

---

LEK. SIROV.	God. XXXV	Broj 35.	Str. 89 – 101	Beograd 2015.
LEK. SIROV.	Vol. XXXV	No. 35.	Pp. 89 – 101	Belgrade 2015.

---

**Originalni naučni rad – Original scientific paper**

*Rukopis primljen: 10.3.2015.*

UDC: 615.324:593.4; 615.277

*Prihvaćen za publikovanje: 1.4.2015.*

COBISS.SR-ID 220245004

## **IN VITRO ISPITIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA SUNĐERA *ACANTHELLA ACUTA***

**Tatjana Stanojković<sup>1</sup>, Sanja Milović<sup>2</sup>, Ivana Matić<sup>1</sup>,  
Nađa Grozdanić<sup>1</sup>, Zoran Kljajić<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Pasterova 14, 11000 Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

<sup>3</sup> Institut za biologiju mora, Kotor, Dobrota, P. Fah 69 85330 Kotor, Crna Gora

### **IZVOD**

Morski organizmi a sunđeri posebno, predstavljaju značajan izvor novih jedinjenja sa dokazanim biološkim, antiproliferativnim i antitumorskim dejstvom. Sunđer *Acanthella acuta*, poreklom iz Jadranskog mora, Bokokotorski zaliv, sakupljen je sa prirodnog lokaliteta i podvrgnut ekstrakciji radi ipitivanja antitumorskog potencijala. Citotoksičnost dobijenog dihlormetan/metanolnog ekstrakta određivana je na malignim ćelijskim linijama HeLa (adenokarcinom cerviksa): i LS174 (adenokarcinom debelog creva) kao i na zdravim ćelijama MRC 5 (fetalnih fibroblasta pluća) korišćenjem kolorimetrijskog MTT testa. Ispitivani ekstrakt *Acanthella acuta* ne pokazuje citotoksično dejstvo prema normalnim MRC5 ćelijama, dok je prema malignim ćelijama HeLa ( $IC_{50}=29.51\pm 1.27\mu\text{g/ml}$ ) i LS174 ( $IC_{50}=9.92\pm 0.54\mu\text{g/ml}$ ) pokazan značajan citotoksični efekat. Takođe, *in vitro* citotoksična aktivnost udružena je sa značajnom akumulacijom ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa uz opadanje procenta ćelija u G2/M fazi, što je utvrđeno analizom ćelijskog ciklusa na protočnom citometru.

**Ključne reči:** citotoksičnost, *in vitro*, HeLa, *Acanthella acuta*, ćelijski ciklus.

### **UVOD**

Morski organizmi obuhvataju gotovo polovinu ukupnog biodiverziteta na Zemlji, a morski ekosistem je verovatno najveći izvor supstanci koje mogu biti

primenjene kao terapeutici.[1-3]. Sesilni morski beskičmenjaci kao što su sunderi, plaštaši i drugi, poseduju veliki broj biološki aktivnih sekundarnih metabolita među kojima su i neki od najzanimljivijih kandidata za razvoj lekova. [4-6]. U poslednjih nekoliko godina, otkriven je značajan broj novih metabolita sa farmakološkim osobinama poreklom iz morskih organizama a posebnu grupu čine jedinjenja koja imaju antitumorsko dejstvo. Najznačajnije grupe jedinjenja sa antikancerskim dejstvom su alkaloidi, antrahinoni, benzotijazoli, makrolidi, peptidi, sfingolipidi, steroidi, tanini, terpeni i terpenoidi [7-9]. Posebno bogat izvor strukturno novih biološki aktivnih sekundarnih metabolita su morski sunderi koji se s pravom mogu nazvati “hemijskim fabrikama” na stotine jedinstvenih jedinjenja. Sunderi su jednostavni, višćelijski, sesilni beskičmenjaci bez pravih slojeva tkiva ili organa, pokazuju citotoksično dejstvo, inhibiraju proliferaciju malignih ćelija i potencijalno su hemoterapeutici [10, 11]. Otkriveno je niz sekundarnih metabolite sundera koji su mocni P-gp inhibitori i doprinose prevazilaženju rezistentnosti (*engl. multidrug-resistant –MDR*) [12]. Tako je pokazano da sifolenol A (sipholenol A) izolovan iz sundera *Callispongia siphonella* deluje kao dobar P-gp inhibitor u malignih ćelija. Naime, sifolenol A je povećavao citotoksični efekat paklitaksela, vinblastina i kolhicina kod rezistentnih malignih ćelija [13-15]. Još jedan efikasan P-gp inhibitor sterol acetat, Agosterol A, izolovan je iz morskog sundera *Spongia* sp. [16-18] kao i kendarimid A izolovan iz sundjera *Haliclona* sp. Čiji je efekat ispitivana na rezistentnoj KB-C2 malignoj ćelijskoj liniji [19].

