелија/mL), петри плоче инкубиране су три дана на температури од 37°C. По инкубацији, описане су морфолошке карактеристике колонија (ивице колонија), а помоћу светлосног микроскопа (Leika, тип 020-518.500 DM LS, Немачка) измерена је и зона покретљивости.

#### **7.4.3. Антитуморска активност**

Антитуморска активност екстраката *O. rotunda* одређена је МТТ есејом на осам туморских (A-549, HeLa, Hs-294T, HT-29, K-562, MCF-7, MDA-MB-231 и PC-3) и једној физиолошки нормалној (здравом) ћелијској линији (MRC-5). Ћелије су гајене у различитим медијумима у зависности од линије којој припадају (**Табела 6**).

Медијуми за гајење култура садржали су пеницилин (100 IU/mL) и стрептомицин (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (ICN Galenika). Све ћелијске линије одржаване су у судовима за културу (Costar, 25  $\text{cm}^2$ ) на 37°C, у атмосфери са 100% влаге и 5%  $\text{CO}_2$  (Heraeus).

У овим експериментима коришћене су ћелије у логаритамској фази раста између трећег и десетог пресађивања.

Ћелије које расту у једном слоју (PC-3, HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, Hs-294T и MRC-5) неопходно је пресађивати по постизању конфлуенције од 80% до 90%. Једноћелијске суспензије добијене су додавањем 0,5% раствора трипсина, након чега је уследила инкубација од 5 min на 37°C. Ензимска реакција заустављена је додавањем одговарајућег медијума: за инактивацију трипсина одговорне су компоненте серума. Ћелијске суспензије затим су центрифугиране 10 min на 1500 rpm, а ћелијски талози ресуспендовани у свежем медијуму.

Ћелије које расту у суспензији (K-562 и HL-60), пресађују се по постизању конфлуенције од 80% до 90%. Ћелијске суспензије центрифугиране су 10 min на 1500 rpm, а ћелијски талози ресуспендовани у свежем медијуму.

Ћелије су сакупљане у логаритамској фази раста, исталожене центрифугирањем (10 min/200× g) и избројане у 0,1% трипан плавом. Вијабилне ћелије засејане су у квадрипликату у микротитар плоче са 96 отвора, тако да је у 90  $\mu\text{L}$  медијума било  $5 \times 10^3$  ћелија. Плоче са засејаним ћелијама остављене су у термостат, на температури од 37°C са 5% CO<sub>2</sub>, наредна 24 h. По истеку инкубације, у све отворе (сем контролних) додато је по 10  $\mu\text{L}$  "скринованих" екстраката (метанолни и ацетонски) одговарајуће концентрације, а инкубација је, под истим условима, настављена током 48 h. Раствор МТТ (припремљен непосредно пре употребе) додат је у све отворе на плочи у запремини од 10  $\mu\text{L}$  по отвору, уз наставак инкубације наредна 3 h (у термостату, на температури од 37°C, са 5% CO<sub>2</sub>). По истеку 3 h, у сваки отвор додато је по 100  $\mu\text{L}$  0,04 mol/L хлороводоничне киселине у изопропанолу. Апсорбанца је читавана одмах по истеку инкубације, на читачу за микротитар плоче (Multiscan, MCC/340, САД), на таласној дужини од 492 nm, као и на референтној (690 nm). Отвори на плочи који су садржавали само медијум и МТТ, али не и ћелије, представљали су слепу пробу ("blank").

Табела 6. Услови одржавања и пресађивања коришћених ћелијских линија

Ћелијска линија	Одржавање	Пресађивање
<p>ATCC CCL 185</p> <p><b>A-549</b></p> <p>Хумани карцином плућа</p>	<p>DMEM</p>	<p>1-2 пута недељно</p>
<p>ATCC CCL 243</p> <p><b>K-562</b></p> <p>Хумана хронична мијелогена леукемија</p>	<p>RPMI 1640 + 2 mM глутамин + 10% FTS</p>	<p>2 пута недељно</p>
<p>ATCC CRL 1438</p> <p><b>PC-3</b></p> <p>Хумани аденокарцином простате</p>		
<p>ATCC HTB 38</p> <p><b>HT-29</b></p> <p>Хумани карцином колона</p>		
<p>ATCC HTB 22</p> <p><b>MCF-7</b></p> <p>Хумани карцином дојке ER+</p>	<p>DMEM + 2 mM глутамин + 10% FTS</p>	<p>2 пута недељно; 2-5 × 10<sup>4</sup>/mL</p>
<p>ATCC HTB 26</p> <p><b>MDA-MB-231</b></p> <p>Хумани карцином дојке ER-</p>		<p>0,05% трипсин у 0,1% EDTA-PBS</p>
<p>ATCC CCL 2</p> <p><b>HeLa</b></p> <p>Хумани карцином грлића материце</p>		
<p>ATCC HTB 140</p> <p><b>Hs-294T</b></p> <p>Хумани меланом</p>		
<p>ATCC CCI 171</p> <p><b>MRC-5</b></p> <p>Хумани фибробласти плућа</p>		

Антитуморска активност (цитотоксичност) изражена је у процентима, према формули:

$$CI = (1 - As/Ak) \times 100$$

где је

**Ak** – апсорбанца контролних узорака

**As** – апсорбанца "скринованих" узорака (екстраката)

Као позитивна контрола употребљен је комерцијални цитостатик доксорубицин ЕВЕВЕ. Добијени резултати представљени су као средња вредност са стандардном девијацијом.

#### **7.4.4. Мутагена активност**

Мутагена активност екстраката одређена је Ејмсовим тест (од енгл. Ames test) и комет есејом.

##### Ејмсов тест

Ејмсов тест урађен је по методи Марона (Maron) и Ејмса (Ames) (1983). Коришћена су три хистидин ауксотрофна соја *Salmonella typhimurium*, конкретно ТА98, ТА100 и ТА102. По инкубацији преко ноћи на 37°C, припремљене културе (у касној експоненцијалној фази раста) биле су одгајене у течном медијуму LB.

У сваком експерименту коришћена је негативна контрола (дестилована вода), контрола растварача (DMSO), као и позитивне контроле сваког соја.

Оба екстракта "скринована" су у три независна експеримента, у одсуству и присуству метаболичког система за активацију S9 из јетре пацова.

Укратко, 0,25 mL "скринованог" екстракта, 0,1 mL бактеријске културе и 0,3 mL микса S9 додати су у 3 mL растопљеног агара обогаћеног са хистидином/ биотином (при 42°C) који је изливен на агар плоче Vogel Bonner E са минималним садржајем глукозе. Дате плоче најпре су инкубиране три дана на 37°C, а потом су ревертантне колоније пребројане. У одсуству фракције S9 позитивна контрола

била је 4-нитрохинолин-N-оксид (4-NQO) (1 µg/плоча), док је етидијум бромид (50 µg/плоча) представљао позитивну контролу у њеном присуству.

### Комет есеј

Ћелије MCF-7 гајене су у медијуму RPMI 1640 уз додатак 10% феталног говеђег серума и антибиотско-антимикотичког раствора у стандардним условима. Дате ћелије посејане су у 6 отвора са концентрацијама од  $5 \times 10^5$  ћелија по отвору. Нетретиране ћелије коришћене су као контрола, док је остатак ћелија третиран доксорубицином и метанолним екстрактом *O. rotunda* у року од 48 h. Након третмана базама, ћелијске културе биле су залеђене да би се успорила репарација молекула DNK. Ове ћелије даље су третиране по модификованом протоколу комет есеја у алкалним условима: 50 µL од  $25 \times 10^4$  ћелија/mL суспензије у PBS (фосфатно пуферисан раствор кухињске соли; око 1000 ћелија) помешано је са 0,2 mL 1,5% агарозе ниске тачке топљења и додато је преко слоја нормалне агарозе (Merk & Spreit 1998). Затим је нанесен и трећи слој нормалне агарозе. Лиза ћелија одвијала се током ноћи на 4°C у пуферу за лизирање, након чега су ћелије биле изложене базама (300 mM NaOH и 1 mM EDTA, pH 13) током 1 h. Након базног денатурисања, слојеви су смештени у комору за електрофорезу (20 min на 25 V и 40 mA). Затим су испирани дестилованом водом (2 пута по 5 min), сушени 100% етанолом, бојени етидијум бромидом (2 g/mL) и анализирани флуоресцентним микроскопом. Сlike су обрађене у компјутерском програму CometScore. Детектовано је 50 ћелија по слоју: различити параметри ћелија укључујући моменат репа комете аутоматски су процењени. Средња вредност момента репа комета одабрана је као параметар за упоређивање узорака. Добијени резултати представљени су као средња вредност са стандардном девијацијом.

#### 7.4.5. Антиоксидативна активност

Антиоксидативна активност метанолног (МЕ) и ацетонског (АЕ) екстракта процењена је новијим поларографским есејима НРМС и MRAP у условима *in vitro* (Sužnjević et al. 2011, 2013; Pejin et al. 2014a).

Поларографске i-E криве снимљене су на инструменту Omnigraphic Z000 X-Y опремљеним са поларографским анализатором Princeton Applied Research 174. Капљућа живина електрода са програмираним временом (1 s) употребљена је као радна електрода, засићена каломелова електрода (ЗКЕ) као референтна, а платинска електрода као помоћна електрода. Почетни потенцијали снимања i-E криви били су 0,1 V и 0,2 V респективно, наспрам ЗКЕ. Почетни раствор за есеј НРМС припремљен је додавањем 0,1 mL 1,00 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у 19,9 mL пуфера Clark&Lubs (CL) pH 9,8. Додавањем аликвота од 50 µL за оба екстракта постигнут је линеаран пад анјонске лимитирајуће струје. Почетни раствор за есеј MRAP припремљен је додавањем 1 mL 0,01 M HgCl<sub>2</sub> у 19 mL пуфера CL. Додавањем аликвота од 100 µL (МЕ) и 200 µL (АЕ) постигнут је линеаран пад катјонске струје.

#### 7.4.6. Инхибиција ацетилхолинестеразе

##### In solid

За тест инхибиције ацетилхолинестеразе (AChE) "скриновани" екстракти растворени су у метанолу (1 mg/mL): од овог почетног раствора првобитно су направљена серијска разблажења 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL и 0,001 mg/mL, са циљем добијања раствора нижих концентрација. По 10 µL раствора сваког од датих узорача нанесено је на плочу TLC (10 µg, 1 µg, 0,1 µg и 0,01 µg), ради проналажења минималних концентрација које инхибирају AChE. Као позитивна контрола коришћен је алкалоид галантамин. Есеј је изведен како је описано у раду Marston-а и сарадника (2002). Заправо, направљен је сток раствор AChE (1000 U ензима у 150 mL пуфера Tris-HCl pH 7,8) који је стабилизован додавањем говеђег серум албумина (150 mg). Узорци су нанесени на плочу TLC, растварач је уклоњен сушењем феном, а плоча је испрскана са раствором ензима. За време инкубације ензима плоча је држана 20 min у влажној атмосфери на 37°C.

Активност АСhЕ детектована је прскањем плоче TLC растворима 1-нафтил ацетата (250 mg 1-нафтил ацетата у 100 mL етанола) и Fast Blue В соли (400 mg Fast Blue В у 160 mL дестиловане воде) који су помешани непосредно пре употребе. Инхибиција АСhЕ уочава се у виду белих мрља на ружичастој подлози, око 1-2 min по прскању.

### *In liquid*

Анти-ацетилхолинестеразна активност одређена је у условима *in vitro* методом по Елману (Ellman et al. 1961).

Активност ензима обично се изражава као степен (количина) супстрата (изражена у молима) потрошена од стране познате количине ензимских јединица у одређеном временском интервалу. У овом конкретном случају, ради се о количини ацетилхолин јодида коју дати ензим потроши у 1 min. Активност АСhЕ одређена је спектрофотометријски у 0,10 М Na-фосфатном пуферу (pH 7,6; 37°C), помоћу читача микротитар плоча SpectraMAX 340 (Molecular Devices Corporation, Sunnydale, CA). И у тесту *in liquid* као позитивна контрола употребљен је алкалоид галантамин.

