

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Rok KOSMINA

**BIOLOŠKA AKTIVNOST V ETANOLNIH IZVLEČKIH IZBRANIH
ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV (*Porifera*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ETHANOLIC EXTRACTS FROM
SELECTED ANTARCTICAL MARINE SPONGES (*Porifera*)**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Raziskave so bile opravljene na Katedri za biokemijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za recenzenta prof. dr. Toma Turka, za predsednika komisije pa doc. dr. Polono Zalar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Polona Zalar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rok Kosmina

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 577:591 (043.2)=163.6
- KG morske spužve / biološko aktivne snovi /sekundarni metaboliti / hemolitična aktivnost / inhibicija encima acetilholinesteraze / protibakterijska aktivnost
- AV KOSMINA, Rok
- SA SEPČIĆ, Kristina – mentorica
- KZ SI-1000 Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2012
- IN BIOLOŠKA AKTIVNOST V ETANOLNIH IZVLEČKIH NEKATERIH ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV (*PORIFERA*)
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP X, 44 str., 19 sl., 6 pregl., 76 vir.
- IJ sl.
- JI sl/an.
- AI Morske spužve (*Porifera*) so izjemno bogat vir različnih bioaktivnih spojin, predvsem zaradi sekundarnih metabolitov, ki kažejo številne biološke učinke. Te snovi uporabljajo kot zaščito pred plenilci, za teritorialno kompeticijo ali za preprečevanje naseljevanja drugih organizmov na njihovo površino. Ravno zato so potencialno uporabne v farmacevtski industriji ter številnih drugih panogah. Namen diplomskega dela je bil testirati biološko aktivnost etanolnih izvlečkov izbranih liofiliziranih spužev, ker pa je bilo že veliko raziskav opravljenih na tropskih vrstah, smo se osredotočili na antarktične spužve. Uporabljeni testi so bili test hemolize, inhibicija encima acetilholinesteraze, testiranje inhibicije rast izbranih morskih bakterijskih sevov in sevov iz ledenika. Po opravljenih testih je hemolitično aktivnost kazalo 11 izvlečkov, po dodatnih redčenjih pa so izvlečki spužve *Latrunculia* še vedno imeli močno hemolitično aktivnost. Prav tako so proti encimu acetilholinesterazi po dodatnih redčenjih najbolj inhibitorno delovala le še vzorca spužve *Latrunculia* ter *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*. V protibakterijskih testih sta najmočnejšo inhibicijo na morske bakterijske seve kazala vzorec spužve *Latrunculia* ter *Hemigelius bidens*. Pri inhibiciji bakterij izoliranih iz ledu ni nobeden izvleček kazal aktivnosti, razen proti enem sevu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 577:591 (043.2)=163.6
- CX Marine sponges / biologically active compounds / secondary metabolites / hemolytic activity / inhibition of acetylcholinesterase / antibacterial activity /
- AU KOSMINA, Rok
- AA SEPČIĆ, Kristina – supervisor
- PP SI-1000 Ljubljana, večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
- PY 2012
- TI BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ETHANOLIC EXTRACTS FROM SELECTED ANTARCTICAL MARINE SPONGES (*PORIFERA*)
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO X, 44 p., 19 fig., 6 tab., 76 ref.
- LA sl.
- AL sl/en.
- AB Marine sponges (*Porifera*) are a very rich source of natural products. There are various secondary metabolites among them which have already shown different types of biological activities. These compounds are mostly used as a protection against predators, for the territorial competition or as a way of disabling the settlement of other microorganisms on their surface. These properties make sponges extracts very useful as natural bioactive compounds could find their application in different fields, especially in the pharmaceutical industry. The objective of this graduation thesis was to test the biological activity of ethanol extracts of selected freeze-dried sponges. Since there were already several studies run on tropical species, we focused here on the Antarctic ones. We tested the hemolytic activity, inhibition of acetylcholinesterase and inhibition of selected bacteria isolated from the ice and the sea. Extracts from 11 samples showed hemolytic activity, including the ones from sponge *Latrunculia* which showed strong hemolytic activity even after additional dilution. Sponge extracts from *Latrunculia* and *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* were again the strongest at inhibiting acetylcholinesterases after additional dilutions. The strongest inhibition of the growth of the sea bacteria was noted by *Latrunculia* and *Hemigelius bidens*. Extracts were not showing any activity against bacteria isolated from the ice, except for one of them.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1. UVOD.....	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE	2
2. PREGLED OBJAV.....	3
2.1 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV.....	3
2.2 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI SPUŽEV	3
2.3 BIOLOŠKO AKTIVNE NARAVNE SPOJINE.....	4
2.3.1 Biološko aktivne spojine iz morskih spužev	5
2.3.2 Glavni predstavniki biološko aktivnih produktov iz morskih spužev.....	5
2.3.3 Biološko aktivne spojine iz polarnih spužev.....	8
3. MATERIAL IN METODE	9
3.1 MATERIAL.....	9
3.1.1 Vzorci spužev	9
3.1.2 Priprava organskih izvlečkov	13
3.1.3 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih.....	13
3.2 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI.....	14
3.2.1 Hemolitični test	14

3.2.2	Test inhibicije acetilholinesteraze	15
3.2.3	Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju	15
4.	REZULTATI.....	17
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V IZVLEČKIH	17
4.2	HEMOLITIČNA AKTIVNOST.....	18
4.3	ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST	24
4.4	PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	25
5.	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	31
5.2	SKLEPI	36
6.	VIRI.....	37

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Oznake vzorcev in vrste spužev	9
Preglednica 2: Suhe mase vzorcev spužev	12
Preglednica 3: Koncentracije suhe snovi v etanolnih izvlečkih spužev.....	17
Preglednica 4: Protibakterijska aktivnost etanolnih izvlečkov spužev in bakterijskih sevov iz morja.....	26
Preglednica 5: Protibakterijska aktivnost etanolnih izvlečkov spužev in bakterijskih sevov iz ledenika	28
Preglednica 6: Približne minimalne koncentracije etanolnih izvlečkov spužev in bakterijskih sevov iz morja in ledenika.....	29