Interesantna grupa jedinjenja su i lamelarini, od kojih Lamelarin I izolovan iz sundera *Dendrilla cactos* ispoljava izuzetno jaču aktivnost u poređenju sa verapamilom prema LoVo malignim ćelijama rezistentnim na doksorubicin [20]. Takođe, citotoksično dejstvo ekstrakata sundera i njihovih sekundarnih metabolita pokazano je i ispitivanjima na HeLa ćelijama (ćelije kancera cerviksa): HCT-116 ćelijama (kancer kolona) za sunder *Hyrtios erecta* [21]. Ekstrakt istog sundera, *Hyrtios erecta* pokazao je zatim i na MCF-7 (kancer dojke): Hep-2 (kancer laringa) malignim ćelijama veoma dobro citotoksično dejstvo istovremeno, prema normalnim Vero ćelijama nije bilo značajnog detektovanog efekta [22]. Međutim, antikancerska svojstva sundera *Acanthella acuta* poreklom iz Jadranskog mora, Bokokotorski zaliv, do sada nisu ispitivana, i ovo je prva studija sa podacima ove vrste. Cilj ovog rada je ispitivanje antitumorskog dejstva ekstrakta sundera *Acanthella acuta* na malignim ćelijama *in vitro*.

## MATERIJAL I METODE

### Priprema biljnog materijala

Sirovi uzorci *Acanthella acuta* (*phylum Porifera*) sakupljeni su iz Jadranskog mora, Bokokotorski zaliv, u novembru 2012. godine. Nakon sakupljanja, uzorci su oprani morskom vodom u cilju uklanjanja peska, sedimenta i

morskih organizama. Uzorci sundera sortirani su u plastične kese i zamrznuti. Nakon odmrzavanja, svaki uzorak sundera je dobro ispran destilovanom vodom u cilju uklanjanja soli i nečistoća. Sirov biljni materijal je potom sušen na vazduhu u periodu od nedelju dana. Osušeni uzorci sundera su sprášeni električnim mlinom i odmah korišćeni za dobijanje ekstrakata.

#### **Priprema ekstrakta**

Sprašeni uzorci sundera su ekstrahovani procesom hladne maceracije u trajanju od 48 h, uz periodično mešanje. Kao sredstvo za ekstrakciju je korišćena smeša rastvarača: dihlormetan/metanol (1:1). Odnos uzorka i sredstva za ekstrakciju je bio 1:5 (m/V). Dobijeni tečni ekstrakti su filtrirani preko poroznog celuloznog filtra i upareni na vakum uparivaču na 40 °C radi dobijanja suvih ekstrakata.



**Slika 1.** *Acanthella acuta*

**Picture 1.** *Acanthella acuta*

#### **Ćelijske linije**

Antitumorsko dejstvo ekstrakta *Acanthella acuta* ispitivano je na sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa): i LS174

(adenokarcinom debelog creva) kao i na zdravim ćelijama MRC 5 (fetalnih fibroblasta pluća). Sve pomenute ćelijske linije su nabavljene od ustanove American Type Culture Collection (Manassas, VA, Sjedinjene Američke Države).

Ciljne, adherentne ćelijske linije su održavane u kulturi u vidu monosloja u kompletnom hranljivom medijumu. Kompletni hranljivi medijum predstavlja RPMI 1640, pH 7.2, u koji se dodaje 10% serum fetalnog govečeta (FBS, engl. fetal bovine serum): termički inaktivisan tokom 30 minuta na 56°C, L-glutamin (3 mM): streptomycin (100 µg/ml): penicilin (100 IU/ml) i HEPES (25 mM). Ćelijske kulture su gajene u inkubatoru na temperaturi od 37°C, u atmosferi vazduha obogaćenim 5% CO<sub>2</sub> i zasićenim vodenom parom.

Reagensi za održavanje ćelijskih kultura: RPMI 1640, DMEM, FBS, L-glutamin i HEPES su proizvodi kompanije PAA (Pasching, Austrija). Antibiotici koji su dodavani u medijum su nabavljeni od kompanije Galenika a.d. (Beograd, Srbija).