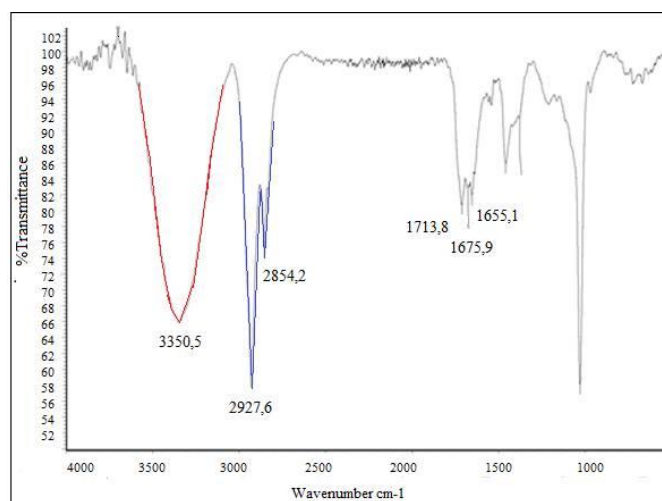


## **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА**

## 8. Резултати и дискусија

### 8.1. FTIR

У оба екстракта слатководног сунђера *O. rotunda* (метанолном и ацетонском) уочено је присуство сличних класа органских једињења. Конкретно, FTIR спектар метанолног екстракта указује на присуство карбонилних једињења (траке на  $1713,8\text{ cm}^{-1}$ ,  $1675,9\text{ cm}^{-1}$  и  $1655,1\text{ cm}^{-1}$ , карбонилна група), стерола и/или дуголанчаних алкохола (трака на  $3350,5\text{ cm}^{-1}$ , хидроксилна група; траке на  $2927,6\text{ cm}^{-1}$  и  $2854,2\text{ cm}^{-1}$ , метиленска група) (Слике 10) (Pejin et al. 2016b, Talevska et al. 2017). Ови подаци у добром су слагању са онима из литературе (Dembitsky et al. 2003).



Слика 10. FTIR спектар метанолног екстракта сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Преглед релевантне литературе, између осталих, истиче рад Мазура који је изоловао 5,6-дихидростигмастерол из сунђера *Spongilla lacustris* (Mazur 1941). Може се рећи да савремена истраживања стерола сунђера датирају од раних седамдесетих година прошлог века када је, у ствари, пронађено неколико нових представника ове класе природних органских једињења (Walton & Pennock 1972).

Мансон и сарадници (1988) указали су на серију стероидних молекула код слатководних сунђера *E. fluviatilis* и *S. lacustris*. Наиме, ове две врсте имају прилично сличан састав стерола и садрже скоро искључиво D5 стероле.

Холестерол је главна компонента у оба сунђера (74% и 66%, респективно). Врста *S. lacustris* садржи 22-дехидрохолестерол, кампестерол, 22,23-дихидробрасикастерол, 24-епибрасикастерол, брасикастерол, клионастерол и пориферастерол. Исти стероли изоловани су и из врсте *E. fluviatilis*: поред ситостерола, пронађен је и станол 24-метил-5 $\alpha$ -холестан-3 $\beta$ -ол (0,6%) (Dembitsky et al. 2003). У принципу, сунђери са већим процентом масти у облику стерола садрже мање количине терпена. Важи и обратан правилан: сунђери са нижом обилношћу стерола обично садрже значајније количине терпена. Ова једињења заправо имају исте прекурсоре, те представљају метаболичке алтернативе. Проучавање биосинтезе стерола морских и два слатководна представника сунђера (*E. fluviatilis* и *E. fragilis*) показало је да се циклоартенол и ланостерол, у већини случајева, претварају у 4,4,14-деметилстероле. Такође, утврђено је да се већина стероида синтетише *de novo*. Упркос томе што је познато да многи сунђери живе у симбиози са цијанобактеријама, сматра се да ови микроорганизми нису укључени у биосинтезу стерола (Kerr et al. 1989).

Неки типични стероли сунђера нађени су и код слатководних алги. Пориферастерол ((24R)-24-етилхолеста-5,22-диен-3 $\beta$ -ол) идентификован је у слатководној зеленој алги *Hydrodictyon reticulatum* (Akihisa et al. 1991), једноћелијским алгама *Nematochryopsis roscoffensis* и *Chrysotila lamellose* (Raederstorff & Romer 1984), ћелијском хомогенату алге *Trebouxia sp.* (Wilkomirski & Goad 1983), као и у култури алге *Ochromonas malhamensis* (Knapp et al. 1971). Стога се не може искључити могућност да су поједини стероли (типични за сунђере, а детектовани у води), у ствари, алгалног порекла (Dembitsky et al. 2003).

## 8.2. Једноставни (прости) феноли

Стандардном SRPS ISO методом утврђен је релативно низак садржај једноставних (простих) фенола ( $2,51 \pm 0,03$  mg/kg) у анализираном биоматеријалу.

Низак садржај ових органских једињења указује на податак да "скринована" врста слатководног сунђера, заједно са својим микросимбионтима (на првом месту, бактеријама), не продукује једноставне (просте) феноле и њихове аналоге у знатнијој мери. Сходно томе, може се претпоставити да овај тип секундарних метаболита вероватно не представља кључне биоактивне принципе одговорне за антиоксидативни потенцијал екстраката сунђера *O. rotunda* (Pejin et al. 2014c).

Када је о хемијској екологији реч, једна врста сунђера из рода *Dysidea* продукује 3,6-дибромо-2-(2',4'-дибромофенокси)-фенол и 3,6-дибромо-2-(4'-дибромофенокси)-фенол, природна органска једињења високе токсичности према динофлагелатама које живе у ендосимбиози са коралима (Se-Kwon 2012).

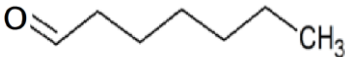
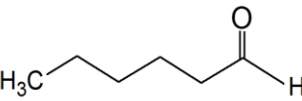
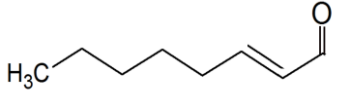
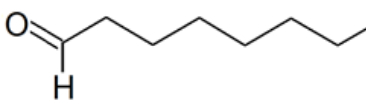
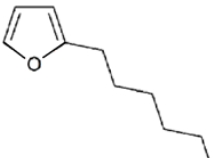
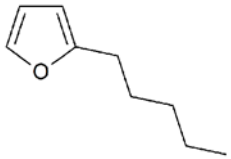
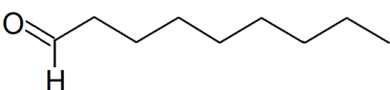
Осим тога, Whitfield и сарадници (1992) су код једног морског сунђера сакупљеног у Западној Аустралији идентификовали 2,6-дибромо- и 2,4,6-трибромофенол. У Источној Аустралији, пак, Whitfield и сарадници (1999) утврдили су присуство пет фенола у десет врста бриозоа, конкретно 2- и 4-бромофенола, као и 2,4-, 2,6-дибромо- и 2,4,6-трибромо- фенола. Ова једињења Chung и сарадници (2003) изоловали су из три врсте мрке алге које настањују воде Хонг Конга, конкретно, *Lobophora variegata*, *Padina arborescens* и *Sargassum siliquastrum*.

Претходно описан као слободни фенол, сифонодиктиал С изолован је из сунђера *Siphonodictyon coralliphagum* (Blunt et al. 2005).

### 8.3. Испарљива органска једињења

"Head space" GC-MS анализом по први пут утврђена су испарљива једињења сунђера *O. rotunda*. Заправо, укупно је идентификовано седам таквих компоненти (Табела 7).

Табела 7. Испарљиве компоненте сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Једињење	Хемијска формула	Заступљеност (%)
<i>n</i> -хептанал		54,10
<i>n</i> -хексанал		29,20
<i>n</i> -октенал		4,75
<i>n</i> -октанал		4,03
2-хексилфуран		3,62
2-пентилфуран		3,06
<i>n</i> -нонанал		1,26

Ради се о пионирској студији испарљивих компоненти слатководних представника филума Porifera са подручја Западног Балкана.

По хемијском саставу, већина датих компоненти (конкретно, пет идентификованих једињења) представљају алдехиде од којих 80% припада засићеним алифатичним алдехидима нормалног низа (ланца). У ствари, само *n*-октенал спада у незасићене алифатичне алдехиде. Преостале две испарљиве компоненте (2-пентилфуран и 2-хексилфуран) припадају класи фурана.

У лиофилизованом биоматеријалу (*O. rotunda*) детектована је скоро 18 и 3,5 пута већа концентрација *n*-хептанала и *n*-хексанала респективно, у поређењу са вредностима за смеше испарљивих компоненти слатководне врсте бриозе *Hyalinella punctata* (сакупљене у новембру 2011. године) добијеним класичном GC-MS анализом (Nakarada 2013; Pejin et al. 2014c). Осим тога, код поменуте врсте бриозе уочено је присуство алифатичних алкохола, кетона и ароматичних једињења. Када је о алдехидима реч, осим *n*-хексанала и *n*-хептанала, детектовано је и присуство *n*-нонанала (2,0%). Без даљњег, требало би истаћи и већу хемијску разноликост испарљивих компоненти врсте *H. punctata* и већи број датих компоненти (19 и 7, респективно) vs. врста *O. rotunda*.

Поређења ради, ароматичне биљке попут лаванде (*Lavandula officinalis* L.) садрже око 3% етарског уља са више од 100 присутних компоненти, међу којима се издвајају органска једињења терпеноидне природе (Leung & Foster 2003; Yusufoglu et al. 2004).

С друге стране, еволутивно једноставнији биљни организми, обично садрже мањи број испарљивих компоненти које обухватају алифатичне и ароматичне алдехиде (Li & Zhao 2009). Тако, на пример, главне испарљиве компоненте етарског уља бриофите *Leucodon sciuroides* (садржи 41 компоненту), чине алдехиди, конкретно, *n*-нонанал (26,80%) и *n*-хептанал (13,70%) (Cansu et al. 2013).

#### 8.4. Елементарни састав

Ови резултати указују да слатководни сунђер *O. rotunda* садржи значајну количину силицијума (64,09%), гвожђа (4606,80 mg/kg) и алуминијума (763,50 mg/kg) (Табела 8). Висок садржај гвожђа делимично би могао да буде последица присуства симбионтних микроорганизама способних да га акумулирају (Keller-Costa et al. 2014). У сваком случају, овај садржај требало би да се ближе опише (органиски или неорганиски везано гвожђе, оксидационо стање гвожђа, итд.).

Заправо, садржај оба хемијска елемента (гвожђе и алуминијума) у датој врсти значајно је већи од њихове концентрације у води Охридског језера (Maslinko et al. 2005). Поређења ради, код два амазонска представника слатководних сунђера, врста *Drulia cristata* и *Drulia uruguayensis*, главни елементарни конституенти били су силицијум (36,75%) и алуминијум (36,05%) (De Barros et al. 2013).

Осим тога, Maugel и сарадници (2014) утврдили су да је садржај гвожђа и алуминијума морског сунђера *Hyrtilos erecta* значајно већи од садржаја осталих хемијских елемената. И садржај магнезијума и калцијума био је већи у узорку сунђера *O. rotunda* (који живи на карбонатној подлози), наспрам њихове концентрације у води, конкретно, око 34 и 7 пута, респективно (Maslinko et al. 2005).

С друге стране, концентрације натријума и калијума у "скринованој" врсти сунђера блиске су онима у води Охридског језера (3,15 mg/kg и 1,44 mg/kg, респективно), на дубини од 50 m (Maslinko et al. 2005). Требало би истаћи и то да је узорак датог сунђера садржао два пута већи садржај натријума од калијума.

Што се садржаја силицијума тиче, добијени експериментални податак у складу је са грађом скелета "скринованог сунђера". У ствари, практично идентичан тренд уочен је код слатководних сунђера из Бајкалског језера (Chuparina et al. 2013).