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Rossella</i> cf. <i>nuda</i>	10
Slika 2: <i>Rossella</i> cf. <i>vanhoeffeni</i>	11
Slika 3: <i>Rossella</i> <i>racovitzae</i>	11
Slika 4: <i>Hemigelius</i> <i>bidens</i>	11
Slika 5: <i>Bathydorus</i> sp.	11
Slika 6: <i>Isodictya</i> <i>toxophila</i>	11
Slika 7: <i>Tetillia</i> sp.	11
Slika 8: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 10 (neidentificirana spužva 1)..	19
Slika 9: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 34 (<i>Rossella</i> sp.).....	19
Slika 10: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 45h (<i>Halichondria</i> <i>osculum</i>)....	20
Slika 11: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 48/1 (<i>Xestospongia</i> sp.)..	20
Slika 12: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 167 (<i>Rossella</i> sp.).....	21
Slika 13: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 8 (<i>Bathydorus</i> sp.).....	21
Slika 14: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 27 (<i>Chinachyra</i> sp.)	22
Slika 15: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 41 (Microcionidae.)	22
Slika 16: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 55 (<i>Tetillia</i> sp.).....	23
Slika 17: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 124 (Demospongiae).....	23
Slika 18: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 46 (<i>Lantrunculia</i> sp.)..	24
Slika 19: Antiholinesterazna aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 37L (<i>Lantrunculia</i> cf. <i>lendenfeldi</i>) in vzorca 46 (<i>Lantrunculia</i> sp.).....	26

KAZALO PRILOG

Priloga A: Pregled objav

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANDEEP - SYSTCO	Antarctic deep - sea biodiversity: colonisation history and recent community patterns - system coupling
Ara-C	1- β -D-arabinofuranozil citozin
Ara-A	1- β -D-arabinofuranozil adenin
AChE	Acetilholinesetraza
DNA	Deoksiribonikleinska kislina
HIV	Humani imunodeficientni virus
PKE	Pepton - kvasni ekstrakt
HSV	Herpes simplex virus
TRIS-HCl	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol-hidroklorid
t ₅₀	Polovični čas hemolize
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
EE	Encimske enote

1. UVOD

Rastline in mikroorganizmi so vrsto let veljali za najbolj pomembne vire biološko aktivnih naravnih produktov. Vendar v primerjavi z zemeljskimi ekosistemi, kjer živijo predstavniki 17 od 36 debel živiljenja, živijo v morjih predstavniki iz kar 34 debel, zaradi česar so morski ekosistemi resnično naša zadnja meja preučevanja genetske in biotehnološke raznolikosti (Fenical., 2006). Morje in oceani pokrivajo veliko večino našega planeta in ponujajo z vso svojo prostranostjo ogromno biološko in kemično diverzitetu, ki jo človeštvo že desetletja izkorišča v svoj prid v različnih panogah. Ta diverzitetu je skoncentrirana pretežno na obalen pas, kjer tudi živi večina organizmov. Tu obstaja veliko vrst, ki sobiva v prostorsko omejenem okolju. Sesične makroskopske živali - med njimi tudi spužve, so tako v neprestani kompeticiji za različne ekološke niše.

Morske spužve in z njimi povezani mikroorganizmi so velika in raznovrstna zakladnica biološko aktivnih snovi. 37% od približno 10.000 do sedaj odkritih biološko aktivnih snovi iz morskih organizmov izvira iz spužev. Razlog za to je, da je zaradi njihovega sesilnega načina življenja, kemična obramba njihov edini odgovor na stresne dejavnike okolja, med katere spadajo boj za prostor, obramba pred plenilci ter obramba pred patogeni (Sepčić, 2008). Spužve proizvajajo in izločajo vrsto biološko aktivnih snovi, ki jih rabijo za preživetje. Te snovi večinoma spadajo v skupino sekundarnih metabolitov, ki vključujejo molekule kot so terpenoidi, alkaloidi, poliketidi, peptidi, sladkorji, steroidi ter drugi metaboliti (Simmons in sod., 2005). Omenjene naravne produkte organizmi pogosto sproščajo v vodo, kjer se takoj razredčijo. Zaradi tega morajo biti te snovi zelo učinkovite tudi v izredno nizkih koncentracijah, da imajo željen učinek (Haefner, 2003).

Ravno zaradi velikega števila biološko aktivnih snovi ter njihovega širokega spektra delovanja, smo se odločili raziskati nekaj vrst antarktičnih morskih spužev, v upanju, da bi v njih našli nove in potencialno uporabne biološko aktivne snovi. Na naš oddelek smo prejeli pošiljko 33 liofiliziranih vzorcev spužev, ki so jih nabrali med leti 2007 – 2008 v antarktičnih morjih v okviru projekta SYSTCO – ANDEEP. Osredotočili smo se na etanolne izvlečke prejetih spužev, katere smo v nadaljevanju raziskovanja uporabili za testiranje hemolitične, protibakterijske aktivnosti ter sposobnosti inhibicije encima acetilholinesteraze.

Spužve so glede na razširjenost precej kozmopolitske, naseljujejo morsko dno svetovnih morij od polarnih delov do tropov. Veliko raziskav, tudi na našem oddelku, so že opravili na spužvah iz tropskih in zmerno toplih morij, polarne vrste pa so še zelo slabo raziskane. Te bi morale imeti po predvidevanju sicer manj aktivnih učinkovin kot tropske, ker živijo v povsem drugačnem okolju, ki ni tako bogato z biodiverzitetjo in zasedajo drugačne ekološke niše. To smo skušali tudi raziskati v našem primeru. Zanimalo pa nas je tudi, če bo kateri od izvlečkov kazal še neopisano protibakterijsko, hemolitično ali protiacetilholinesterazno aktivnost. Aktivne učinkovine, izolirane iz teh izvlečkov, bi bile potencialno zanimive za farmacevtsko industrijo. Z raziskavo smo skušali ugotoviti tudi ekološki pomen teh spužev s testiranjem njihovih izvlečkov na določene vrste bakterijskih sevov, ki živijo v podobnih ekosistemih kot same spužve.