#### **Tretman ćelijskih linija**

Ispitivani ekstrakt *Acanthella acuta* je najpre rastvoren u dimetil sulfoksidu (DMSO): do štok koncentracije od 20mg/ml. Nakon toga, ekstrakt je u hranljivom medijumu razblažen do odgovarajućih radnih koncentracija. U testovima za određivanje ćelijskog preživljavanja (MTT test) [23,24] korišćene su mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Nunc, Nalgene, Danska). Ćelije su ravnomerno zasejavane u odgovarajućoj gustini. Gustina HeLa ćelija je bila 2000 ćelija po bunariću u 100µl podloge, LS 174 ćelija 7000 ćelija po bunariću u 100µl podloge, a gustina MRC5 ćelija 5000 ćelija po bunariću u 100µl podloge; kao slepa proba korišćen je hranljivi medijum. 24 časa nakon zasejavanja ćelija, u bunariće sa malignim ćelijama kao i u odgovarajuće slepe probe, dodato je po 50 µl pet različitih koncentracija ispitivanog ekstrakta, a na kontrolne ćelije i slepe probe, dodato je po 50 µl svežeg hranljivog medijuma. Finalne koncentracije ekstrakta primenjene na ciljne ćelije bile su: 100, 50, 25, 12.5, i 6.25 µg/ml. Ćelije su inkubirane 72h u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37°C. Nakon inkubacije, u svaki bunarić je dodato po 20µl MTT rastvora (5mgMTT/ml PBS): a 4h kasnije je dodato 100 µl rastvora 10% SDSa. Sledećeg dana, absorbanca je merena na 570nm na ELISA čitaču. U eksperimentu je praćen citotoksični efekat ispitivanog ekstrakta odnosu na kontrolnu grupu ciljnih ćelija raslih u svežem medijumu. Ćelijsko preživljavanje je izračunato tako što se absorbanca uzoraka sa tretiranim ćelijama (At): oduzima od absorbance uzoraka sa slepom probom, (As): pomnoži sa sto, i na kraju podeli sa absorbancom kontrole, (AK-As).

$$S (\%) = (At-As) \times 100 / (Ak-As)$$

IC<sub>50</sub> koncentracija se definiše kao koncentracija agensa koja za 50 % inhibiše ćelijsko preživljavanje u odnosu na netretiranu kontrolu.

### **Morfološke promene**

Morfološke promene nastale kao efekat dejstva ispitivanog ekstrakta na HeLa i LS174 maligne ćelije praćen je invertnim svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss).

### **Analiza faza ćelijskog ciklusa**

Dejstvo ekstrakta na promenu u distribuciji ciljnih HeLa ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa ispitano je analizom na protočnom citometru [25].

HeLa ćelije (3 x 10<sup>5</sup> ćelija) su gajene u hranjivom medijumu u six well plejtu tokom 24 h inkubacije u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Nakon toga, adherentne ćelije su u eksponencijalnoj fazi rasta izložene dejstvu ekstrakta u koncentraciji od IC<sub>50</sub> određenom korišćenjem MTT testa. Ćelije su inkubirane u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37 °C, u hranjivom medijumu sa ili bez ispitivanog ekstrakta, kontinuirano, 24 h, 48 h i 72 h. Nakon svake tačke inkubacije, ćelije su posmatrane pod svetlosnim mikroskopom, prikupljene u epruvetu i po potrebi tripsinizirane, a zatim centrifugirane na 2000 rpm, 10 min. Talog ćelija je resuspendovan i ispran u fosfatnom puferu (PBS)-u.

Talog analiziranih ćelija, (dobijen iz predhodnog ispiranja) resuspendovan je u 200 µl PBS-a i fiksiran sa 2 ml ledenog 70 % etanola uz mešanje na vorteksu. Ćelije se inkubiraju u etanolu i na ledu minimalno 30 min, a tako pripremljeni uzorci mogu se čuvati nedelju dana pre bojenja i analize na protočnom citometru. Nakon fiksacije, ćelije se još jednom ispiraju u PBS-u, supernatant se odlije, a talog resuspenduje u 800µl PBS-a. Zatim se uzorci inkubiraju 30 min na 37 °C u prisustvu 100 µl rastvora RNaze A (koncentracije 1mg / ml). Na kraju, nakon tretmana RNazom A, u uzorak se dodaje 100 µl rastvora propidijum jodida (PI) koncentracije 400 µg/ml. Obojena suspenzija ćelija, predhodno promućkana na vorteksu, analizira se na protočnom citometru. Analiza ćelijskog ciklusa i DNK sadržaja urađena je na protočnom citometru (Becton Dickinson FAC-Scan flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA): a DNK histogram je analiziran korišćenjem CellQuestR softvera, za minimum 10000 ćelija po uzorku.