Табела 8. Елементарни хемијски састав сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Параметар	Мерна јединица	Вредност	%
<b>Минерал</b>			
Mg	mg/kg	280,98	0,028098
Ca	mg/kg	203,53	0,020353
Na	mg/kg	2,68	0,000268
K	mg/kg	1,29	0,000129
Se	mg/kg	0,40	0,000040
<b>Анјон</b>			
Нитрати	mg/kg	43,00	0,004300
Нитрити	mg/kg	< 0,10	0,000010
<b>Тешки метал</b>			
Cd	mg/kg	1,03	0,000103
Cr	mg/kg	3,97	0,000397
Cu	mg/kg	4,96	0,000496
Fe	mg/kg	4606,80	0,460680
Hg	mg/kg	0,46	0,000046
Pb	mg/kg	2,60	0,000260
Ni	mg/kg	9,93	0,000993
Mn	mg/kg	105,24	0,010524
Zn	mg/kg	52,62	0,005262
<b>Метал</b>			
Al	mg/kg	763,50	0,076350
<b>Металоид</b>			
Si	%	64,09	64,09
As	mg/kg	2,03	0,000203
<b>Неметал</b>			
S	%	0,08	0,08



## 8. 5. Антимикробна активност

Највећу антибактеријску и антифунгалну активност у условима *in vitro* показали су метанолни (MIC 7,5-15,0 µg/mL и MBC 15,0-30,0 µg/mL) и ацетонски екстракт (MIC 7,5-45,0 µg/mL и MFC 15,0-60,0 µg/mL), респективно (Табеле 9 и 10). Осим тога, дати екстракти били су ефикаснији од одговарајућих позитивних контрола.

Док антибактеријска активност опада у низу метанолни екстракт > етил-ацетатни екстракт > ацетонски екстракт > водени екстракт > метилен-хлоридни екстракт, за антифунгалну активност уочен је следећи тренд: ацетонски екстракт > метанолни екстракт > етил-ацетатни екстракт > метилен-хлоридни екстракт > водени екстракт. Најосетљивија бактерија и гљива биле су *B. cereus* и *T. viride*, респективно (Слике 11 и 12).

Добијени експериментални подаци указују да се врста *O. rotunda* може сматрати значајним извором нових и потентних антимикробних супстанци природног порекла широког спектра дејства.

Табела 9. Антибактеријска активност екстраката сунђера *Ochridaspongia rotunda*

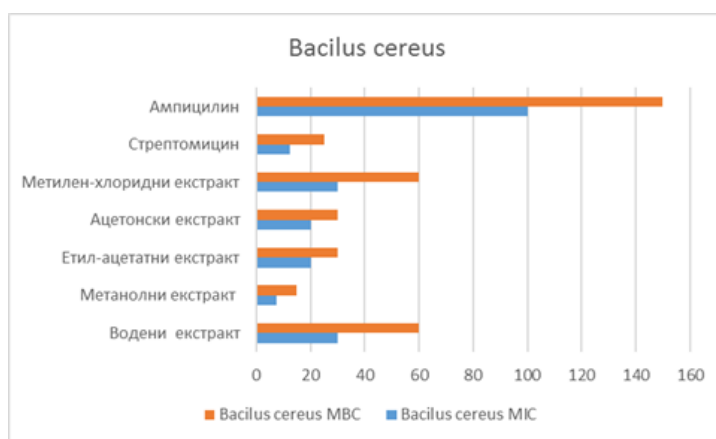
Бактерија	Водени екстракт <sup>*,‡</sup>	Метанолни екстракт <sup>*,‡</sup>	Етил-ацетатни екстракт <sup>*,‡</sup>	Ацетонски екстракт <sup>*,‡</sup>	Метилен-хлоридни екстракт <sup>*,‡</sup>	Стрептомицин <sup>*,#,‡</sup>	Ампицилин <sup>*,#,‡</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	30 ± 3 <sup>d</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	20 ± 3 <sup>bc</sup>	20 ± 0 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>cd</sup>	12,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>e</sup>
	60 ± 0 <sup>b</sup>	15,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>b</sup>	60 ± 3 <sup>b</sup>	25 ± 0 <sup>b</sup>	150 ± 7 <sup>c</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	45 ± 2 <sup>cd</sup>	15 ± 2 <sup>a</sup>	20 ± 0,7 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>b</sup>	45 ± 2 <sup>c</sup>	50 ± 2 <sup>d</sup>	150 ± 0 <sup>e</sup>
	60 ± 2 <sup>ab</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>a</sup>	60 ± 3 <sup>ab</sup>	60 ± 2 <sup>ab</sup>	100 ± 10 <sup>bc</sup>	200 ± 60 <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i>	30 ± 2 <sup>ab</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	20,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	30 ± 3 <sup>b</sup>	45 ± 2 <sup>c</sup>	50 ± 0 <sup>c</sup>	150 ± 10 <sup>d</sup>
	60 ± 3 <sup>b</sup>	30 ± 1 <sup>a</sup>	30 ± 3 <sup>a</sup>	60 ± 2 <sup>b</sup>	60 ± 0 <sup>b</sup>	100 ± 10 <sup>c</sup>	200 ± 10 <sup>d</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	30 ± 3 <sup>b</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>b</sup>	30 ± 3 <sup>b</sup>	150 ± 7 <sup>d</sup>	150 ± 0 <sup>d</sup>
	60 ± 3 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	60 ± 3 <sup>b</sup>	60 ± 0 <sup>b</sup>	60 ± 2 <sup>b</sup>	300 ± 20 <sup>c</sup>	300 ± 7 <sup>c</sup>
<i>Micrococcus flavus</i>	20 ± 2 <sup>bc</sup>	15 ± 2 <sup>a</sup>	20 ± 3 <sup>bc</sup>	20 ± 0 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>d</sup>	25 ± 1 <sup>c</sup>	100 ± 0 <sup>e</sup>
	30 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 1 <sup>a</sup>	30 ± 3 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	60 ± 0 <sup>b</sup>	50 ± 2 <sup>b</sup>	150 ± 10 <sup>c</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30 ± 2 <sup>b</sup>	15 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>b</sup>	30 ± 3 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>b</sup>	50 ± 3 <sup>c</sup>	300 ± 10 <sup>d</sup>
	60 ± 3 <sup>ab</sup>	30 ± 0 <sup>a</sup>	60 ± 2 <sup>b</sup>	60 ± 3 <sup>ab</sup>	60 ± 2 <sup>b</sup>	100 ± 20 <sup>c</sup>	500 ± 20 <sup>d</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	30 ± 2 <sup>b</sup>	10 ± 1 <sup>a</sup>	20,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	20 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 3 <sup>b</sup>	50 ± 3 <sup>c</sup>	100 ± 7 <sup>d</sup>
	60 ± 3 <sup>c</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>ab</sup>	30 ± 2 <sup>ab</sup>	60 ± 3 <sup>bc</sup>	100 ± 20 <sup>d</sup>	200 ± 20 <sup>e</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	45 ± 2 <sup>cd</sup>	15 ± 2 <sup>a</sup>	20 ± 2 <sup>a</sup>	20 ± 0 <sup>ab</sup>	30 ± 2 <sup>bc</sup>	50 ± 0 <sup>d</sup>	100 ± 10 <sup>e</sup>
	60 ± 3 <sup>b</sup>	30 ± 0 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 3 <sup>a</sup>	60 ± 2 <sup>b</sup>	100 ± 10 <sup>c</sup>	150 ± 10 <sup>d</sup>

\* MIC/MBC (µg/mL)

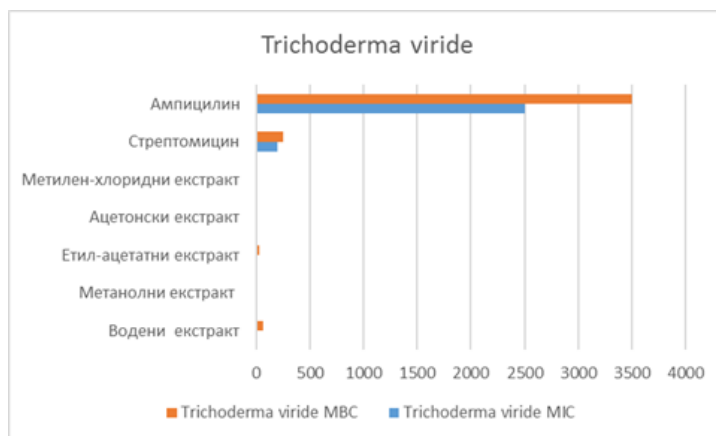
# позитивна контрола

‡ различита слова означавају статистички значајну разлику (p < 0,05)

Поређења ради, вредности MIC (антибактеријска активност) за ацетонски екстракт слатководне бриозе *H. punctata* (Hancock, 1850) биле су у опсегу 0,50-7,00  $\mu\text{g/mL}$ , а за MBC 2,50-10,00  $\mu\text{g/mL}$  (Pejin et al. 2012b; Pejin et al. 2014b), односно MIC 2,50-8,00  $\mu\text{g/mL}$  и MFC 5,00-10,00  $\mu\text{g/mL}$ . С друге стране, ацетонски и метанолни екстракт врсте *Pectinatella magnifica* (Leidy, 1851) показали су следеће вредности: MIC 0,004-0,120 mg/mL и MBC 0,03-0,25 mg/mL, односно MIC 0,03-0,12 mg/mL и MFC 0,06-0,25 mg/mL (Pejin et al. 2016a).



Слика 11. Осетљивост бактерије *Bacillus cereus* на "скриноване" екстракте сунђера *Ochridaspongia rotunda*



Слика 12. Осетљивост гљивице *Trichoderma viride* на "скриноване" екстракте сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Табела 10. Антифунгална активност екстраката сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Гљиве	Водени екстракт*,¥	Метанолни екстракт*,¥	Етил-ацетатни екстракт*,¥	Ацетонски екстракт*,¥	Метилен-хлоридни екстракт*,¥	Бифоназол*,#,¥	Кетоконазол*,#,¥
<i>Aspergillus fumigatus</i>	60 ± 2 <sup>c</sup>	15 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>b</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	60 ± 0 <sup>c</sup>	150 ± 7 <sup>d</sup>	200 ± 70 <sup>e</sup>
	120 ± 7 <sup>c</sup>	30 ± 0 <sup>a</sup>	60 ± 3 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	120 ± 10 <sup>c</sup>	200 ± 7 <sup>d</sup>	500 ± 2 <sup>e</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	30 ± 1 <sup>b</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	15 ± 0 <sup>a</sup>	30 ± 3 <sup>b</sup>	150 ± 3 <sup>c</sup>	200 ± 7 <sup>d</sup>
	60 ± 5 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	30,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>a</sup>	60 ± 3 <sup>b</sup>	200 ± 20 <sup>c</sup>	500 ± 0 <sup>d</sup>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	15 ± 2 <sup>a</sup>	15 ± 2 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	15 ± 0 <sup>a</sup>	150 ± 10 <sup>b</sup>	1500 ± 20 <sup>c</sup>
	60 ± 3 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>aq</sup>	30 ± 3 <sup>a</sup>	60 ± 3 <sup>a</sup>	200 ± 7 <sup>b</sup>	2000 ± 3 <sup>c</sup>
<i>Aspergillus versicolor</i>	30 ± 1 <sup>b</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>ab</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	30 ± 3 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>c</sup>	200 ± 20 <sup>d</sup>
	60 ± 0 <sup>b</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	60 ± 3 <sup>b</sup>	200 ± 20 <sup>c</sup>	500 ± 7 <sup>d</sup>
<i>Candida albicans</i>	120 ± 7 <sup>c</sup>	100 ± 7 <sup>b</sup>	60 ± 3 <sup>a</sup>	45 ± 2 <sup>a</sup>	120 ± 10 <sup>bc</sup>	100 ± 0 <sup>d</sup>	200 ± 0 <sup>e</sup>
	240 ± 3 <sup>c</sup>	120 ± 10 <sup>b</sup>	120 ± 7 <sup>b</sup>	60 ± 0 <sup>a</sup>	240 ± 7 <sup>c</sup>	200 ± 30 <sup>c</sup>	300 ± 20 <sup>d</sup>
<i>Penicillium funiculosum</i>	30 ± 3 <sup>b</sup>	15 ± 1 <sup>ab</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	20 ± 2 <sup>ab</sup>	30 ± 0 <sup>b</sup>	200 ± 10 <sup>c</sup>	200 ± 70 <sup>c</sup>
	60 ± 3 <sup>b</sup>	30,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	60 ± 2 <sup>b</sup>	250 ± 10 <sup>c</sup>	500 ± 20 <sup>d</sup>
<i>Penicillium ochrachloron</i>	30 ± 2 <sup>ab</sup>	15,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	15 ± 0 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>b</sup>	150 ± 7 <sup>b</sup>	1000 ± 10 <sup>c</sup>
	60 ± 0 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>a</sup>	30 ± 7 <sup>a</sup>	30 ± 2 <sup>a</sup>	60 ± 3 <sup>a</sup>	200 ± 10 <sup>b</sup>	1000 ± 10 <sup>c</sup>
<i>Trichoderma viride</i>	15 ± 2 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	7,5 ± 2,0 <sup>a</sup>	200 ± 20 <sup>b</sup>	2500 ± 70 <sup>c</sup>
	30 ± 1 <sup>a</sup>	15,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>a</sup>	15 ± 0 <sup>a</sup>	250 ± 20 <sup>b</sup>	3500 ± 70 <sup>c</sup>