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

- Pričakujemo, da bodo organski izvlečki antarktičnih spužev pokazali protibakterijsko, hemolitično ali protiacetilholinesterazno aktivnost
- Pričakujemo, da bodo izvlečki izražali manjšo aktivnost kot organski izvlečki tropskih vrst spužev

2. PREGLED OBJAV

2.1 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV

V **prilogi A** je podana preglednica objavljenih raziskav in predstavlja iz literature zbrane podatke o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v organskih izvlečkih iz spužev, ki smo jih preiskovali v diplomskem delu.

2.2 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI SPUŽEV

Spužve (Porifera) so najbolj primitivne mnogocelične živali. Nimajo pravih organov, čeprav imajo dobro razvita vezivna tkiva, v katerih celice opravljajo najrazličnejše funkcije. V primerjavi z drugimi metazoji kažejo spužvine celice tako visoko stopnjo samostojnosti, da njihovo telo prej spominja na kolonijo praživali. Spužve so sesilne živali in imajo tako nenavadno zgradbo telesa, da so jih v preteklosti naravoslovci (Aristotel, Plinij) uvrščali med rastline. Šele leta 1765 so med raziskavami morskih tokov prvič ugotovili, da gre pravzaprav za živalske vrste (Ruppert in Barnes, 1996).

Spužve so slepa razvojna veja, saj se iz njih ni razvila nobena nova življenjska oblika. Tako jih zoologi ločujejo od pravih mnogoceličnih živali (Eumetazoa) in uvrščajo v drugo skupino, imenovano Parazoa. Spužve so z izjemo ene družine izključno morske živali. Njihove celice niso strogo specializirane, zaradi česar so funkcijsko zelo prilagodljive. Odrasle spužve so skoraj vedno pritrjene na podlago. Njihova rast in oblika sta odvisni od lastnosti te podlage ter vodnih tokov v njihovi neposredni okolici. Spužvino telo nima vidne simetrije. Po velikosti so spužve zelo različne, saj lahko merijo od nekaj milimetrov do enega metra. Njihova osnovna lastnost so odprtine na površini, ki se delijo na maloštevilne odtekalke in manjše številčnejše dotekalke. Skozi omenjene odprtine spužve filtrirajo vodo in se na ta način prehranjujejo. Spužve nimajo prebavil. Njihovo telo je zgrajeno iz kanalčkov in kamric, ki so obdane s slojem posebnih celic z ovratnikom, imenovanih hoanocite. Ker se zgradba teh poti razlikuje, ločimo tri gradbene tipe spužev: askon, sikon in levkon. Najpreprostejši je tip

askon, ki vključuje majhne spužve brez posebej oblikovanih kamric in kanalov. Telo ima le enotno notranjo votlino (spongocel), ki je obdana s hoanocitami. Druga dva gradbena tipa, sikon in levkon, imata bolj zapleteno in razvejano zgradbo, kar jim zaradi povečane notranje telesne površine omogoča bolj učinkovito izmenjavo plinov in večji sprejem hrane. Zunanja površina spužev je prekrita s ploščatimi celicami pinakocitami, dotekalke pa so obdane s porocitami, ki segajo od zunanosti do spongocela. Pod epidermalnimi celicami je mezenhim, gibljive celice amebocite (npr. skleroblasti, ki izdelujejo spužvin skelet) in skelet, ki je lahko anorganski, samo organski ali vključuje tako anorganske kakor tudi organske dele. Anorganski del predstavljajo različno velike in različno oblikovane iglice, ki so sestavljene ali iz apnenca ali iz kremenca., Organski del skeleta predstavlja poseben protein spongin.. Iglice, ki so glavni taksonomski znak pri določanju spužev, se delijo na megasklere in mikrosklere. Slednje so po navadi razpršene in nepovezane, medtem ko megasklere gradijo mrežast skelet in so pri nekaterih vrstah povezane s sponginom. Nekatere spužve nimajo spikul in imajo ogrodje sestavljeno izključno iz spongina.

Morske spužve živijo vse od obrežnega pasu pa do največjih globin, najdemo jih celo v poltemnih in temnih vodnih votlinah. Ker živijo samo v čisti vodi bogati s kisikom in z majhno količino anorganskih delcev, jih lahko imamo za bioindikatorje čistosti vode (Turk, 2007).

2.3 BIOLOŠKO AKTIVNE NARAVNE SPOJINE

Več kakor polovica današnjih zdravil izvira iz naravnih produktov (Newman in Cragg, 2007), na področju zdravil proti raku pa več kot 60% (Gordaliz, 2007). Uporaba naravnih produktov v medicini strmo narašča vse od odkritja penicilina leta 1928. To uporabo so še bolj pospešile nove bolezni in vse bolj odporni sevi mikroorganizmov na različne konvencionalne antibiotike. Morja in oceani so ogromen biom, ki zavzema večino zemeljske površine. Predvidevajo, da v morskem okolju živi več milijonov različnih vrst, velika večina teh pa je še neopisanih (May, 1988). Prav to je usmerilo raziskovalce v izolacijo in preučevanje biološko aktivnih spojin iz morskih organizmov (Kelecom, 2002). Iz morskih organizmov so izolirali že več kot 10.000 biološko aktivnih molekul (Fusetani in sod., 2000; Yasuhara in Lu, 2008).

2.3.1 Biološko aktivne spojine iz morskih spužev

Velika večina biološko aktivnih spojin izvira iz sesilnih organizmov, kar niti ni presenetljivo glede na razmere, v katerih živijo. Obramba pred plenilci, tekmovanje za hrano in prostor ter preprečevanje naseljevanja drugih organizmov na njihovo površino je v veliki meri odvisno od sekundarnih metabolitov, ki jih sintetizirajo in sproščajo v okolje. Proizvajalci teh spojin so velikokrat mikroorganizmi (aktinomicete, bakterije, cianobakterije, glive, enocelične alge), ki živijo v simbiozi s sesilnimi organizmi (Qian in sod., 2006). Spužve so prav tako sesilni organizmi in zato potrebujejo dobro zaščito pred plenilci. Več kot 50% sekundarnih metabolitov iz spužev je biološko aktivnih. V produkciji teh sekundarnih metabolitov prednjačijo prav spužve saj so se izkazale kot prave »kemične tovarne« (Sipkema in sod., 2005; Sepčić, 2008,). Biološko aktivne snovi, ki so jih v naslednjih desetletjih izolirali iz morskih spužev, lahko delujejo protivnetno, protitumorsko, protivirusno, antibiotično, protiglivno, protimalarično, nekatere delujejo kot kardiovaskularna sredstva za zdravljenje tromboze, druge pa vplivajo na delovanje živčevja (sproščanje gladkih mišic) (Sipkema in sod., 2005).

