

ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA MORSKIH ORGANIZAMA JUŽNOG JADRANA*)

Miroslav J. GAŠIĆ,¹⁾ Jovan STJEPČEVIĆ,²⁾ Branislav STJEPČEVIĆ,²⁾
Zoran KLJAJIĆ,²⁾ Nikola DOGOVIĆ,³⁾ Dušan SLADIĆ,¹⁾ Slaviša MATIĆ,⁴⁾
Werner E. G. MÜLLER⁴⁾ i Rudolf K. ZAHN⁴⁾

A b s t r a c t

BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF SOUTH ADRIATIC MARINE ORGANISMS

Antimicrobial activity of lipid and water soluble extracts of sponges (23 species), ascidians (8 species) and corals (3 species) from Southern Adriatic was investigated. Activity was more often found in water extracts, against gram-positive bacteria. The general approach to the selection of organisms for detailed investigation is discussed.

Tokom nekoliko poslednjih decenija interes za istraživanje mora naglo je porastao. Razlozi koji su doveli do povećanja istraživačke aktivnosti su brojni ali se čini da je glavni ipak to što je čovek, zahvaljujući razvoju tehničkih sredstava (batiskafi, uređaji za podvodno ronjenje i snimanje i dr.), tek u novije vreme počeo da stiče realnu predstavu o odnosima u živom svetu mora. Naime, dugo je vladalo uverenje, a među neupućenim takvo uverenje postoji i danas, da je more izrazito konfliktna i neprijateljska sredina kojoj nedostaje unutrašnja harmonija. Možda je takvo shvatanje opravdano ako se ovo pitanje posmatra u svetlu odnosa čovek — more ali, ako se bolje razmotre odnosi u živom svetu koji je proizvod mora i koji ga nastanjuje, tada se stiče potpuno drugačija slika. Mnogi problemi odnosa među vrstama koje suvozemni organizmi nisu rešili, u živom svetu mora ne postoje ili su

*) Rad posvećujemo tragično preminulom kolegi i saradniku Slaviši Matiću, magistru hemijskih nauka.

¹⁾ Prirodno-matematički fakultet, Odsek za hemijske i fizičko-hemijske nauke, Beograd.

²⁾ Zavod za biologiju mora i oceanografiju, Kotor.

³⁾ IHTM-OOOR Organska hemija i biohemija, Beograd.

⁴⁾ Physiologisch-Chemisches Institut, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, SR Nemačka.

mного manje značajni. Dovoljno je podsetiti da je život u moru mnogo stariji od života na kopnu a da su i pored toga očuvane vrste na svim nivoima filogeneze, što na kopnu nije slučaj.

Naše interesovanje za proučavanje živog sveta mora sa hemijskog aspekta takođe je novijeg datuma. Pored opšteg interesa za fundamentalne probleme hemije i biohemije morskih organizama, jedan od osnovnih motiva našeg interesovanja jeste i taj što smatramo da poznavanje osnovnih karakteristika sopstvene sredine treba da čini važan elemenat naučnih delatnosti uopšte, a posebno u perspektivi racionalne eksploatacije prirodnih bogatstava.

U hemotaksonomskom pogledu, biljni i životinjski svet što živi u Jadranskom moru praktično je potpuno neispitan pa je stoga prvi cilj naših istraživanja bio utvrđivanje hemijskog sastava ekstraktata organizama tipičnih za biocenu južnog Jadrana. Hemotaksonomija morskih organizama uopšte je relativno nova oblast pa bi se iz toga moglo zaključiti da izboru organizama nije potrebno posvetiti posebnu pažnju, odnosno da je svaki podatak potreban i koristan. Naši istraživački kapaciteti, međutim, nisu bili dovoljni za potpuno i sistematsko ispitivanje potrebnog broja vrsta za stvaranje zaključaka o hemotaksonomskim karakteristikama familije, odnosno roda, na osnovu prisustva specifičnih tipova organskih jedinjenja. Stoga smo odlučili da se u izboru organizama za detaljno proučavanje rukovodimo prvenstveno rezultatima ispitivanja biološke, određeniije antimikrobne aktivnosti sirovih ekstraktata; na ovaj način stiče se uvid u »farmakološki potencijal« ispitivane vrste a istovremeno dobivaju osnovni hemotaksonomski podaci o sadržaju karakterističnih, često novih tipova organskih jedinjenja. Konačni izbor organizama vršili smo tek pošto smo utvrdili da su zadovoljeni još neki uslovi. Jedan od osnovnih uslova je taj da organizam bude dovoljno rasprostranjen i pristupačan i da je njegova taksonomska pripadnost poznata najmanje do nivoa roda, jer se samo tako mogu obezbediti reproduktivni rezultati, utvrditi uticaj sezonskih promena i ekoloških uslova na hemijski sastav i dr. Dalje sužavanje izbora izvršeno je na osnovu empirijskog zaključivanja. Naime, sa dosta osnova se može pretpostaviti da sesilni organizmi, lišeni pokretljivosti, taj svoj nedostatak u odbrambenom mehanizmu, nadoknađuju dejstvom endogenih bioloških aktivnih jedinjenja. U tom smislu, spoljašnji izgled organizma pruža izvesne indicije: čista, neobrasla površina ukazuje na to da se organizam, dejstvom biološki aktivnog jedinjenja, štiti od neželjenih predatora.