\* MIC/MFC (µg/mL)

# позитивна контрола

¥ различита слова означавају статистички значајну разлику (p < 0,05)

Испитујући антимикуробну активност секрета три копнена инсекта из фамилије Carabidae, Nenadić et al. (2016) детектовали су многоструко нижу активност према сојевима *B. cereus* и *T. viride* (МВС и МФС  $207,95 \pm 0,32$  mg/mL и  $51,99 \pm 0,34$  mg/mL, респективно) у односу на истоветне вредности добијене за "скриноване" екстракте врсте *O. rotunda*.

С друге стране, метанолни екстракти дивље растуће гљиве *Morchella conica* Persc. (сакупљене на територији Р. Србије) највећу антибактеријску/антифунгалну активност показали су према сојевима *B. cereus* (МВС  $0,95 \pm 0,03$  mg/mL и  $1,87 \pm 0,02$  mg/mL) и *T. viride* (МФС  $1,56 \pm 0,05$  mg/mL и  $3,12 \pm 0,04$  mg/mL), респективно (Vieira et al. 2016).

Поред тога, инхибиторни ефекти биљних екстраката врсте *Ferulago macedonica* на одабране бактеријске патогене људи били су у опсегу 4,00-16,00 mg/mL, а цидни ефекти 8,00-28,00 mg/mL (Mileski et al. 2015).

Коначно, Nikolić (2015) истакли су да се антибактеријска и антифунгална активност етарских уља 47 одабраних биљних врста кретала у опсегу 1,00-10,00 mg/mL и  $> 10,00$  mg/mL, респективно.

Како се да приметити, истакнуте антимикуробне активности значајно су ниже ( $\mu\text{g/mL}$  vs. mg/mL) од уочене активности за слатководни сунђер који је предмет истраживања ове докторске дисертације.

## 8.6. "Anti-quorum sensing" активност

### Пиоцијанин

Метанолни екстракт сунђера *O. rotunda* показао је већу инхибицију синтезе пиоцијанина од његовог ацетонског екстракта (49,90% и 42,44%, респективно) (Табела 11). Иако су оба екстракта била активнија од ампицилина (18,15%), ниједан екстракт није показао већу активност од стрептомицина (52,09%). Поређења ради, етил-ацетатни екстракт бриозое *H. punctata* такође је значајно инхибирао синтезу овог пигмента (41,60%) (Rejin et al. 2014b).

Табела 11. *Pseudomonas aeruginosa* PA01: инхибиција пиоцијанина

Узорак	Пиоцијанин (% ± SE)
Метанолни екстракт	73,20 ± 1,14
Ацетонски екстракт	84,10 ± 1,23
Стрептомицин	70,00 ± 1,35
Ампицилин	119,58 ± 1,71
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (контрола)	146,10 ± 1,27

Антибиофилм активност

Антибиофилм активност датих екстраката је "скринована" на концентрацији 0,50 МИС. Добијени експериментални подаци указују да би првенствено ацетонски екстракт врсте *O. rotunda* (процент инхибиције: 53,99%) могао да послужи као извор нових природних производа са датом активношћу (Табела 12).

Табела 12. *Pseudomonas aeruginosa* PA01: антибиофилм активност

Узорак	Формирање биофилма (% ± SE)
Метанолни екстракт	51,71 ± 0,68
Ацетонски екстракт	46,01 ± 0,88
Стрептомицин	49,40 ± 0,46
Ампицилин	69,16 ± 0,31

Уочена активност упоредива је са истоветном активношћу метанолног екстракта (0,50 МИС) бриозое *P. magnifica* (54,82%) (Pejin et al. 2016a). Етил-ацетатни и хексански екстракт бриозое *H. punctata*, још ефикасније је инхибирао формирање биофилма *P. aeruginosa* PA01 (80,63-88,13%) (Pejin et al. 2016b).

### Тестови покретљивости

Оба "скринована" екстракта врсте *O. rotunda* показала су се активним и у тестовима покретљивости (Табела 13). Конкретно, дијаметар колонија *P. aeruginosa* PA01 био је смањен, а флагеле одсутне.

Табела 13. *Pseudomonas aeruginosa* PA01: тестови покретљивости

Узорак	Дијаметар колонија (nm ± SE)	Дијаметар флагеле (µm)	Боја колонија
Метанолни екстракт	5,68 ± 0,57	–	бела
Ацетонски екстракт	6,47 ± 0,84	–	зелена
Стрептомицин	5,03 ± 0,06	–	бела
Ампицилин	12,01 ± 1,00	80-320	бела
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 (контрола)	14,00 ± 1,00	80-720	зелена

"–" одсуство флагела

Поређења ради, етарска уља појединих ароматичних биљака такође су показала добру активност. Наиме, етарско уље врсте *Thymus algeriensis* било је најактивније (5,00 mm), а врсте *Citrus limon* најмање активно (16,67 mm) (Nikolić 2015).

Све у свему, ово је прва студија "anti-quorum sensing" активности представника слатководних сунђера како у Р. Македонији, тако и у региону Западног Балкана (Pejin et al. 2014b).

## 8.7. Антитуморска активност

Антитуморска активност екстракта врсте *O. rotunda* одређена је МТТ есејом на осам туморских (А-549, HeLa, Hs-294Т, НТ-29, К-562, МСF-7, МDА-МВ-231 и РС-3) и једној здравој ћелијској линији (MRC-5) (Табела 14).

Метанолни екстракт овог слатководног сунђера ефикасно ( $IC_{50}$  5,03  $\mu\text{g/mL}$ ) и селективно (приближно 59 пута) деловао је на туморске ћелије дојке МСF-7 наспрам ћелија МRC-5. С друге стране, доксорубицин (употребљен као позитивна контрола) показао је високу цитотоксичност према оба типа ћелија (МСF-7 и МRC-5 0,25  $\mu\text{g/mL}$  и 0,99  $\mu\text{g/mL}$ , респективно; 20 пута активнији од метанолног екстракта према ћелијама МСF-7), бивајући при томе само 4 пута селективнији према датим туморским ћелијама. Осим тога, исти екстракт показао је знатну активност на туморске ћелије дојке МDА-МВ-23 ( $IC_{50}$  11,21  $\mu\text{g/mL}$ ) и леукемије К-562 ( $IC_{50}$  15,65  $\mu\text{g/mL}$ ). На ћелије меланома Hs-294Т, међутим, није деловао, баш као ни на ћелије простате РС-3. Поређења ради, метанолни екстракт слатководне бриозое *H. punctata* показао је скоро 5 пута мању антитуморску активност на ћелије рака дојке МСF-7 (Pejin et al. 2013e).

Ацетонски екстракт истог организма највећу цитотоксичну активност испољио је према туморским ћелијама плућа А-549 ( $IC_{50}$  5,01  $\mu\text{g/mL}$ ) (Talevska et al. 2017). На овом месту вредан помена је податак да је цитотоксичност поменутог екстракта (наспрам доксорубицина) на ове туморске ћелије била само 2 пута мања, уз око 35 пута већу селективност. Према Националном институту за рак САД, сиров екстракт сматра се активним уколико му је вредност  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$  (Suffiness & Pezzuto 1990). Као и метанолни екстракт, ни ацетонски екстракт "скринованог сунђера" није деловао на ћелије меланома и рака простате.

Изузетна хемијска и биолошка разноликост морских екосистема представља важан ресурс нових природних антитуморских једињења ширег спектра деловања (Pejin et al. 2013b). Ови резултати, пак, јасно указују на значајан потенцијал



слатководних екосистема који се, практично, још увек игнорише од стране највећег броја истраживача у овој области. У ствари, дата истраживања крајње су спорадична.

Табела 14. Антитуморска активност екстраката сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Ћелијска линија	IC <sub>50</sub> * (µg/mL)	Доксорубицин (µg/mL)
Дојке <b>MCF-7</b>	5,03 –	0,25
<b>MDA-MB-231</b>	11,21 –	0,06
Плућа <b>A-549</b>	– 5,01	2,42
Кожа <b>Hs-294T</b>	>100 >100	4,74
Дебело црево <b>HT-29</b>	21,42 –	0,10
Простата <b>PC-3</b>	>100 >100	30,68
Крв <b>K-562</b>	15,65 –	0,11
Материца <b>HeLa</b>	24,37 –	0,55
Плућа, здраве (нормалне) ћелије <b>MRC-5</b>	296,65 184,69	0,99

\*метанолни/ацетонски екстракт

Познато је да је рак и даље један од водећих узрока оболевања и умирања широм света. Наиме, према проценама Светске здравствене организације, данас са раком у свету живи око 24,6 милиона људи. До 2020. године број новооболелих особа требало би достигне 16, а број умрлих 10 милиона годишње. Више од 1/3 нових пацијената живи у Европи: посебно је угрожена источна и јужна Европа (ZJZS 2016).

Упркос интензивним истраживањима, последњих 30-ак година одобрена су само четири антитуморска лека пореклом из мора. Без даљнег, све већа и већа пажња посвећује се биоактивним секундарним метаболитима из морских микроорганизама, међу којима има како преклиничких, тако и клиничких кандидата (Xiong et al. 2013). Биолошки активна органска једињења гљива које настајују Светско море сматрају се

нарочито атрактивним биоресурсом, пре свега, у контексту нових антимикуробних и антитуморских агенаса (Blunt et al. 2005; Pejin et al. 2013a).

Из липидног екстракта морског сунђера *Luffariella cf. variabilis* Gauvin и сарадници (2000) изоловали су необичне стероидне молекуле који припадају фамилији 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -епидиоксистерола. Смеша од укупно десет стероида показала је инхибиторну активност на хумане ћелије рака дојке MCF-7 (87% инхибиције при концентрацији 80  $\mu\text{g/mL}$ ).

Стероли из мицелијума гљиве *Cordyceps sinensis*, пак, ефикасно су деловали на ћелије леукемије K-562 (Bok et al. 1999).

Генерално, сматра се да хемија сунђера има велики потенцијал у дизајну нових хемотерапеутика. Нека од датих једињења представљају инхибиторе протеин киназе C, ензима укљученог у патологију ове болести (Yoshiji et al. 1999).

## **8.8. Мутагена активност**

### Ејмсов тест

Код оба екстракта (метанолног и ацетонског) није био повећан број ревертаната. Другим речима, нису запажене индикације мутагености, било у присуству било у одсуству S9 (Табеле 15 и 16). Исто се односи и на токсичност датих екстраката, конкретно за "скриноване" концентрације. Позитивна контрола указала је на статистички значајно повећање ( $p < 0,05$ ) броја ревертантних колонија, а потврдила је осетљивост тест система, као и активност микса S9 (Talevska et al. 2017).