2.3.2 Glavni predstavniki biološko aktivnih produktov iz morskih spužev

2.3.2.1 Snovi s protivnetnim delovanjem

Akutna vnetja v človeškem telesu so lahko posledica mikrobne okužbe, fizične poškodbe ali kemičnih snovi. Spužve so zanimiv vir protivnetnih spojin. Za enega izmed prvih sesterterpenoidov (manoalid) izoliranih iz morske spužve *Luffariella variabilis*, so ugotovili, da ima poleg antibiotičnega in protibolečinskega tudi protivnetno delovanje, ki je bilo obsežno preučevano. Nepovratno inhibira sproščanje arahidonske kisline iz membranskih fosfolipidov preko inhibicije encima fosfolipaze A₂ (Sipkema in sod., 2005). Med snovmi s protivnetnim delovanjem sta morda najbolj raziskana dva metabolita iz spužve *Dysidea avara*, seskviterpenoid hidrokinon avarol in njegov kinon avaron. Poleg protivnetnega

delovanja kažeta spojini še citostatično in protilevkemično delovanje ter delujeta proti virusu HIV (Müller in sod., 2004).

2.3.2.2 Snovi s protitumorskim in protivirusnim delovanjem

Spužve so bogat vir spojin s protivirusnim delovanjem. Kljub velikemu številu odkritih spojin, ki zavirajo virus HIV, je njihov mehanizem inhibicije le slabo poznan. Primeri HIV inhibitornih snovi so papuamidi C in D, haplozamat A in B in že omenjeni avarol. Avarol je ena od redkih spojin, katere mehanizem zaviranja napredovanja okužbe z virusom HIV je bolj ali manj znan. Podatki iz *in vitro* in *in vivo* raziskav kažejo, da avarol poveže koristne lastnosti povečanega humoralnega imunskega odziva in posttranskripcijskih procesov virusne okužbe. Že pri nizkih koncentracijah (0,9 in 0,3 μM) avarol povzroči 80% oziroma 50% inhibicijo sproščanja virusa iz okuženih celic, medtem ko so neokužene celice proti avarolu zelo odporne (Sipkema in sod., 2005).

V skupino snovi s protitumorskim in protivirusnim delovanjem spadata tudi zaenkrat edini dve spojini iz spužev v klinični uporabi, in sicer Ara-C in Ara-A. 1- β -D-arabinofuranozil tiamin in uracil sta bila osnova za razvoj zdravil za zdravljenje raka (Ara-C) oziroma okužbe z virusom herpes simpleks (Ara-A). Arabinofuranozil citozin (Ara-C) inhibira rast rakavih celic *in vitro* in *in vivo* in se zato pogosto uporablja pri kemoterapiji, saj inhibira DNA sintezo levkemičnih celic. Arabinofuranozil adenin (trifosfatni derivat Ara-A) močno in popolnoma inhibira DNA polimerazni encim virusa herpes simplex (HSV) zaradi česar se po celem svetu uporablja pri anti-HSV terapiji (Müller in sod., 2004).

2.3.2.3 Snovi z antibiotičnim in protiglivnim delovanjem

Številne spužve kažejo antibiotično delovanje, nekatere kažejo širok spekter delovanja tako na po Gramu pozitivne kakor na po Gram negativne bakterije. Nekatere snovi delujejo tudi protiglivno, vendar so te manj raznolike kakor antibiotične spojine. Uporaba snovi z

antibiotičnim in s protiglivnim delovanjem, iz morskih spužev je zaradi strupenih učinkov na ljudi, živali in rastline omejena. Zaenkrat še nimamo dovolj dokazov, da imajo snovi, kot so topsentiasterol D in E iz spužve *Topsentia* sp., akantosterol sulfati I in J iz spužve *Acanthodendrilla* sp. ali makrolid leukaskandrolid iz spužve *Leucascandra caveolata*, drugačne oziroma boljše lastnosti kakor snovi, ki so trenutno v uporabi. Vendar lahko dejstvo, da jih proizvajajo evkariontski organizmi (morda tudi simbionti) nakazuje, da so manj strupeni za druge evkarionte (Sipkema in sod., 2005).

2.3.2.4 Snovi s protimalaričnim delovanjem

Malarija, ki je posledica razmnoževanja zajedalskega protozoa *Plasmodium falciparum* v eritrocitih, je velik zdravstveni problem v številnih državah. Nova zdravila so nujna, saj je vse več različic parazita odpornih na trenutno razpoložljiva zdravila. Med morskimi nevretenčarji predstavljajo spužve velik potencialni vir novih bioaktivnih spojin za zagotavljanje bodočih zdravil proti malariji. V zadnjem desetletju so tako že odkrili veliko število antimalarikov iz morskih spužev. Te spojine so večinoma tiste, ki vsebujejo dušik (beljakovine, piridini in tirozini, ki temeljijo na metabolitih, alkaloidi, indoli in amidi) kot tudi nedušikove spojine (terpeni, poliketidi in polisaharidi) (Ravichandran in sod., 2007).

2.3.2.5 Snovi s protivegetativnim delovanjem

Za razliko od prej naštetih snovi, služijo te kot okolju prijazni nadomestki za kemijske premaze proti obraščanju. Organizmi kot so školjke, raki vitičnjaki in makroalge lahko povzročijo resne težave na lupinah ladij, hladilnih sistemih in elektrarnah. Naravni morski produkti s protivegetativnim delovanjem imajo po navadi manj strupeno in bolj specifično delovanje. Iz spužev izolirane snovi zavirajo obraščanje makroalg, ličink rakov vitičnjaov, in odganjajo užitno klapavico *Mytilus galloprovincialis* (Sipkema in sod., 2005).