## **REZULTATI I DISKUSIJA**

### ***In vitro* citotoksična aktivnost ekstrakta suđera *Acanthella acuta***

Ispitana je citotoksična aktivnost ekstrakta *Acanthella acuta* prema ciljnim malignim ćelijama (HeLa i LS174 ćelije) kao i prema normalnim MRC5 ćelijama *in vitro*. Rezultati ovih eksperimenata su prikazani u Tabeli 1., kao IC<sub>50</sub> vrednosti (koncentracija ekstrakta koja dovodi do smanjenja preživljavanja malignih ćelija za 50 %) određene MTT testom pri kontinuiranom dejstvu ekstrakta nakon 72 h inkubacije.

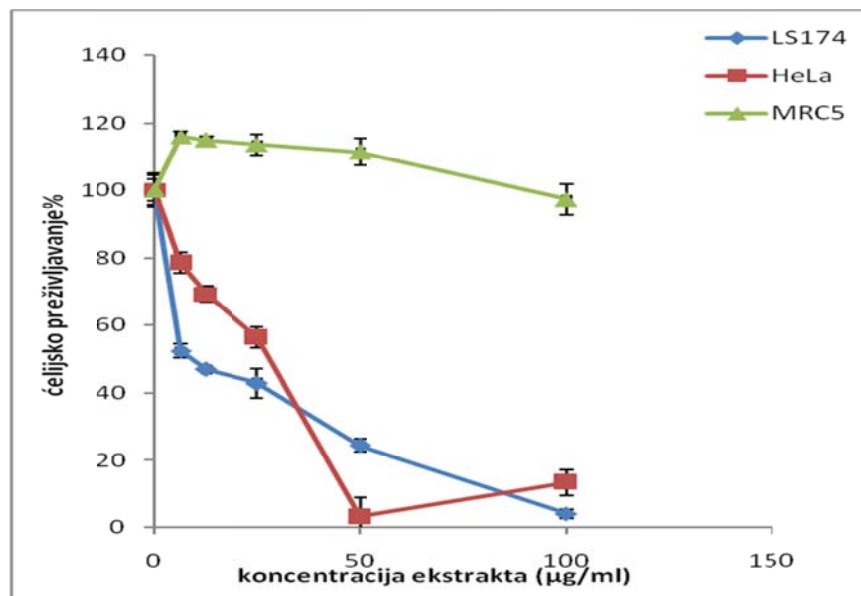
**Tabela 1.** Citotoksični efekat ekstrakta *Acanthella acuta* na HeLa, LS174 i MRC5 ćelije  
**Table 1.** Cytotoxic effects of *Acanthella acuta* extract on HeLa, LS174 and MRC-5 cells

Ekstrakt* Extract*	HeLa	LS174	MRC-5
	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
<i>Acanthella acuta</i>	29.51±1.27	9.92±0.54	>200

\* Koncentracija ispitivanog ekstrakta koji dovodi do 50 % smanjenja preživljavanja HeLa, LS174 i MRC-5 ćelija ( izražen kao IC<sub>50</sub>, µg/ml ± S.D.) *Acanthella acuta* ekstrakt je inkubiran sa ćelijama tokom 72 h.

\* Concentrations of examined extract that induced a 50 % decrease in HeLa, LS174 and MRC-5 cell survival (expressed as IC<sub>50</sub>, µg/ml ± S.D.). *Acanthella acuta* extract was incubated with cells for 72 h.

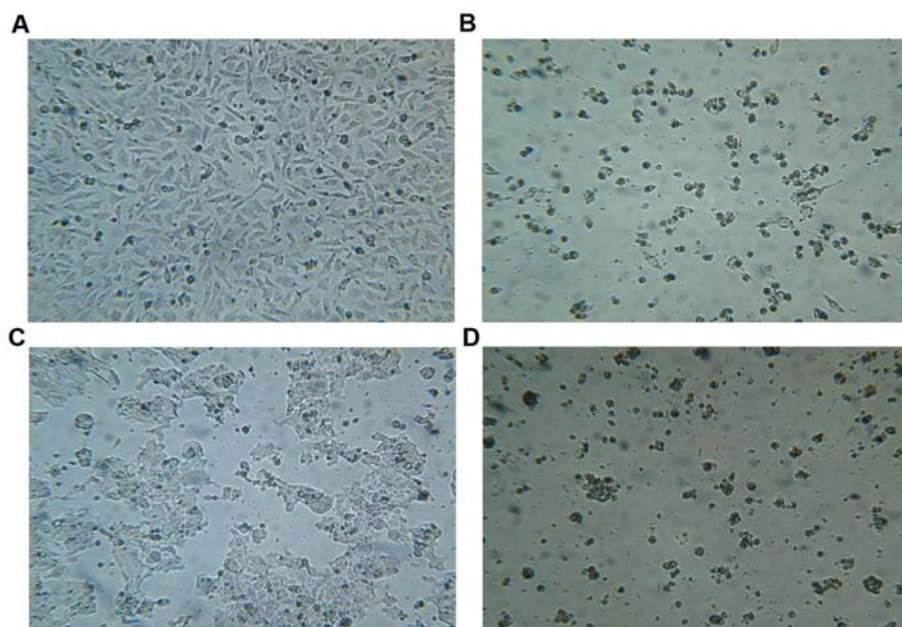
Testirani ekstrakt je ispoljio selektivno dozno-zavisno citotoksično dejstvo prema malignim ćelijskim linijama. Efekat na preživljavanje ciljnih ćelija koje su tretirane ispitivanim ekstraktom predstavljen je na Slici 2.