Osnovni cilj naših preliminarnih oglada bio je ispitivanje biološke aktivnosti većeg broja organizama, odnosno njihovih ekstraktata, s tim da se na osnovu navedenih kriterijuma izaberu podesni organizmi za detaljno ispitivanje i izolovanje komponenata koje su nosioci biološke aktivnosti. U tabeli 1 su navedeni organizmi i izloženi rezultati ispitivanja antimikrobnog dejstva njihovih lipidnih i vodenih ekstraktata. Vodeni ekstrakti su dobiveni ekstrakcijom po-

moću fosfatnog pufera (0.01 M, pH 6.9) i liofilizovani, dok su lipidi izolovani ekstrakcijom pomoću etil acetata na sobnoj temperaturi i ekstrakti upareni do suva. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti vršeno je na gram-pozitivnoj bakteriji. *Micrococcus luteus*, gram-negativnoj *Escherichia coli* i na gljivi *Saccharomyces cerevisiae*. Ekstrakti lipida ispitivani su metodom diskova a vodeni ekstrakti metodom otvora na pločama agara; ekstrakt koji je pokazivao definisanu zonu inhibicije u koncentraciji od 1 mg/disk, odnosno 1 mg/otvor smatran je aktivnim.

Tabela 1

EKSTRAKT	ANTIMIKROBNA AKTIVNOST					
	I vodeni ekstrakt					
	II lipidni ekstrakt					
	E. coli		M. luteus		S. cerevisiae	
	I	II	I	II	I	II
<i>Chlorophyta</i>						
1. <i>Codium bursa</i>	—	+	+	+	—	—
<i>Porifera</i>						
2. <i>Dysidea avara</i>	—	—	—	+	—	+
3. <i>Dysidea tupha</i>	—	—	—	—	—	—
4. <i>Ircinia muscarum</i>	—	?	—	?	—	?
5. <i>Ircinia dendroides</i>	?	—	?	+	?	+
6. <i>Ircinia sp.</i>	—	—	—	—	—	—
7. <i>Ircinia fasciculata</i>	—	+	+	+	—	?
8. <i>Axinella verrucosa</i>	—	—	+	—	—	—
9. <i>Axinella canabina</i>	—	—	+	—	—	—
10. <i>Axinella damicornis</i>	—	—	+	—	—	—
11. <i>Axinella polypoides</i>	—	—	+	—	—	—
12. <i>Cacospongia scalaris</i>	—	—	+	—	—	—
13. <i>Chondrilla nucula</i>	—	—	—	—	—	—
14. <i>Petrosia ficiformis</i>	—	—	—	—	—	—
15. <i>Pellina semitubulosa</i>	—	—	—	—	—	—
16. <i>Crambe crambe</i>	—	+	+	+	+	—
17. <i>Verongia aerophoba</i>	—	—	+	—	—	—
18. <i>Suberites domuncula</i>	—	—	—	—	—	—
19. <i>Chondrosia reniformis</i>	—	—	—	—	—	—
20. <i>Geodia cydonium</i>	—	—	—	—	—	—
21. <i>Tethya lyncurium</i>	—	—	—	—	—	—
22. <i>Acanthella acuta</i>	—	?	—	?	—	?
23. <i>Spongia officinalis</i>	—	?	—	?	—	?
24. <i>Cliona celata</i>	—	?	—	?	—	?
<i>Ascidacea</i>						
25. <i>Ascidia mentula</i>	?	—	?	—	?	—
26. <i>Microcosmus sulcatus</i>	—	—	—	—	—	—
27. <i>Halocynthia papillosa</i>	—	—	—	—	—	—

28. <i>Phallusia mammillata</i>	—	+	—	—	—	?
29. <i>Botryllus schlosseri</i>	—	?	—	?	—	?
30. <i>Diazona violacea</i>	—	—	—	—	—	?
31. <i>Alpidium conicum</i>	—	—	—	—	—	?
32. <i>Distoma adriaticum</i>	—	?	—	?	—	?
<i>Anthozoa</i>						
33. <i>Alcyonium palmatum</i>	—	—	+	+	+	—
34. <i>Cladocora cespitosa</i>	—	—	—	—	—	—
35. <i>Eunicella cavolinii</i>	+	—	+	—	—	—
<i>Polychaeta</i>						
36. <i>Spirographis spallanzani</i>	?	—	?	—	?	—