2.3.3 Biološko aktivne spojine iz polarnih spužev

Večina raziskav na področju biološko aktivnih metabolitov spužev izhaja predvsem iz zmernih in tropskih območjih, vendar je glede na nastanek nešteti novih odpornosti na različne bolezni vedno bolj pomembno, da se podrobno pregleduje tudi predstavnike favne oddaljenih regij sveta kot morebiten vir novih oziroma nadomestnih bioloških učinkovin... Spužve hladnih voda, zlasti tistih na obeh polih so še zelo slabo raziskane in predstavljajo relativno neizkoriščen vir za znanstvena odkritja (Abbas in sod., 2011). Dejstvo je, da od vseh opisanih morskih naravnih produktov manj kot 3% izvira iz organizmov iz polarnih okolij (Lebar in sod., 2007). Med raziskavami, ki potekajo z organizmi iz polarnih okolij, jih je večina iz območja Antarktike (Wilkins in sod., 2002).

Po drugi stani so v zadnjem času tudi Arktična območja postala zanimiva za iskanje potencialnih kandidatov za razvoj novih naravnih zdravil. Tako so iz zbirke spužev južnih delov Arktike nedavno izolirali veliko novih bioaktivnih spojin. V zbirki je veliko neopisanih vrst, ki imajo predvsem protimalarično aktivnost, aktivnost proti oportunističnim nalezljivim boleznim kot je npr. virus HIV ter hepatitisu C. Odkritje novih vrst spužev in priprava njihovih bioaktivnih surovih izvlečkov daje upanje za izolacijo novih bioaktivnih spojin iz relativno neraziskanih virov (Abbas in sod., 2011).

3. MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci spužev

3.1.1.1 Izvor materiala

Vzorci spužev smo dobili s prijaznim posredovanjem prof. dr. Dietricha Mebsa iz Frankfurta/M. Vzorce spužev so nabrali v antarktični ekspediciji imenovani ANDEEP – SYSTCO (ANTarctic Deep - sea biodiversity: colonisation history and recent community patterns – SYStem COupling) v letih 2007 in 2008. Cilj ekspedicije je bil dodatno preučiti diverzitetu Antarktike in potencialen izvor nekaterih vrst, ki so se po predvidevanjih razširile iz teh predelov. Spužve so takoj po nabiranju bile zamrznjene pri -20°C in v tem stanju prenesene v laboratorij, kjer so bile taksonomsko določene in liofilizirane.

V **preglednici 1** so navedene vrste spužev in oznake vzorcev, ki smo jih prejeli z opisane ekspedicije. Nekateri spužve so določene do vrste, večina do rodu, nekaj pa le do redu oziroma sploh niso taksonomsko določene.

Preglednica 1: Oznake vzorcev in vrste spužev.

Oznaka spužve	Vrsta spužve
3	<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>
4	<i>Hexactinellida</i>
6	<i>Monosyringa</i> sp.
8	<i>Bathydorus</i> sp.
10	Neidentificirana spužva 1
26	<i>Myxilla</i> sp.
27	<i>Chinachyra</i> sp.

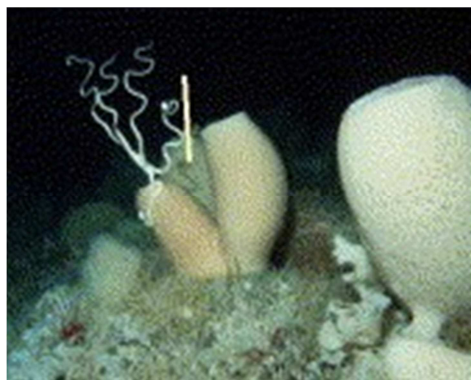
»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

34	<i>Rossella</i> sp.
36	Demospongiae
37/R	<i>Rossella ractovitzae</i> Topsent
37/L	<i>Latrunculia</i> cf. <i>lendenfeldi</i>
38	Demospongiae
40a	<i>Haliclona</i> (<i>Gellius</i>) <i>flagellifera</i>
41a	<i>Hemigellius bidens</i>
41	Microcionidae
43	<i>Rossella</i> cf. <i>racovitzae</i>
45h	<i>Halichondria osculum</i>
45d	Demospongiae
46	<i>Latrunculia</i> sp.
48/1	<i>Xestospongia</i> sp.
48/2	Neidentificirana spužva 2
51	<i>Isodictya toxophila</i>
52	<i>Homaxinella</i> sp.
55	<i>Tetillia</i> sp.
56	<i>Haliclona flagellifera</i>
58	<i>Isodictya setifer</i>
63	<i>Suberitidae</i> gen. sp.
105	Demospongiae
119	<i>Tetillia</i> sp.
124	Demospongiae
132	<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>
166	<i>Rossella racovitzae</i>
167	<i>Rossella</i> sp.