**Slika 2.** Grafik preživljavanja ciljnih malignih ćelija (%) u funkciji koncentracije ekstrakta *Acanthella acuta* (µg/ml).

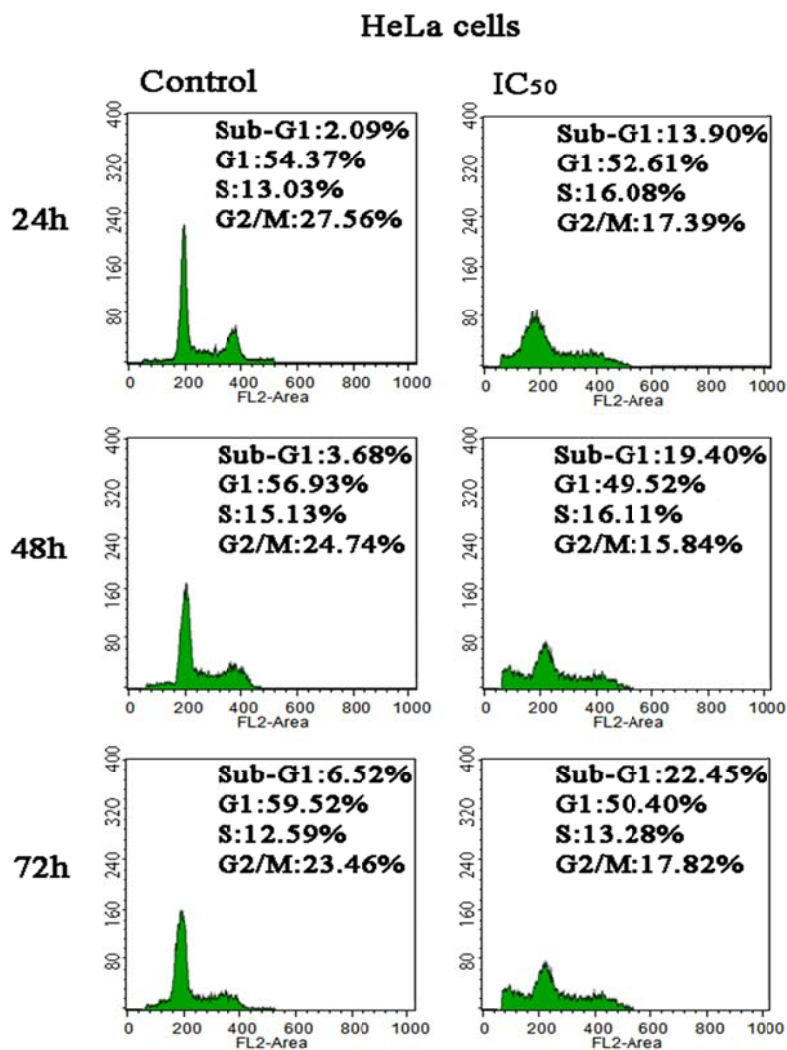
**Picture 2.** Survival of malignant cells (%) as a function of the concentration of the extract *Acanthella acuta* (mg / ml).

Dobijeni rezultati pokazuju da ekstrakt sundera *Acanthella acuta* pokazuje značajnu citotoksičnu aktivnost prema testiranim malignim ćelijama *in vitro*. Nasuprot, ispitivani ekstrakt nije pokazao citotoksično dejstvo prema normalnim MRC5 ćelijama ( $IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$ ). Ukoliko se posmatra osetljivost malignih ćelijskih linija na citotoksično dejstvo ekstrakta, potrebno je da se istakne da su LS174 ćelije adenokarcinoma debelog creva bile značajno, i do tri puta osetljivije na citotoksičnost ekstrakta u odnosu na osetljivost humanih ćelija adenokarcinoma cerviksa HeLa ćelija. Dobijeni rezultati su u skladu sa do sada publikovanim podacima. Naime, u poslednjih desetak godina raste broj publikacija koje se odnose na ispitivanje citotoksičnog efekta ekstrakata i izolovanih jedinjenja poreklom iz sundera. Tako, pokazana je značajna citotoksičnost metanolnog i dihlarmetanolnog ekstrakta sundera *Neopetrosia* prema HeLa ćelijama [26].