Табела 15. Ејмсов тест: метанолни екстракт сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Екстракт	Ревертантне колоније (CFU/плоча) <sup>a</sup>					
	ТА98		ТА100		ТА102	
	– S9	+ S9	– S9	+ S9	– S9	+ S9
<b>Контрола</b>	16 ± 4	20 ± 2	113 ± 11	105 ± 13	250 ± 21	276 ± 26
<b>DMSO (25 µL/пш<sup>**</sup>)</b>	19 ± 5	18 ± 3	103 ± 5	120 ± 16	298 ± 19	286 ± 14
0,109 mg/пш	23 ± 3	28 ± 5	131 ± 13	105 ± 3	306 ± 32	310 ± 30
0,273 mg/пш	17 ± 3	22 ± 3	101 ± 4	114 ± 5	331 ± 40	255 ± 8
0,546 mg/пш	23 ± 4	24 ± 6	104 ± 9	100 ± 12	268 ± 20	269 ± 15
1,367 mg/пш	28 ± 5	26 ± 6	111 ± 6	103 ± 14	292 ± 15	278 ± 22
<b>4-NQO (1 µg/пш)</b>	–	–	856 ± 87*	811 ± 48*	1917 ± 195*	2159 ± 67*
<b>EtBr (50 µg/ пш)</b>	23 ± 6	648 ± 68*	–	–	–	–

<sup>a</sup>средње вредности ± SD

\*значајне разлике (p &lt; 0,05)

\*\*"пш" – петри шоља

Табела 16. Ејмсов тест: ацетонски екстракт сунђера *Ochridaspongia rotunda*

Екстракт	Ревертантне колоније (CFU/ плоча) <sup>a</sup>					
	ТА98		ТА100		ТА102	
	– S9	+ S9	– S9	+ S9	– S9	+ S9
<b>Контрола</b>	16 ± 4	20 ± 2	113 ± 11	105 ± 13	250 ± 21	276 ± 26
<b>DMS (50 µL/пш)</b>	19 ± 5	18 ± 3	103 ± 5	120 ± 16	298 ± 19	286 ± 14
0,106 mg/пш	16 ± 2	33 ± 6	119 ± 6	102 ± 9	340 ± 18	355 ± 5
0,265 mg/пш	22 ± 3	28 ± 4	165 ± 13	133 ± 11	306 ± 10	290 ± 9
0,531 mg/пш	20 ± 2	24 ± 5	103 ± 14	90 ± 3	308 ± 15	261 ± 20
1,328 mg/пш	24 ± 6	27 ± 2	108 ± 2	140 ± 10	281 ± 7	296 ± 16
<b>4-NQO (1 µg/пш)</b>	–	–	856 ± 87*	811 ± 48*	1917 ± 195*	2159 ± 67*
<b>EtBr (50 µg/пш)</b>	23 ± 6	648 ± 68*	–	–	–	–

<sup>a</sup>средње вредности ± SD

\*значајне разлике (p &lt; 0,05)

\*\*"пш" – петри шоља

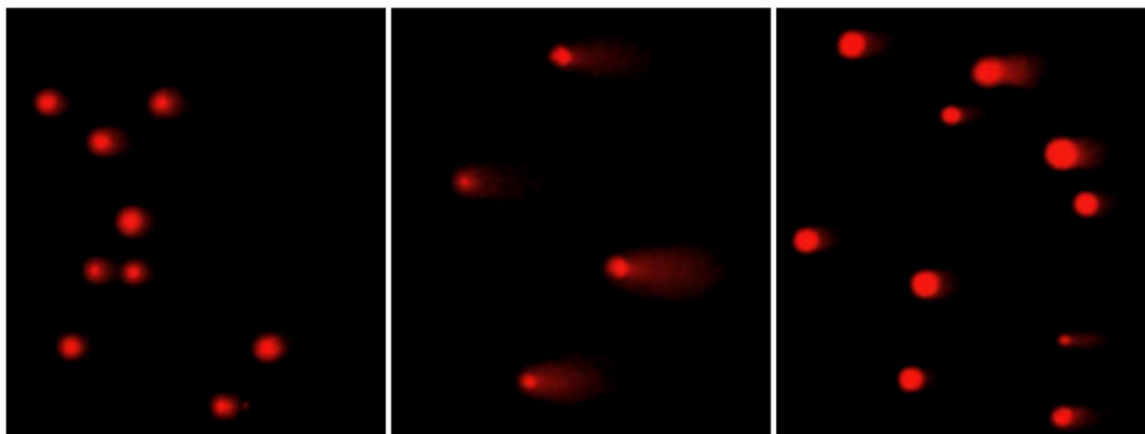
Комет есеј

Фрагментација молекула DNK у присуству познатог цитостатика доксорубина (позитивна контрола) била је око 3,3 пута већа у поређењу са

фрагментацијом датог молекула у присуству "скринованог" метанолног екстракта датог сунђера (Слике 13 и 14, Табела 17). Иста је, наиме, потврдила запажање да дати екстракт није генотоксичан.

Табела 17. Комет есеј

	Ћелијска линија	Узорак		
		Контрола	Доксорубицин	<i>Ochridaspongia rotunda</i> метанолни екстракт
Просечан моменат репа комете (%)	MCF-7	6,59 ± 0,58	71,34 ± 6,14	21,67 ± 1,76
Просечан моменат репа комете (%)	MRC-5	5,33 ± 0,75	64,41 ± 2,78	18,89 ± 0,51

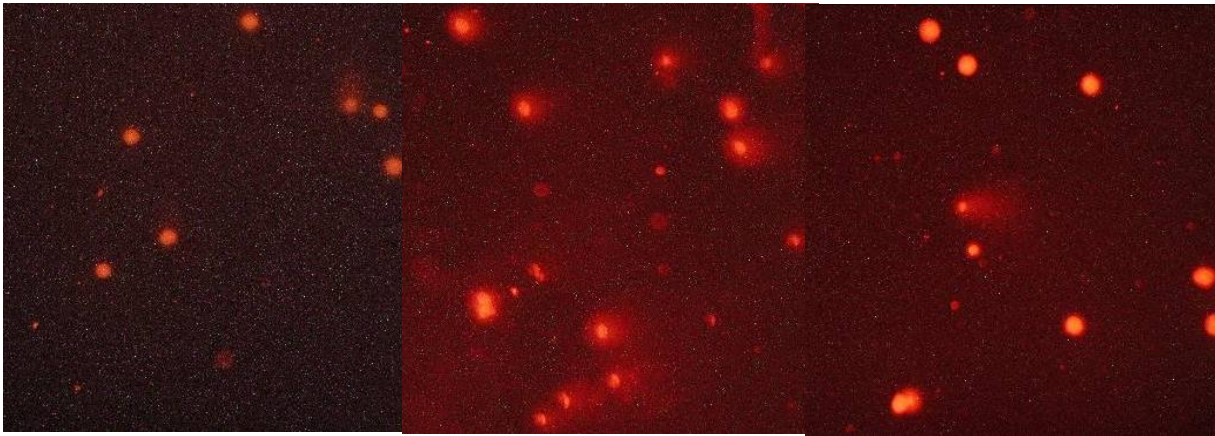


А

Б

В

Слика 13. Комет есеј: А. Нетретиране ћелије MCF-7 Б. Ћелије MCF-7 третиране са доксорубицином В. Ћелије MCF-7 третиране са метанолним екстрактом сунђера *Ochridaspongia rotunda*



**A**

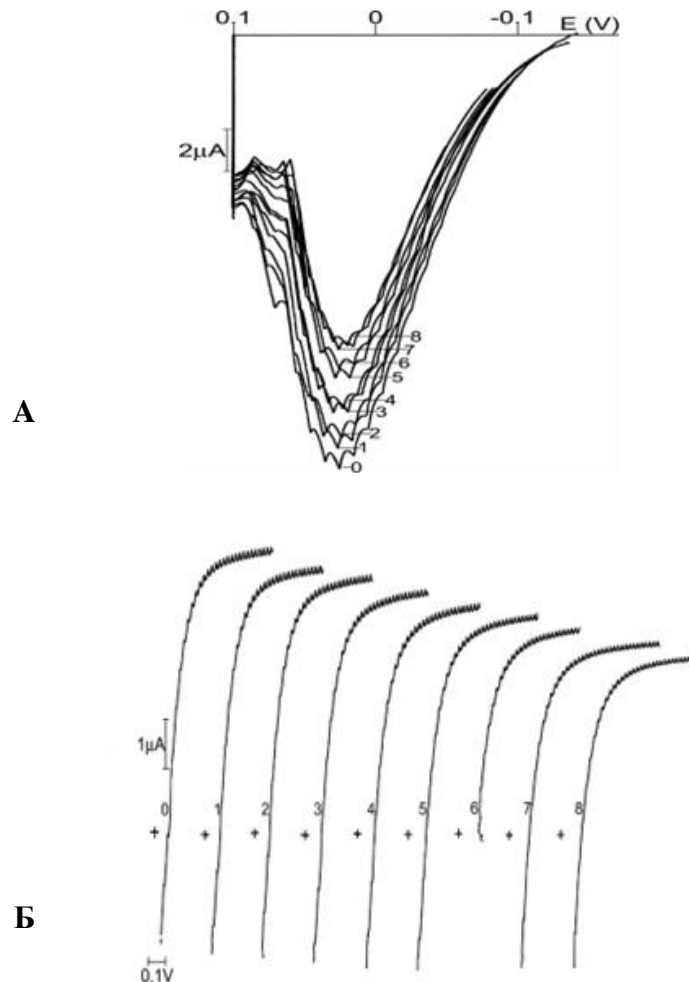
**B**

**B**

Слика 14. Комет есеј: А. Нетретиране ћелије MRC-5 Б. Ћелије MRC-5 третиране са доксорубицином В. Ћелије MRC-5 третиране са метанолним екстрактом сунђера *Ochridaspongia rotunda*

### 8.9. Антиоксидативна активност

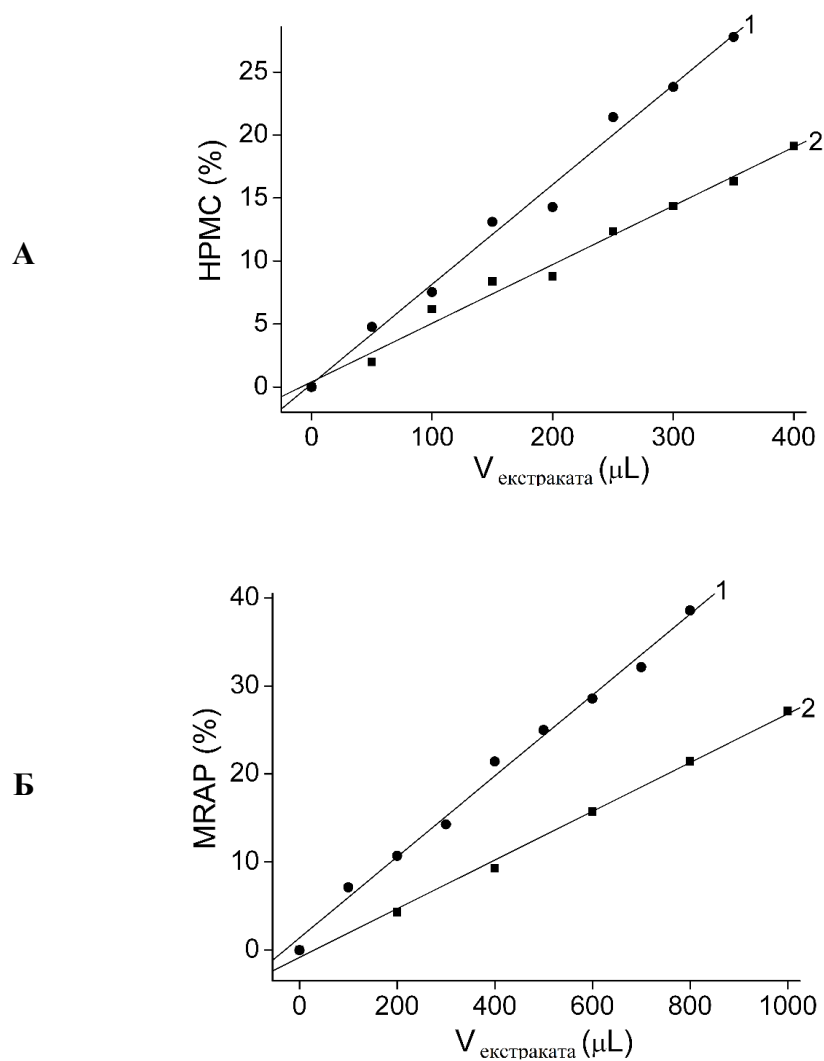
За одређивање антиоксидативне активности одабраних екстраката сунђера *O. rotunda* примењени су новији поларографски есеји НРМС (Sužnjević et al. 2011) и MRAP (Sužnjević et al. 2013). Као мера дате биоактивности коришћено је смањење анјонске или катјонске лимитирајуће струје у функцији од запремине додатих екстраката (Слика 15).