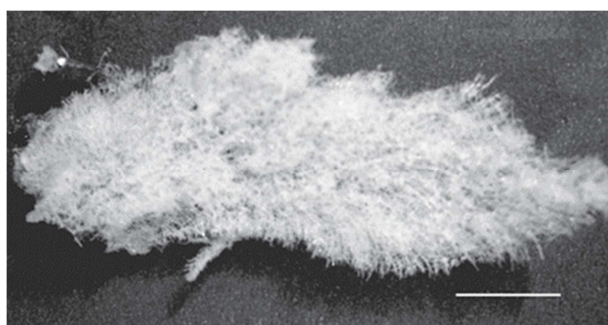
Slika 1: *Rossella* cf. *nuda*



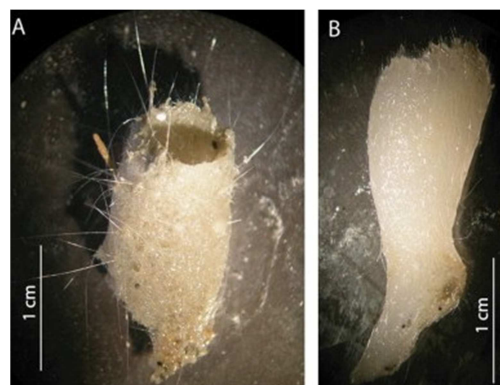
Slika 2: *Rossella cf. vanhoeffeni*



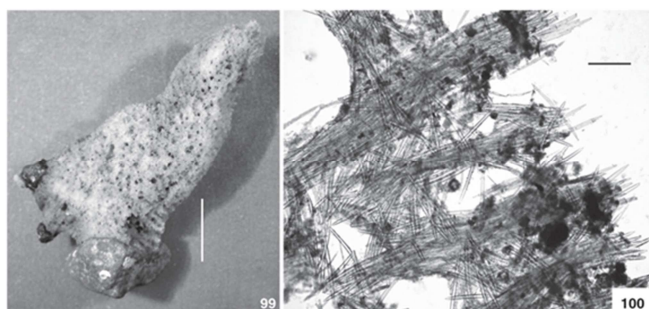
Slika 3: *Rossella racovitzae*



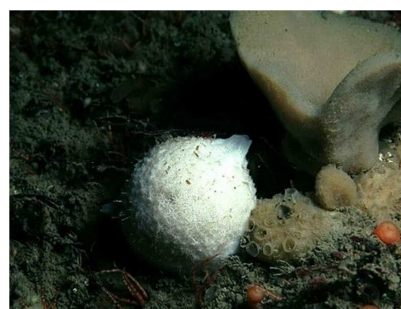
Slika 4: *Hemigelius bidens*



Slika 5: *Bathydorus* sp.



Slika 6: *Isodictya toxophila*



Slika 7: *Tetillia* sp.

3.1.1.2 Tehtanje vzorcev

Določili smo suho maso vzorcev spužev in jo razdelili na 2 dela. 1/3 mase smo shranili, 2/3 pa strli v terilnici in jo uporabili kot izhodni vzorec.

Preglednica 2: Suhe mase vzorcev spužev.

Vrsta spužve	Oznaka spužve	Masa vzorca (g)
<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>	3	0.55
Hexactinellida	4	0.58
<i>Monosyringa</i> sp.	6	2.1
<i>Bathydorus</i> sp.	8	0.43
Neidentificirana spužva 1	10	0.37
<i>Myxilla</i> sp.	26	1.81
<i>Chinachyra</i> sp.	27	0.78
<i>Rossella</i> sp.	34	0.72
Demospongiae	36	1.23
<i>Rossella ractovitzae</i> Topsent	37/R	1.63
<i>Lantrunculia</i> cf. <i>lendenfeldi</i>	37/L	0.79
Demospongiae	38	1.94
<i>Haliclona</i> (<i>Gellius</i>) <i>flagellifera</i>	40a	1.86
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	1.05
Microcionidae	41	1.23
<i>Rossella</i> cf. <i>racovitzae</i>	43	1.18
<i>Halichondria osculum</i>	45h	0.19
Demospongiae	45d	0.43
<i>Lantrunculia</i> sp.	46	1.92
<i>Xestospongia</i> sp.	48/1	1.44
Neidentificirana spužva 2	48/2	2.17
<i>Isodictya toxophila</i>	51	2.16
<i>Homaxinella</i> sp.	52	0.71
<i>Tetillia</i> sp.	55	1.65
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	0.76
<i>Isodictya setifer</i>	58	1.46

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

<i>Suberitidae</i> gen. sp.	63	1.2
Demospongiae	105	1.01
<i>Tetillia</i> sp.	119	1.47
Demospongiae	124	1.06
<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>	132	1.56
<i>Rossella racovitzae</i>	166	3.9
<i>Rossella</i> sp.	167	0.93

3.1.2 Priprava organskih izvlečkov

Zatehtani vzorec (2/3 celotne mase) smo s škarjami narezali na majhne koščke (nekaj mm³) in jih prenesli v veliko centrifugirko, ter ekstrahirali s približno 10 ml 96% etanola (v centrifugirke smo dodali toliko topila, da je prekrilo vzorec spužve za približno 1 cm). Centrifugirke smo zamašili s plastičnimi zamaški. Nato smo jih vstavili v stresalnik in pustili, da se stresajo čez noč pri sobni temperaturi in 600 obratih/min. Naslednji dan smo vzorce prefiltrirali skozi filtrirne papirje ter filtrate shranili v epice. Epice smo označili, oblepili s parafilmom in jih shranili v hladilniku na 4 °C.

3.1.3 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih

Suho težo smo ugotavljali s sušenjem 500 µl vzorca na stehtanem in označenem urnem stekelcu. Sušenje je potekalo v sterilizatorju 10 min pri 120 °C. Po sušenju smo stekelca ponovno stekali in preračunali suhe teže v mg/ml. Suhe teže vzorcev spužev (mg/ml) prikazuje **Preglednica 3**.

3.2 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI

3.2.1 Hemolitični test

Eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže goveje krvi, ki smo ji pri odvzemu dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino in uporabili za biološke teste ali pa spravili v Alseverjevem konzervansu v hladilnik. Tako pripravljene eritrocite lahko uporabljamo dokler se supernatant ne pobarva rdeče, kar nakazuje, da je prišlo do hemolize. Pred uporabo smo konzervirane eritrocite vedno dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Za testiranje smo jih resuspendirali v pufru za eritrocite (raztopina 0.13 M NaCl in 0.02 M TRIS-HCl), pH 7.4. Pripravili smo suspenzijo eritrocitov, ki je pri 630 nm imela navidezno absorpcijo 1.0 ± 0.01 .