**Slika 3.** Svetlosna mikroskopija HeLa i LS174 ćelija inkubiranih 72h u prisustvu ili odsustvu 100 $\mu\text{g/ml}$  ekstrakta: A) kontrola HeLa; B) *A. acuta* tretman HeLa ćelija; C) kontrola LS174; D) *A. acuta* tretman LS174 ćelija (uvećanje 12.5X, 1.6X, 6.3/0.2).

**Figure 3.** Light microscopy of HeLa cells incubated LS174 and 72h in the presence of or absence of 100 mg / ml of extract: A) HeLa control; B) *A. acuta* treatment of HeLa cells; C) control LS174; D) *A. acuta* treatment LS174 cells (magnification 12.5X, 1.6X, 6.3/0.2).



**Slika 4.** Efekat ekstrakta *Acanthella acuta* na distribuciju ćelijskog ciklusa. HeLa ćelije su inkubirane 24 h, 48 h i 72 h u prisustvu ili odsustvu ekstrakta (IC<sub>50</sub> µg/ml) i pripremljene za analizu faza ćelijskog ciklusa protočnim citometrom.

**Figure 4.** The effect of the extract *Acanthella acuta* on the distribution of the cell cycle. HeLa cells were incubated for 24, 48 and 72 h in the presence or absence of the extract (IC<sub>50</sub> µg/ml) and prepared to analyze the phase of cell cycle flow cytometry.



Isto tako, heksanski i etil acetatni ekstrakti sundera *Jaspis diastra* ispoljavaju citotoksično dejstvo prema HeLa ćelijama, indukujući apoptozu što je pokazano protočnom citometrijom [27]. Takođe, jedna ranija studija [28], bavi se ispitivanjem citotoksičnog dejstva 22 vrste sundera poreklom sa obala Brazila na malignim HL-60, HCT-8, MDAMB435, i SF-295 ćelijama. Pokazano je da sunderi *Agelas clathrodes*, *Agelas* sp., *Dictyonella* sp., *Hyattella intestinalis*, *Aplysina muricyana*, *Amphimedon compressa*, *Geodia corticostylifera* i *Monanchora arbuscula* ispoljavaju od umerene do veoma značajne citotoksične aktivnosti (IC<sub>50</sub> u rangu od 85.46 do 1.56 µg/ml).

#### **Analiza promena u distribuciji faza ćelijskog ciklusa**

Analiziran je efekat ekstrakta na promene ćelijskog ciklusa ciljnih malignih ćelija. Efekat sundera *Acanthella acuta* praćen je nakon kontinuiranog tretmana ćelija odgovarajućim koncentracijama ekstrakta. Na Slici 4. prikazana je distribucija faza ćelijskog ciklusa HeLa ćelija nakon 24 h, 48 h i 72 h inkubacije pri koncentraciji IC<sub>50</sub> ispitivanog ekstrakta. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da testirani ekstrakt primenjen pri koncentraciji IC<sub>50</sub> dovodi do vremenski-zavisnog povećanja procenta ciljnih HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa. Već nakon 24 h dejstva dolazi do vidljivog povećanja procenta ciljnih HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na procenat kontrolnog uzorka HeLa ćelija u subG1 fazi. Nakon 48 h i 72 h inkubacije analizirani ekstrakt i dalje snažno indukuje nagomilavanje ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa i recipročno opadanje ćelija u G2/M fazi u populaciji HeLa ćelija. Promene u distribuciji ćelijskog ciklusa, ukazuju da ekstrakt *Acanthella acuta* indukuje apoptozu u ciljnim HeLa ćelijama. Naši rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima; naime, pojedini sunderi dovode do apoptotskih promena u distribuciji ćelijskog ciklusa i značajnog nagomilavanja ćelija u subG1 fazi [29,30].

### **ZAKLJUČAK**

Uporednom analizom citotoksičnog efekata, morfoloških promena i ćelijskog ciklusa, stiče se uvid u antitumorsko dejstvo ekstrakta sundera *Acanthella acuta*. Zaključujemo da analizirani ekstrakt pokazuje citotoksični efekat prema ciljnim malignim ćelijama. Takođe, naši rezultati potvrđuju da ispitivani ekstrakt poseduje značajan antitumorski potencijal zahvaljujući selektivnom i izraženom citotoksičnom i proapoptotskom dejstvu prema malignim ćelijama u odnosu na normalne ćelije, što ga svrstava u red kandidata za dalja ispitivanja. Dalja istraživanja sundera *Acanthella acuta* zahtevaju pre svega izolaciju do čistih jedinjenja, dalje rasvetljavanje i karakterizaciju jedinjenja koja su odgovorna za biološko dejstvo, a potom i prekliničke studije antitumorskog dejstva. Na kraju,

verujemo da su sunderi svakako bogat izvor antikancerskih supstanci, a dobijeni preliminarni podaci ukazuju na obećavajući potencijal sundera *Acanthella acuta*.