Слика 15. Утицај градуалног додавања (8 аликвота) метанолног екстракта сунђера:  
 А. 50  $\mu\text{L}$ , на анјонску поларографску струју (5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Б. 100  $\mu\text{L}$ , на катјонску  
 поларографску струју (0,5 mM  $\text{HgCl}_2$ ); у пуферу CL (pH 9,8), респективно.  
 Знак "+" односи се на почетне услове, тј.  $i = 0$  и  $E = 0,1 \text{ V vs. ЗКЕ}$ .

Оба екстракта врсте *O. rotunda* била су активна, али у различитој мери (Слика 16). Конкретно, метанолни екстракт показао је виши антиоксидативни потенцијал од ацетонског екстракта у оба поларографска есеја (HPMC  $79 \pm 3 \text{ \%/mL}$  и  $49 \pm 3 \text{ \%/mL}$ ; MRAP  $47 \pm 2 \text{ \%/mL}$  и  $28 \pm 1 \text{ \%/mL}$ ; респективно) (Pejin et al. 2014c).

Поређења ради, водено етанолни екстракт лековите биљке *Gentiana lutea* био је активнији у оба есеја (HPMC  $184 \pm 5$  %/mL; MRAP  $52 \pm 1$  %/mL; респективно) (Suznjevic et al. 2015).



Слика 16. Процент опадања анјонске (А) и катјонске (Б) лимитирајуће струје vs. запремина екстраката сунђера: метанолног (●) и ацетонског (■)

## 8.10. Инхибиција ацетилхолинестеразе

Метанолни екстракт слатководног сунђера *O. rotunda in solid* показао је умерену анти-ацетилхолинестеразну активност од 1,00  $\mu\text{g}$ . Као позитивна контрола употребљен је алкалоид галантамин који је, при истоветним условима, инхибирао дати ензим при концентрацији од 0,01  $\mu\text{g}$  (Табела 18).

Табела 18. Инхибиција ацетилхолинестеразе

Узорак	Активност на TLC плочи ( <i>in solid</i> ) ( $\mu\text{g}$ )	Активност у раствору ( <i>in liquid</i> ) ( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{g/mL}$ )
Метанолни екстракт	1,00	16,08 $\pm$ 1,10
Ацетонски екстракт	1,50	23,07 $\pm$ 1,49
Галантамин	0,01	0,14 $\pm$ 0,01

Дакле, *in solid* галантамин је 100 пута био активнији од метанолног екстракта, а у условима *in liquid* око 115 пута. С друге стране, метанолни екстракт показао се активнијим од ацетонског екстракта, како на танком слоју, тако и у раствору (Talevska et al. 2017).

Проучавајући метанолне екстракте 20 биљака из индијске традиционалне медицине (Ајурведа), Метју (Mathew) и Субраманиан (Subramanian) (2014) истакли су за биљну врсту *Rauvolfia serpentina* вредност  $\text{IC}_{50}$  22  $\mu\text{g/mL}$  као најнижу.

За разлику од инхибитора АСhЕ који делују периферно, тзв. "паметни лекови" пролазе кроз крвно-мождану баријеру. Први одобрени "паметни лек" био је такрин: нажалост, показао се изузетно токсичним (Patrick 2005). Касније су уведени донепезил, галантамин и ривастигмин. Први лек одобрен у државама Европске уније управо је био ривастигмин, аналог физостигмина. Нежељени ефекти ривастагмина



укључују гађење, повраћање, стомачне проблеме, губитак апетита, губитак тежине, дијареју, слабост, вртоглавица, оток у рукама или ногама, бол у зглобовима, поспаност, проблеме са спавањем (несаницу), главобољу и тремор (Sirkema et al. 2005).

Без даљњег, важно је да се тежи ка проналаску нових инхибитора овог ензима са различитом хемијском структуром од алкалоидне која осим бенефитних, како се да приметити, показује и већи број нежељених (споредних) ефеката. Примера ради, Рејн и сарадници (2008), као и Томпсона и сарадници (2015) установили су да поједини деривати аварола (главни секундарни метаболит медитеранског сунђера *D. avara*) у условима *in solid* умерено инхибирају дати ензим (у опсегу 0,50-1,00 µg). Коначно, *in solid*, депсидонски скефолд показао је сличан ниво инхибиције (Рејн et al. 2012b).

Даља истраживања ове пионирске студије требало би усмерити ка формирању аквакултуре реликтне и ендемске врсте *O. rotunda* (*in situ* и *ex situ*, ради заштите и очувања биодиверзитета) у циљу обезбеђивања оптималне количине биолошког материјала за изоловање и идентификацију антимикуробних (укључујући "anti-quorum sensing" активност), антитуморских, антиоксидативних и анти-ацетилхолинестеразних принципа. Намеће се, међутим, и потреба за дефинисањем правог произвођача биоактивних супстанци (сам сунђер, његови микросимбионт(и) /у првом реду, бактерије/ или сви скупа заједно) (Keller-Costa et al. 2014), као и за утврђивањем механиз(а)ма деловања биолошки активних природних органских једињења.

Такође, најпотентније биоактивности (антимикуробна активност, "anti-quorum sensing" активност и Ејмсов тест) потребно је испитати у условима *ex vivo* и *in vivo*, како на нивоу екстраката, тако и на нивоу њихових фракција и чистих (изолованих) органских једињења, са циљем одговора на питање – синергизам: да или не, као и ради процене потенцијалне употребе биолошки активних метаболита сунђера *O. rotunda* у медицини и фармацији.

Последњих шест-седам деценија органски хемичари велику пажњу посвећују испитивању биоактивних супстанци (са акцентом на секундарне метаболите) еволутивно једноставнијих морских организама, а пре свега сунђера. Наиме, као сесилни бескичмењаци практично без икакве физичке заштите, сунђери су развили ефикасну хемијску одбрану у борби са предаторима и/или конкуренцији за станиште. Ова докторска дисертација, међутим, јасно указује на изузетан биоактивни потенцијал њихових слатководних представника који су до сада, поготово на подручју Западног Балкана, били крајње маргинализована група животиња, како у фундаменталном, тако и у апликативном смислу. Стога би светска научна заједница, у потрази за новим лековима, лековитим средствима и/или додацима хране, пажњу требало да усмери и на слатководне екосистеме, првенствено на сунђере и бриозе, упркос спорадичним наводима/тврдњама традиционалне (етно) медицине наспрам биљака, гљива и лишајева.

## **ЗАКЉУЧЦИ**

## 9. Закључци

– Атомском апсорпционом спектроскопијом по први пут утврђен је елементарни састав сунђера *O. rotunda*, а "head space" GC-MS анализом испарљива једињења.

– У оба екстракта слатководног сунђера *O. rotunda* (метанолном /МЕ/ и ацетонском /АЕ/) анализом одговарајућег FTIR спектра уочено је присуство сличних органских супстанци (карбонилна једињења, стероли и/или дуголанчани алкохоли).

– Највећу антибактеријску и антифунгалну активност у условима *in vitro* показали су МЕ (MIC 7,5-15,0 µg/mL и MBC 15,0-30,0 µg/mL) и АЕ (MIC 7,5-45,0 µg/mL и MFC 15,0-60,0 µg/mL).

– На изолату бактеријског соја *P. aeruginosa* PAO1, МЕ је у већој мери инхибирао синтезу пиоцијанина (49,90% vs. 42,44%), док је АЕ испољио бољу антибиофилм активност (53,99% vs. 48,29%).

– У условима *in vitro* МЕ ефикасно (IC<sub>50</sub> 5,03 µg/mL) и селективно (приближно 59 пута) је деловао на туморске ћелије дојке MCF-7 (vs. ћелије MRC-5), док је АЕ најактивнији (IC<sub>50</sub> 5,01 µg/mL) и најселективнији (приближно 35 пута, vs. доксорубин) био према туморским ћелијама плућа А-549.

– Резултати Ејмсовог теста и комет есеја указали су на чињеницу да ови екстракти не представљају мутагене агенсе, тј. да се могу сматрати негенотоксичним.

– Коначно, новијим поларографским есејима (HPMC и MRAP) утврђен је антиоксидативни потенцијал оба екстракта, а одговарајућим ензимским тестовима (како у условима *in solid*, тако и у условима *in liquid*) обећавајућа анти-ацетилхолинестеразна активност.

– Слатководни сунђер *O. rotunda* може се сматрати значајним извором нових и потентних биолошки супстанци природног порекла са потенцијалном применом у медицини и фармацији.

## **ЛИТЕРАТУРА**

## 10. Литература

Akihisa T., Kojima S., Yokota T. & Tamura T. 24-Methylene-25-methylcholesterol and both C-24 epimers of 24-ethyl-22-dehydrocholesterol in a freshwater green alga *Hydrodictyon reticulatum*. *Phytochemistry*, 1991, **30**, 3621-3624.

Albrecht C. & Wilke T. Ancient Lake Ohrid: biodiversity and evolution. *Hydrobiologia*, 2008, **615**, 103-140.

Arndt W. Balkanspongilliden. Mit einer Bemerkung über ungarische und chinesische Kolonien von *Spongilla carteri* Carter. *Zoologischer Anzeiger*, 1923, **56**, 74-81.

Arndt W. *Ochridaspongia rotunda* n.g. n.sp. ein neuer Süßwasserschwamm aus dem Ochridasee. *Archiv für Hydrobiologie*, 1937, **31**, 636-677.

Arndt W. Spongiologische Untersuchungen am Ochridasee. *Archiv für Hydrobiologie*, 1938, **34**, 48-80.

Berquist P. R. *Sponges*. University of California Press, 1978.

Blunt J. W., Copp B. R., Munro M. H. G., Northcote P. T. & Prinsep M. R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2005, **22**, 15-61.

Blunt J. W., Copp B.R., Hu W. P., Munro M. H., Northcote P. T. & Prinsep M. R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2007, **24**, 31-86.

Bok J. W., Lermer L., Chilton J., Klingeman H. G. & Neil Towers G. H. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 1999, **51**, 891-898.

Cansu T. B., Yayli B., Özdemir T., Batan N., Alpay Karaoğlu S. & Yayli N. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of mosses (*Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. and *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr.) growing in Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*, 2013, **37**, 213-219.

Chung H. Y., Ma W. C. J., Ang P. O. Jr, Kim J-S. & Chen F. Seasonal variations of bromophenols in brown algae (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum*, and *Lobophora variegata*) collected in Hong Kong. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 2619-2624.

Chuparina E. V., Paradina L. Ph. & Trunova V. A. Determination of elemental composition of Lake Baikal sponges by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *X-Ray Spectrometry*, 2013, **42**, 388-393.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. Wayne, PA: CLSI Publication M07-A8.