Rezultati u tabeli 1 ukazuju na to da je antimikrobna aktivnost češće nađena u vodenim ekstraktima, najčešće u ekstraktima sundera, nego u lipidima. Takođe se vidi da je aktivnost prvenstveno izražena prema gram-pozitivnim bakterijama ali se na osnovu ovih podataka ne mogu stvarati konačni zaključci jer je broj ispitivanih uzoraka ipak nedovoljan. Navedeni podatak se teško može porediti sa ranije objavljenim rezultatima sličnih ispitivanja antimikrobne aktivnosti jer se većina odnosi na ekstrakte lipida a manji broj na vodene ekstrakte; pouzdanih podataka o paralelnim ispitivanjima aktivnosti jednih i drugih ekstrakata, dobivenih na jedinstveni način, na većem broju mikroorganizama, praktično nema. Međutim, jedan od važnih elemenata naših, kao i ranijih rezultata je taj što je nađeno da je procenat biološki aktivnih ekstrakata morskih organizama srazmerno veliki. Prema ranijim rezultatima koji se prvenstveno odnose na proučavanje antitumorne aktivnosti (1), broj ekstrakata morskih organizama koji pokazuju citotoksičnost (11%) je znatno veći nego što je nađeno za organizme sa tla (3%), što svakako ohrabruje i opravdava dalja istraživanja u ovom pravcu.

Naši radovi usmereni su i na izolovanje biološki aktivnih jedinjenja iz sirovih ekstrakata, na osnovu rezultata navedenih u tabeli 1. Međutim, neki od navedenih organizama, kao što je to na primer veoma rasprostranjeni sunder *Verongia aerophoba*, su se pokazali kao prilično nepodesni za dalji rad. Naime, već kraćim stajanjem na vazduhu, *V. aerophoba* menja boju koja prelazi iz svetlo-žute u tamno-ljubičastu. Slična promena boja zapaža se i u sirovom ekstraktu, pri čemu dolazi i do značajnog smanjenja antimikrobne aktivnosti. Prilikom pokušaja prečišćavanja sirovog vodenog ekstrakta pod posebnim eksperimentalnim uslovima dobiveno je nekoliko aktivnih frakcija, u velikom rasponu molekulskih masa. Međutim, boja i aktivnost frakcija ostaju i dalje nepostojane. Hemijsko ispitivanje dobivenih frakcija ukazalo je na prisustvo jedinjenja melaninskog i melanoproteinskog tipa. Takođe smo utvrdili da je u sirovom ekstraktu koncentrisana velika aktivnost tirozinaze čime se može objasniti promena boje i antimikrobne aktivnosti do koje dolazi usled promena u hemijskom sastavu (oksidacija u hinoid-

ne strukture i dr.) dejstvom ovog enzima. Pokušaj inhibicije dejstva enzima u postupku izolovanja prekursora materija melaninskog tipa dovodi do gubitka antimikrobne aktivnosti.

Navedeni primer ilustruje složenost ovakvih istraživanja i istovremeno ukazuje da postojanje biološke aktivnosti u sirovom ekstraktu ne mora uvek da znači da će izolovanje definisanih, biološki aktivnih jedinjenja primenom poznatih biohemijskih metoda biti jednoznačan proces.

Ekstrakti drugih organizama koji su pokazali antimikrobno dejstvo takođe su detaljnije ispitivani. Do sada, uspeli smo da iz suđera *Disidea avara* (lipidni ekstrakt) izolujemo nosioca biološke aktivnosti, seskviterpen avarol koji su italijanski istraživači izolovali i odredili njegovu strukturu pre nekoliko godina (2). Za ovo jedinjenje hidrohinske strukture utvrdili smo da ima izraženo antimikrobno dejstvo na neke gram-pozitivne bakterije, strepto- i stafilo-koke, u koncentracijama od 5-50 mikrogram/ml. Takođe smo utvrdili da avarol inhibira rast ćelija leukemije miša. Proučavanje mehanizma delovanja avarola kao i izolovanje i karakterizacija bioloških aktivnih jedinjenja iz drugih organizama je u toku.

Autori zahvaljuju SIZ-u nauke i obrazovanja SR Crne Gore i Međunarodnom odeljenju GKSS, SR Nemačka na materijalnoj pomoći.

LITERATURA

1. Drugs & Food from The Sea, J. W. Nemanich, R. F. Theiler and L. L. Hager st. 123, izdavači P. Kaul i C. J. Sindermann, Univerzitet u Oklahomi, Norman, Oklahoma 1978.
2. S. De Rosa, L. Minale, R. Riccio, C. Sodano, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1408, 1976.