## ZAHVALNICA

Rad predstavlja deo rezultata istraživanja u okviru Projekta OI 175011 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kao i projekta Ministarstva nauke Republike Crne Gore.

## LITERATURA

1. C.K. Angerhofer, J.M. Pezzuto, G.M. König, A.D. Wright, O. Stichter (1992): Antimalarial activity of sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella klethra*. *J. Nat. Prod.*, **55**: 1787–1789.
2. R.P. Bergquist (1978): *Sponges*. University of California Press. Berkeley.
3. M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, **2**(1): 48–58.
4. J.W. Blunt, B.R. Copp, R.A. Keyzers, M.H.G. Munro, M.R. Prinsep (2013): Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **30**: 237–323.
5. J.W. Blunt, B.R. Copp, R.A. Keyzers, M.H.G. Munro, M.R. Prinsep (2014): Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **31**: 160–258.
6. M. Laport, O. Santos, G. Muricy (2009): Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs, *Curr. Pharma. Biotechnol*, **10**: 86–105.
7. H. Miyaoka, S. Nishijima, H. Mitome, Y.J. Yamada (2000): Three new scalarane sesterterpenoids from the Okinawan sponge *Hyrtios erectus*. *Nat. Prod.*, **63**: 1369.
8. K. Chairman, A.J.A. Ranjit Singh, G. Alagumuthu (2012): Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **2**(3): 234–238.
9. C. Chakraborty, C.H. Hsu, Z.H. Wen, C.S. Lin (2019): Anticancer drugs discovery and development from marine organism. *Curr Top Med Chem.*, **9**(16): 1536–45.
10. D. Lopez, S. Martinez-Luis (2014): Marine natural products with P-glycoprotein inhibitor properties. *Mar Drugs*, **22**(12): 525–46.
11. A.M.S. Mayer, K.B. Glaser (2013): Marine Pharmacology and the Marine Pharmaceuticals Pipeline. *The FASEB Journal*, **27**: 1167.7.
12. I. Abraham, K. El Sayed, Z. S. Chen, H. Guo (2012): Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance. *Mar Drugs*, **10**(10): 2312–21.

13. I. Abraham, K. El Sayed, Z.C. Chen, and H. Guo (2012): Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance. *Mar Drugs*, **10**(10): 2312–2321.
14. Z. Shi, S. Jain, I.W.Kim X.X. Peng, I. Abraham, D.T.A. Youssef, L.W. Fu, K. El Sayed, S.V. Ambudkar, Z. S. Chen, (2007): Siphonolol A, a marine-derived siphonolane triterpene, potently reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Science*, **98**(9):1373–1380.
15. D. Lopez, S.M. Luis (2014): Marine natural products with P-Glycoprotein inhibitor properties. *Mar Drugs*, **12**(1):525–546.
16. S. Aoki, Z.S. Chen, K. Higasiyama, A. Setiawan, S. Akiyama, M. Kobayashi (2001): Reversing effect of agosterol A, a spongean sterol acetate, on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res.*, **92**(8): 886-95.
17. Z.S. Chen, S.Aoki, M. Komatsu, K. Ueda, T. Sumizawa, T. Furukawa, H. Okumura, X.Q. Ren, M.G. Belinsky, K. Lee, G.D. Kruh, M. Kobayashi, S. I. Akiyama (2001): Reversal of drug resistance mediated by multidrug resistance protein (MRP) 1 by dual effects of agosterol a on MRP1 function. *International Journal of Cancer*, **93**(1):107–113.
18. S. Aoki, L.W. Cao, K. Matsui, R. Rachmat, S. Akiyama, M. Kobayashi (2004): Kendarimide A, a novel peptide reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells, from a marine sponge of *Haliclona* sp. *Tetrahedron*, **60**: 7053 – 7059.
19. S. Aoki, L. Cao, K. Matsui, R. Rachmat, S.I. Akiyama, M. Kobayashi (2004): Kendarimide A, a novel peptide reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells, from a marine sponge of *Haliclona* sp. *Chem Inform*, **60**(33): 7053-7059.
20. A.R. Quesada, M.D. García Grávalos, J.L. Fernández Puentes (1996): Polyaromatic alkaloids from marine invertebrates as cytotoxic compounds and inhibitors of multidrug resistance caused by P-glycoprotein. *Br J Cancer*, **74**(5): 677-82.
21. M.A. Ashour, E.S. Elkhayat, E. Rainer, R.A.Edrada (2007): Indole alkaloid from the Red Sea sponge *Hyrtios erectus*. *ARIKVOC*, **15**: 225-231.
22. M. Ramachandran, I. Titus, P.M. Backyavathy, B. Nambikkairaj (2013): *In vitro* determination of marine sponge *Hyrtios erectus* secondary metabolite effect against human breast and larynx cancer cell lines. *International Journal of Current Research*, **5**(2): 124-128.
23. T. Mosmann (1983): *J. Immunol. Methods*, **65**: 55-63.
24. M. Ohno, T. Abe (1991): *J. Immunol. Methods*, **145**: 199-203.
25. R. H. Clothier (1995): *Methods Mol. Biol.*, **43**: 109-118.
26. A. Narasimharaju, L.H. Thameemulansari, C. Uma Maheswara (2012): Cytotoxic activity of methanol and dichloromethane extracts from marine