De Barros I. B., dos Santos E.S.G., Gomes D. E. D., Santos D., Emelly D., Gomes D., Volkmer-Ribeiro, Silva C. C., da Veiga V. F. J. Elemental composition of freshwater sponges *Drulia uruguayensis* and *Drulia cristata* collected in the Tapajós River. *X-Ray Spectrometry*, 2013, **42**, 59-62.

De Rosa S., Mitova M., Handjieva N. & Caliş I. Coumarin glucosides from *Cruciata taurica*. *Phytochemistry*, 2002a, **59**, 447-450.

De Rosa S., Tommonaro G., Slantchev K., Stefanov K. & Popov G. Lipophilic metabolites from the marine sponge *Ircinia muscarum* and its cell culture. *Marine Biology*, 2002b, **140**, 465-470.

De Rosa S., Iodice C., Nechev J., Stefanov K. & Popov S. Composition of the lipophilic extract from the sponge *Suberites domuncula*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2003, **68**, 249-256.

Delage Y. & Hérouard E. Traité de zoologie concrète (Mésozoaires-Spongiaires). *Schleicher Frères*, 1899, **2**, 1-169.

Dembitsky V. M., Rezanka T. & Srebnik M. Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2003, **123**, 117-155.

Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. jr. & Featherstone R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961, **7**, 88-90.

Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, **39**, 1360-1367.

Fish J. D. & Fish S. *A Student's Guide to the Seashore*. Cambridge University Press, 2011.

Fromont J. P. & Bergquist P. R. Structural characters and their use in sponge taxonomy: When is a sigma not a sigma? In *New Perspectives in Sponge Biology*, 1990, 273-278.

Gauvin A., Smadja J., Aknin M., Faure R. & Gaydou E-M. Isolation of bioactive 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy sterols from the marine sponge *Luffariella cf. variabilis*. *Canadian Journal of Chemistry*, 2000, **78**, 986-992.

Gilbert J. J. & Hadzisce S. Sexual reproduction in the freshwater sponge, *Ochridospongia rotunda*. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung Limnologie*, 1975, **19**, 2785-2792.

Gilbert J. J. & Hadzisce S. Life cycle of the freshwater sponge *Ochridaspongia rotunda* Arndt. *Archiv für Hydrobiologie*, 1977, **79**, 285-318.

Gilbert J. J. & Hadzisce S. Taxonomic notes on the shallow-water endemic sponges of Lake Ohrid, Yugoslavia, with a description of two new species and a redescription of *Spongilla stankovici*. *Archiv für Hydrobiologie*, 1984, **99**, 331-339.



Хаџишче С. Прилог на познавање фауната на сунѓерите (Spongillidae) на големите езера на Македонија (Дојранското, Преспанското и Охридското). *Хидробиолошки завод Охрид*, 1953, **3**, 73-103.

Hadzisce S. Beitrag zur Kenntnis der Spongillidenfauna der großen mazedonischen Seen (Dojran, Prespa und Ohridsee). *Recueil des Travaux. Station Hydrobiologique Ohrid*, 1953, **1**, 73-103.

Hadzisce S. III. Beitrag zur Kenntnis der Gastro-podenfauna des Ohridsees. Beschreibung der bis jetzt unbekanntenen Schnecken und Beispiele der Speciation bei den Gastropoden des Ohridsees. *Recueil des Travaux, Station Hydrobiologique Ohrid*, 1956, **4**, 57-107.

Hanif N., Tanaka J., Setiawan A., Trianto A., de Voogd N. J., Murni A., Tanaka C. & Higa T. Polybrominated diphenyl ethers from the Indonesian sponge *Lamellodysidea herbacea*. *Journal of Natural Products*, 2007, **70**, 432-435.

Hooper J. N. A. & van Soest R. W. M. *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer/Plenum, 2002.

Idaomar M., El-Hamss R., Bakkali F., Mezzoug N., Zhiri A., Baudoux D., Muñoz-Serrano A., Liemans V. & Alonso-Moraga A. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 2002, **513**, 61-68.

Itskovich V. B., Belikov S. I., Efremova S. M., Masuda Y., Krasko A., Schroeder H. C. & Mueller W. E. G. Monophyletic origin of freshwater sponges in ancient lakes based on partial structures of COXI gene. *Hydrobiologia*, 2006, **568**, 155-159.

Iwu M. M. & Wootton J. *Ethnomedicine and Drug Discovery*. Elsevier Science, 2002.

Jamieson A. *The Hadal Zone: Life in the Deepest Oceans*. Cambridge University Press, 2015.

Keller-Costa T., Jousset A., van Overbeek L., van Elsas J. D. & Costa R. The freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* harbours diverse *Pseudomonas* species (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales) with broad-spectrum antimicrobial activity. *PloS ONE*, 2014, **9**, 1-15.

Kerr R. G., Stoilov I. L., Thompson J. E. & Djerassi C. Biosynthetic studies of marine lipids. 16. *De novo* sterol biosynthesis in sponges. Incorporation and transformation of cycloartenol and lanosterol into unconventional sterols of marine and freshwater sponges. *Tetrahedron*, 1989, **45**, 1893-1904.

Khan I.A. & Abourashed E.A.. *Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*. Wiley, 2003.

Knapp F. F., Goad L. J. & Goodwin T. W. The conversion of 24-ethylidene sterols into poriferasterol by the alga *Ochromonas malhamensis*. *Phytochemistry*, 1971, **16**, 1683-1688.

Krunić M. *Zoologija invertebrata 1*, Naučna knjiga, Beograd, 1977.

Lévi C. Les Cellules des Eponges. In *The Biology of the Porifera. Symposia of the Zoological Society of London*, 1970.

Li C-W., Chen J-Y. & Hua T-E. Precambrian sponges with cellular structures. *Science*, 1998, **279**, 879-882.

Li L. & Zhao J. Molecules determination of the volatile composition of *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par. (Bryaceae) using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Molecules*, 2009, **14**, 2195-2201.

Manconi R., Piccialli R., Pronzato R. & Sica D. Steroids in Porifera. Sterols from freshwater sponges *Ephydatia fluviatilis* (L.) and *Spongilla lacustris* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Comparative Biochemistry*, 1988, **91**, 237-245.

Manconi R. & Pronzato R. Suborder Spongillina subord. nov.: Freshwater Sponges. In *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer/Plenum, New York, 2002.

Maron D. M. & Ames B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 1983, **113**, 173-215.

Marston A., Kissling J. & Hostettmann K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, 2002, **13**, 51-54.

Maslinko B., Jordanoski M. & Mandžukov P. Content of some micro elements in the Ohrid lake water. *Limnological Investigations of Ohrid and Prespa Lakes*, 2005, **3&4**, 27-41.

Masuda Y. Studies on the taxonomy and distribution of freshwater sponges in Lake Baikal. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2009, **47**, 81-110.

Mathew M. & Subramanian S. *In vitro* screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of Ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. *PloS ONE*, 2014, **9**, e86804.

Mayzel B., Aizenberg J. & Ilan M. The elemental composition of Demospongiae from the Red Sea, Gulf of Aqaba. *PloS ONE*, 2014, **9**, e99918.

Mazur A. 5,6-Dihydrostigmasterol. *Journal of the American Chemical Society*, 1941, **63**, 2442-2444.

Merk O. & Speit G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1988, **32**, 260-268.

Mileski K. S., Džamić A. M., Ćirić A. D., Ristić M. S., Grujić S. M., Matevski V. S. & Marin P. D. Composition, antimicrobial and antioxidant properties of endemic species *Ferulago macedonica* Micevski & E. Mayer. *Records of Natural Products*, 2015, **9**, 208-223.

Moore J. *An Introduction to the Invertebrates*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

Müller W. E. G. *Sponges (Porifera)*. Springer, 2003.

Müller W. E. G., Batel R., Schröder H. C. & Müller I. M.. Traditional and modern biomedical prospecting: Part I – the history. Sustainable exploitation of biodiversity (Sponges and Invertebrates) in the Adriatic Sea in Rovinj (Croatia). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2004, **1**, 71-82.

Nakarada Đ. 2013. Master rad. Hemijski sastav i anti-hidroksil radikalska aktivnost isparljivih komponenti slatkovodne briozoe *Hyalinella punctata*. Fakultet za fizičku hemiju. Univerzitet u Beogradu.

Nechev L. V., Kozekov I. D., Brock A. K., Rizzo C. J. & Harris T. M. DNA adducts of acrolein: site-specific synthesis of an oligodeoxynucleotide containing 6-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydropyrimido[1,2-a]purin-10(3h)-one, an acrolein adduct of guanine. *Chemical Research in Toxicology*, 2002, **15**, 607-613.

Nenadić M., Soković M., Glamočlija J., Ćirić A., Perić-Mataruga V., Ilijin L., Tešević V., Vujisić L., Todosijević M., Vesović N. & Ćurčić S. Antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of three ground beetle species (Insecta: Coleoptera: Carabidae). *The Science of Nature*, 2016, **103**, 33-42.

Nikolić M. 2015. Doktorska disertacija. Biološka aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih biljaka na vrste rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* i *Candida* izolovane iz usne duplje čoveka. Biološki fakultet. Univerzitet u Beogradu.

Oficijalski P. *Spongia fluviatilis* (Badiaga). *Pharmazeutische Zentralhalle für Deutschland*, 1937, **78**, 174-175.

Patrick G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford University Press, 2005.

Pawlik J. R., McFall G. & Zea S. Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators? *Journal of Chemical Ecology*, 2002, **28**, 1103-1115.

Pejin B., Iodice C., Tommonaro C. & De Rosa S. Synthesis and biological activities of thio-avarol derivatives. *Journal of Natural Products*, 2008, **71**, 1850-1853.

Pejin B. 2011. Doktorska disertacija. Hemijski sastav i medicinski potencijal odabranih vrsta lišajeva, briofita i sunđerā. Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Pejin B. Thio-avarol derivatives and Alzheimer's disease. Proceedings of Serbia-Italia status and perspectives of the scientific and technological bilateral cooperation. Belgrade, Serbia, 2012a, 131-134.

Pejin B., Glamoclija J., Ciric A., Radotic K., Vajs V., Tesevic V., Hegedis A., Karaman I., Horvatovic M. & Sokovic M. Antimicrobial activity of the freshwater bryozoan *Hyalinella punctata* (Hanckock, 1850). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2012b, **7**, 1021-1026.

Pejin B., Tommonaro G., Iodice C., Tesevic V. & Vajs V. Acetylcholinesterase inhibition activity of acetylated depsidones from *Lobaria pulmonaria*. *Natural Product Research*, 2012c, **26**, 1634-1637.

Pejin B., Jovanović K. K., Mojović M. & Savić A. G. New and highly potent antitumor natural products from marinederived fungi: covering the period from 2003 to 2012. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2013a, **13**, 2745-2766.

Pejin B., Mojović M. & Savić A. G. Novel antitumour natural products from the phylum Bryozoa. *Biologia Serbica*, 2013b, **35**, 3-14.

Pejin B., Nakarada Đ., Novaković M., Gorjanović S., Pastor F., Mojović M., Savić A., Tešević V., Hegediš A., Karaman I., Horvatović M., Radotić K. & Sužnjević D. Antioksidativna aktivnost isparljivih komponenti *Hyalinella punctata* određena polarografijom sa jednosmernom strujom koristeći anodni talas vodonik-peroksida. Drugi

kongres Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju, Knjiga sažetaka, Niš, Srbija, 2013c, 50.

Pejin B., Stanimirovic B., Djordjevic N., Hegedis A., Karaman I., Horvatic M. & Radotic K. *In vitro* radioprotective activity of the bryozoan *Hyalinella punctata*. *Asian Journal of Chemistry*, 2013d, **25**, 4713-4714.

Pejin B., Stosic-Grujicic S., Bogdanovic G., Hegedis A., Karaman I., Stojanovic I., Nikolic I., Kojic V., Horvatic M. & Radotic K. *In vitro* evaluation of the immunomodulatory and anticarcinogenic activity of the freshwater bryozoan *Hyalinella punctata* methanolic extract. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2013e, **8**, 187-195.