- sponges. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, **4**(3): 277-279.
27. G. Beedessee, A. Ramanjooloo, I. Tiscornia, T. Cresteil, S. Raghothama, D. Arya, S. Rao, K.H. Gowd, M. Bollati-Fogolin, D.E. Marie (2014): Evaluation of hexane and ethyl acetate extracts of the sponge *Jaspis diastra* collected from Mauritius Waters on HeLa cells. J Pharm Pharmacol, **66**(9): 1317-27.
  28. E.G. Ferreira, D.V. Wilke, P. C. Jimenez, et al. (2007): Cytotoxic activity of hydroethanolic extracts of sponges (Porifera) collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park, Ceará State, Brazil, Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability, 313-318.
  29. J.W. Brown, S. Cappell, C. Perez-Stable, L.M. Fishman (2004): Extracts from two marine sponges lower cyclin B1 levels, cause a G2/M cell cycle block and trigger apoptosis in SW-13 human adrenal carcinoma cells. Toxicol, **1**(43): 841-846.
  30. F.M.D. Márquez, L.M.E. Acosta, F.M.E. Márquez, M.A. Martínez, F.E.J. Márquez, G.M. Camargo (2012): Effect of extracts from the calcareous sponge *Leucetta aff. floridana* on the cell cycle of leukemoid cell lines. Rev Cubana Farm., **46**(4): 436-445.

**IN VITRO ANTITUMORAL ACTIVITY OF THE EXTRACT OF  
SPONGE *ACANTHELLA ACUTA***

**Tatjana Stanojković<sup>1</sup>, Sanja Milović<sup>2</sup>, Ivana Matić<sup>1</sup>,  
Nađa Grozdanić<sup>1</sup>, Zoran Kljajić<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Institute for Oncology and Radiology of Serbia Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Institute of Marine Biology Kotor, Dobrota bb, 85 330 Kotor, Montenegro

**SUMMARY**

Seaweeds are an excellent source of compounds with biological activity. Particularly interesting are the sponges, which suited in medicine reaches into the distant past. The biological effects of extracts and new compounds from sponges have been reported in numbers of scientific papers. Sponges produce a plethora of chemical compounds with widely varying carbon skeletons, which have been found to interfere with pathogenesis at many different points. Due to this, sponges have the potential to provide future drugs against important diseases, such as cancer. All of this makes them particularly interesting to examine the antitumor activity. In this paper for the first time presented a data of investigations of antitumor activity of extract of sponge *Acanthella acuta*, *in vitro*. Crude samples of *Acanthella acuta* (phylum Porifera) were collected from the natural locality in Adriatic Sea, the Bay of Kotor, and subjected to extraction. After that, we examined the cytotoxicity and cell cycle distribution of dichloromethane/methanol (1:1) extract of *Acanthella acuta*, on two human malignant cell lines, human cervix carcinoma (HeLa) and human colon carcinoma (LS174): and also a normal fetal lung fibroblast cell line (MRC5). The IC<sub>50</sub> values in the MTT assay in LS174 and HeLa cells were ranged from 9.92±0.54 to 29.51±µg/ml. Moreover, cytotoxic activity of *Acanthella acuta* extract on normal MRC5 cells was not observed. Cell cycle distribution was quantified by flow cytometry. *In vitro* antitumor activities was accompanied by an important subG1 accumulation of HeLa cells after treatment of tested cell lines with extract.

**Key words:** HeLa cells, *Acanthella acuta*, cytotoxic activity, MTT assay, cell cycle.