Pejin B., Nakarada D., Novakovic M., Tesevic V., Savic A., Radotic K. & Mojovic M. Antioxidant volatiles of the freshwater bryozoan *Hyalinella punctata*. *Natural Product Research*, 2014a, **28**, 1471-1475

Pejin B., Talevska A., Ciric A., Glamoclija J., Nikolic M., Talevski T. & Sokovic M. Anti-quorum sensing activity of selected sponge extracts: a case study of *Pseudomonas aeruginosa*. *Natural Product Research*, 2014b, **28**, 2330-2333.

Pejin B., Talevska A., Gorjanović S., Pastor F., Talevski T. & Sužnjević D. Evaluation of the antioxidant activity of the freshwater sponge *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937) using two polarographic assays. *Physical Chemistry* 2014, 2014c, Belgrade, Serbia, 498.

Pejin B., Talevski A., Ciric A., Glamoclija J., Nikolic M., Talevski T. & Sokovic M. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of the freshwater sponge *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937). *Natural Product Research*, 2014d, **28**, 1489-1494.

Pejin B., Ciric A., Horvatic M., Jurca T., Glamoclija J., Nikolic M. & Sokovic M. An insight into antimicrobial activity of the freshwater bryozoan *Pectinatella magnifica*. *Natural Product Research*, 2016a, **30**, 1839-1843.

Pejin B., Ciric A., Karaman I., Horvatovic M., Glamoclija J., Nikolic M. & Sokovic M. *In vitro* antibiofilm activity of the freshwater bryozoan *Hyalinella punctata*: a case study of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Natural Product Research*, 2016b, **30**, 1847-1850.

Radović I. & Petrov B. *Raznovrsnost života 1 – struktura i funkcija*. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu i Stylos Novi Sad, 2001.

Raederstorff D. & Rohmer D. Sterols of the unicellular algae *Nematochryopsis roscoffensis* and *Chrysotila lamellose*: isolation of (24E)-24-n-propylidenecholesterol and 24-n-ropylcholesterol. *Phytochemistry*, 1984, **23**, 2835-2838.

Sandy S. M. & Foong-Yee T. Anti-quorum sensing and antimicrobial activities of some traditional Chinese medicinal plants commonly used in South-East Asia. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2012, **8**, 11-20.

Schröder K. Die Verwendung der Susswasserschwamme in der Ukraine. *Die Umschau Wissenschaft Technik*, 1942, **46**, 507-509.

Se-Kwon K. *Marine Medicinal Foods, Implications and Applications: Animals and Microbes*. Elsevier, 2012.

Shridhar D. M. P., Mahajan G. B., Kamat V. P., Naik C. G., Parab R. R., Thakur N. R. & Mishra P. D. Antibacterial activity of 2-(2',4'-dibromophenoxy)-4,6-dibromophenol from *Dysidea granulosa*. *Marine Drugs*, 2009, **7**, 464-471.

Shubina L. K., Makarieva T. N., Dyshlovoy S. A., Fedorov S. N., Dmitrenok P. S. & Stonik V. A. Three new aaptamines from the marine sponge *Aaptos* sp. and their proapoptotic properties. *Natural Product Communications*, 2010, **5**, 1881-1884.

Sindičić M. & Konjević D. *Osnove zoologije mediteranskih ekosustava (ckpunma)*. Sveučilište u Zadru, 2014.

Sinko J., Rajchard J., Balounova Z. & Fikotova L. Biologically active substances from water invertebrates: a review. *Veterinarni Medicina*, 2012, **57**, 177-184.

Sipkema D., Franssen M. C., Osinga R., Tramper J. & Wijffels R. H. Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 2005, **7**, 142-162.

Suffness M. & Pezzuto J. M. Assays related to cancer drug discovery. In *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press: London, UK, 1990.

Manconi R. & Pronzato R. Suborder Spongillina subord. nov.: Freshwater Sponges. In *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer/Plenum, New York, 2002.

Станковић С. *Охридското Езеро и неговиот жив свет*. Култура, Скопје, 1959.

Sužnjević D., Petrović M., Pastor F. T., Veljović M., Zlatanović S., Antić M. & Gorjanović S. Reduction of Hg<sup>2+</sup> by individual phenolics and complex samples and its application in polarographic antioxidant assay. *Journal of the Electrochemical Society*, 2015, **162**, H428-H433.

Sužnjević D. Ž., Pastor F. T., Gorjanović S. Ž. & Milić S. Polarographic study of antioxidants interactions with Hg(II) and its hydroxo-perhydroxo complex. *4th Regional Symposium on Electrochemistry – South-East Europe*, Book of Abstracts, Ljubljana, Slovenia, 2013, 109.

Sužnjević D. Ž., Pastor F. T., Gorjanović S. Ž. Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. *Talanta*, 2011, **85**, 1398-1403.

Talevska A., Pejin B., Beric T. & Stankovic S. Further insight into the bioactivity of the freshwater sponge *Ochridaspongia rotunda*. *Pharmaceutical Biology*, 2017, **55**, 1313-1316.

Talevska A., Pejin B., Kojic V., Beric T., Stankovic S. A contribution to pharmaceutical biology of freshwater sponges. *Natural Product Research*, In Press, DOI: 10.1080/14786419.2017.1315719.



Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissiou M. & Sokmen A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*, 2004, **84**, 519-525.

Tommonaro G., Iodice C., Abd El-Hady F. K., Guerriero G. & Pejin B. The mediterranean sponge *Dysidea avara* as a 40 year inspiration of marine natural product chemists. *Journal of Biodiversity & Endangered Species*, 2015, DOI:10.4172/2332-2543.S1.001.

Tsukatani Y., Romberger S. P., Golbeck J. H. & Bryant D. A. Isolation and characterization of a homodimeric type-I reaction center complex from *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*, an aerobic chlorophototroph. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**, 5720-5732.

Vacelet J. & Boury-Esnault N. Carnivorous sponges. *Nature*, 1995, **373**, 333-335.

van Den Dool H. & Kratz P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 1963, **11**, 463-471.

Vieira V., Fernandes Â., Barros L., Glamočlija J., Ćirić A., Stojković D., Martins A., Soković M. & Ferreira I. C. F. R. Wild *Morchella conica* Pers. From different origins: a comparative study of nutritional and bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, **96**, 90-98.

Walton M. J. & Pennock J. F. Some studies on the biosynthesis of ubiquinone, isoprenoid alcohols, squalene and sterols by marine invertebrates. *Biochemical Journal* 1972, **127**, 471-479.

Whitfield F. B., Shaw K. J. & Walker D. I. The source of 2, 6-dibromophenol: Cause of an iodoform taint in Australian prawns. *Water Science & Technology*, 1992, **25**, 131-138.

Whitfield F. B., Drew M., Helidoniotis F. & Svoronos D. Distribution of bromophenols in species of marine polychaetes and bryozoans from Eastern Australia and the role of such animals in the flavor of edible ocean fish and prawns (shrimp). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, **47**, 4756-4762.

Wilkomirski B. & Goad L. J. The conversion of (24S)-24-ethylcholesta-5,22,25-trien-33-ol into poriferasterol, both *in vivo* and with a cell-free homogenate of the alga *Trebouxia* sp. *Phytochemistry*, 1983, **22**, 929-932.

Xiong Z-Q., Wang J-F., Hao Y-Y. & Wang Y. Recent advances in the discovery and development of marine microbial natural products. *Marine Drugs*, 2013, **11**, 700-717.

Yoshiji H., Kuriyama S., Ways D. K., Yoshii J., Miyamoto Y., Kawata M., Ikenaka Y., Tsujinoue H., Nakatani T., Shibuya M. & Fukui H. Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Research*, 1999, **59**, 4413-4418.

Yusufoğlu A., Çelik H. & Kirbaşlar F.G. Utilization of *Lavandula angustifolia* Miller extracts as natural repellents, pharmaceutical and industrial auxiliaries. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2004, **69**, 1-7.

Zhang H., Skildum A., Stromquist E., Rose-Hellekant T. & Chang L. C. Bioactive polybrominated diphenyl ethers from the marine sponge *Dysidea* sp. *Journal of Natural Products*, 2008, **71**, 262-264.

Patent 2013. Marine sponge traditional Chinese medicine health product, CN 103461981 B.

ZJZS 2016. Доступно на: [http://www.zjzs.org.rs/arhiva.php?nov\\_id=197](http://www.zjzs.org.rs/arhiva.php?nov_id=197); преузето дана 01.06.2016. године.

Zunina F., Gambetta R. & Di Marco A. The inhibition *in vitro* of DNA polymerase and RNA polymerases by daunomycin and adriamycin. *Biochemical Pharmacology*, 1975, **24**, 309-311.

## **ОПШТИ И ПОДАЦИ О АУТОРСКИМ ПРАВИМА**

## 11. Биографија



Александра Т. Талевска рођена је 25.12.1985. у Скопљу, Р. Македонија. Основну школу "Григор Прличев" и гимназију "Св. Климент Охридски" (природно-математички смер) завршила је у Охриду.

Дипломирала је са оценом 10 на Природно-математичком факултету Универзитета "Св. Кирил и Методиј" у Скопљу, на Институту за биологију, смер *Биохемија - Физиологија* са дипломским радом под називом: "Содржина на феноли и флавоноиди кај некои лековити растенија колекционирани на планината Јабланица, Р. Македонија". Тиме је стекла академско звање "*инженер по биологија*".

Докторске академске студије уписала је 2010. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, Р. Србија, смер *Генетика*.

Од 2004. године до сада, као волонтер, била је активна у више стручних организација: Истражувачко друштво на студенти биолози (ИДСБ), Скопје, Р. Македонија; Млади за Млади, Скопје, Р. Македонија; Македонско школошко друштво (МЕД), Скопје, Р. Македонија; Македонско лимнолошко друштво (МЛД), Охрид, Р. Македонија.

Осим тога, активно је учествовала у три пројекта МЛД: "Ревитализација на стаништето на жолтиот локван (*Nuphar lutea*) во поедини подрачја од Охридското Езеро", "Прелиминарни истражувања на мочурливите терени во реонот на Дебарца и предлагање на мерки за нивна заштита како делови на природата од посебен интерес" и "Ревитализација на Охридското Блато – Студенчишта". Свој допринос пружила је и у раду два еколошка кампа: "Еколошки работен камп на планината Осогово – Р. Македонија" и "Еколошки работен камп на планината Јабланица – Р. Македонија". Била је учесник и у пројекту "ОгО" под окриљем Рафорд фондације (The Rufford Small Grants Foundation). У фокусу датог пројекта управо је слатководни сунђер *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937).

Докторанд Талевска коаутор је 1 научног рада категорије М<sub>22</sub>, 2 научна рада категорије М<sub>23</sub>, као и 2 научна рада меѓународног карактера која нису категорисана. Поред тога, има више саопштења на научним скуповима од меѓународног значаја, како написаних у изводу (12 радова категорије М<sub>34</sub>), тако и у целини (11 радова категорије М<sub>33</sub>).

Од 2012. године запослена је као директор самосталне дијагностичке лабораторије у Охриду, ПЗУ "БИОМЕД ЛАБ".

## Изјава о ауторству

Потписана Александра Т. Талевска

број уписа Б3029/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Хемијски састав и биолошка активност екстраката слатководног сунђера**

***Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937)**

- 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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 3. април 2017. године

---

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Александра Т. Талевска

Број уписа Б3029/2010

Студијски програм Биологија/Генетика

Наслов рада

**Хемијски састав и биолошка активност екстраката слатководног сунђера  
*Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937)**

Ментори др Славиша Станковић, редовни професор Биолошког факултета  
Универзитета у Београду

др Борис Пејин, научни сарадник Института за мултидисциплинарна  
истраживања Универзитета у Београду

Потписана Александра Т. Талевска

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала 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, 3. април 2017. године

---

## Изјава о коришћењу

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

**Хемијски састав и биолошка активност екстраката слатководног сунђера**

***Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937)**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

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, 3. април 2017. године

---



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.