Hemolitično aktivnost smo zasledovali s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA), ki nam omogoča istočasno zasledovanje 96 časovnih potekov. Na mikrotitrni plošči smo napolnili 34 vdolbinic s po 100 μ l mešanice eritrocitnega puфра in vzorca (izvlečka posameznih spužev) v različnih volumskih razmerjih. Po končanem pipetiranju smo v vsako vdolbinico dodali še 100 μ l eritrocitov ter pričeli z meritvijo. Hemolizo smo opazovali kot padec navidezne absorpcije pri 630 nm. Kot kontrolo smo uporabili 100 μ l eritrocitnega puфра in 100 μ l eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 45 minut pri 25 °C.

Pri vzorcih, ki so bili aktivni smo naredili razredčitve v 96% etanolu, ponovili meritev in odčitali polovični čas hemolize (t_{50}), oz. čas pri katerem absorpcija pade na polovico svoje začetne vrednosti. Testirali smo tudi vpliv etanola na eritrocite in ugotovili, da le-ta v končnih koncentracijah, višjih od 20%, povzroča lizo eritrocitov. Zato smo pazili, da pri dodajanju ustreznega volumna izvlečkov nikjer nismo presegli te meje.

3.2.2 Test inhibicije acetilholinesteraze

Aktivnost encima acetilholinesteraze (AChE) in njeno inhibicijo s testnimi vzorci smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Kot encim smo uporabili AChE iz električne jegulje (Sigma, ZDA) v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/ml, ki smo jo raztopili v 100 mM fosfatnem puftru, pH 8. K 20 μ l encima smo dodali 4 ml fosfatnega puftra. Pred poskusom smo prav tako pripravili mešanico 5 ml Ellmanovega reagenta (raztopina 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg) in natrijevega hidrogen karbonata (37.5 mg) v 25 mM fosfatnem puftru, pH 7.0) z dodatkom acetiltioholin klorida (substrat) s končno 1 mM koncentracijo.

Za testiranje vpliva vzorcev na AChE smo uporabili 100 μ l mešanice Ellmanovega reagenta in acetiltioholin klorida. Nato smo v posamezno vdolbinico dodali po 5 μ l vsakega testnega vzorca ter 45 μ l mešanice AChE v fosfatnem puftru. Aktivne vzorce smo naknadno redčili s 96% etanolom v razmerjih 1:10 in 1:100. Pri kontrolnem poskusu smo mikrotitrne plošče napolnili z mešanico 100 μ l Ellmanovega reagenta in substrata, 5 μ l 96% etanola ter 45 μ l mešanice AChE in fosfatnega puftra.

3.2.3 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju

Protibakterijsko aktivnost vzorcev smo testirali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Kot testne seve smo uporabili po Gramu pozitivne morske bakterijske seve (*Exignobacterium* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Alteromonas* sp., *Vibrio ruber* sp.) ter seve iz arktičnega ledu (*Janthinobacterium svalbandensis*, *Pseudomonas* CR 13, *Pseudomonas* CR 14, *Pseudomonas* CR 285). Morske bakterijske seve smo prvotno izolirali iz morske vode (lokacija: Sosljanski zaliv, Italija) kasneje pa uporabili iste iz zbirke Katedre za mikrobiologijo Oddelka za Živilstvo na Biotehniški Fakulteti Univerze v Ljubljani, ker niso povzročale težav pri gojenju kot izolirane. Seve iz arktičnega ledu smo dobili iz zbirke doc. dr. Jerneje Ambrožič Avguštin s Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo, BF.

Morske bakterijske seve smo sterilno nacepili v 100 ml erlenmajerice, ki so vsebovale po 10 ml avtoklaviranega tekočega gojišča PKE z 1.76% NaCl. Gojišče smo predhodno pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 0.5 g peptona, 0.1 kvasnega izvlečka, 0.2 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1.76 NaCl in raztopino razdelili v erlenmajerice. Le-te smo z nacepljenim gojiščem preko noči stresali pri 250 obratih/minuto in pri temperaturi 37 °C.

Sledila je priprava agarja, ki smo ga naredili z raztapljanjem 1.5 g peptona, 0.3 kvasnega izvlečka, 0.6 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 5.28 NaCl in 4.5 g v 300 ml deionizirane vode v erlenmajerici, ki smo jo nato pokrili z aluminijasto folijo in jo avtoklavirali na 120 °C.

Seve iz arktičnega ledu smo sterilno nacepili v 100 ml erlenmajerice, ki so vsebovale po 10 ml avtoklaviranega tekočega gojišča (Luria Broth). Gojišče smo predhodno pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 2.5 g Luria Broth (Sigma, ZDA) in raztopino razdelili v erlenmajerice. Le-te smo z nacepljenim gojiščem preko noči stresali pri 250 obratih/minuto pri sobni temperaturi.

Agar smo pripravili z raztapljanjem 7.5 g gojišča Luria Broth in 4.5 g agarja v 300 ml deionizirane vode v erlenmajerici, ki smo jo nato pokrili z aluminijasto folijo in jo avtoklavirali na 120 °C.

Vroč medij smo pustili, da se je ohladil na primerno temperaturo (~ 42 °C). Za tem smo nacepljeno gojišče bakterij ulili neposredno v agar tako, da je bila končna koncentracija bakterij 3%. Sledilo je razlivanje, pri čemer smo po 20 ml agarja z vcepljeno bakterijsko kulturo razlili na približno 15 Petrijevih plošč. Le-te smo do uporabe hranili pri 4 °C.

Pred uporabo smo s pomočjo steriliziranega plutovrta v vsako ploščo zvrtili 5 lukenj premera 1 cm. V vsako od njih smo za test dodali po 100 µl izvlečka. Po 12-urni inkubaciji na sobni temperaturi (sevi iz arktičnega ledu) in na 37 °C (morski bakterijski sevi) smo odčitali polmere inhibicijskih con, ki so bile vidne okoli lukenj.

Tiste vzorce, ki so kazali protibakterijsko aktivnost, smo redčili do koncentracije, ko inhibicijska cona ni bila več vidna. Te redčitve so bile za posamezne vzorce 1:10, 1:25, 1:100, 1:250 in 1:500.

Poleg izvlečkov smo kot pozitivno kontrolo testirali tudi antibiotik kloramfenikol z izhodno koncentracijo 10 mg/ml, ki pa je že na samem začetku pokazal izjemno aktivnost, zato smo ga redčili v razmerju 1:100 in 1:1000. Hranili smo ga na temperaturi -20 °C.

4. REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V IZVLEČKIH

Koncentracijo suhe snovi v izvlečkih smo ugotavljali s sušenjem 500 μ l vzorca na stehtanem in označenem urnem stekelcu. Sušenje je potekalo v sterilizatorju 10 min pri 120 °C. Po sušenju smo stekelca ponovno stehtali in preračunali suhe teže v mg/ml.

V **preglednici 3** so prikazane koncentracije snovi v vseh testiranih izvlečkih spužev, ki smo jih uporabili pri preračunavanju količine snovi v bioloških testih.

Preglednica 3: Koncentracije suhe snovi v etanolnih izvlečkih spužev

Vrsta spužve	Oznaka spužve	Suha teža (mg/ml)
<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>	3	3.8
Hexactinellida	4	4.7
<i>Monosyringa</i> sp.	6	4.6
<i>Bathydorus</i> sp.	8	3.6
Neidentificirana spužva 1	10	3.3
<i>Myxilla</i> sp.	26	7.4
<i>Chinachyra</i> sp.	27	3.5
<i>Rossella</i> sp.	34	6.5
Demospongiae	36	3.7
<i>Rossella ractovitzae</i> Topsent	37/R	5.7
<i>Latrunculia</i> cf. <i>lendenfeldi</i>	37/L	9
Demospongiae	38	5.4
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	7.2
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	5.9
Microcionidae	41	4.5
<i>Rossella</i> cf. <i>racovitzae</i>	43	6.4
<i>Halichondria osculum</i>	45h	3.1
Demospongiae	45d	3.9
<i>Lantrunculia</i> sp.	46	7.2

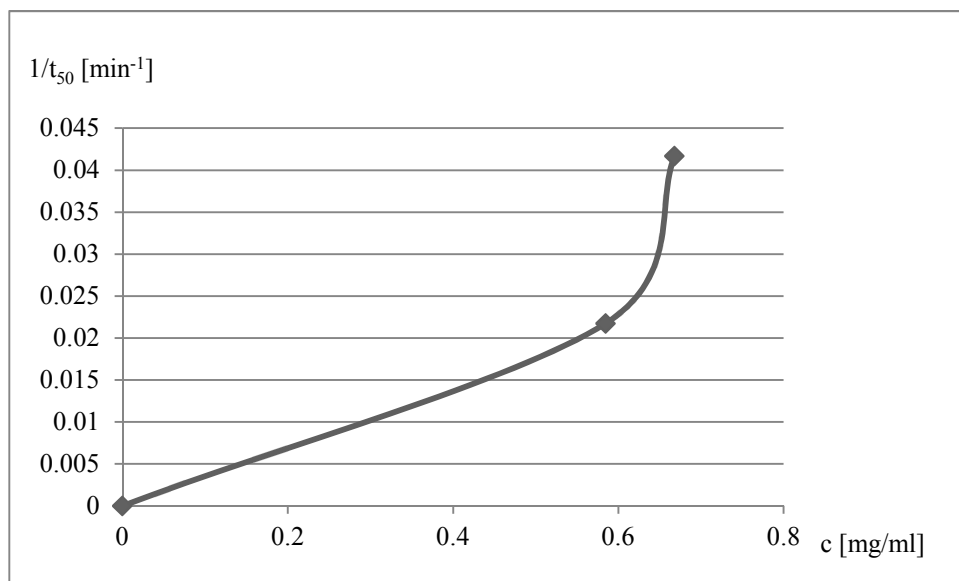
»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

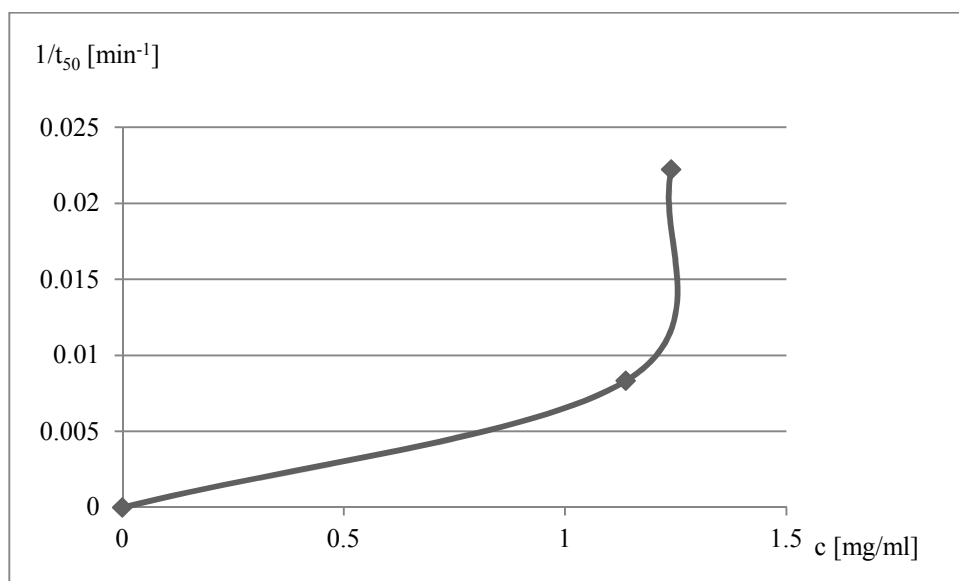
<i>Xestospongia</i> sp.	48/1	4
Neidentificirana spužva 2	48/2	6.9
<i>Isodictya toxophila</i>	51	4.3
<i>Homaxinella</i> sp.	52	4.6
<i>Tetillia</i> sp.	55	4.2
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	5.3
<i>Isodictya setifer</i>	58	6.5
<i>Suberitidae</i> gen. sp.	63	4.2
Demospongiae	105	4.9
<i>Tetillia</i> sp.	119	10.3
Demospongiae	124	5
<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>	132	6.1
<i>Rossella racovitzae</i>	166	6.5
<i>Rossella</i> sp.	167	3.8

4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

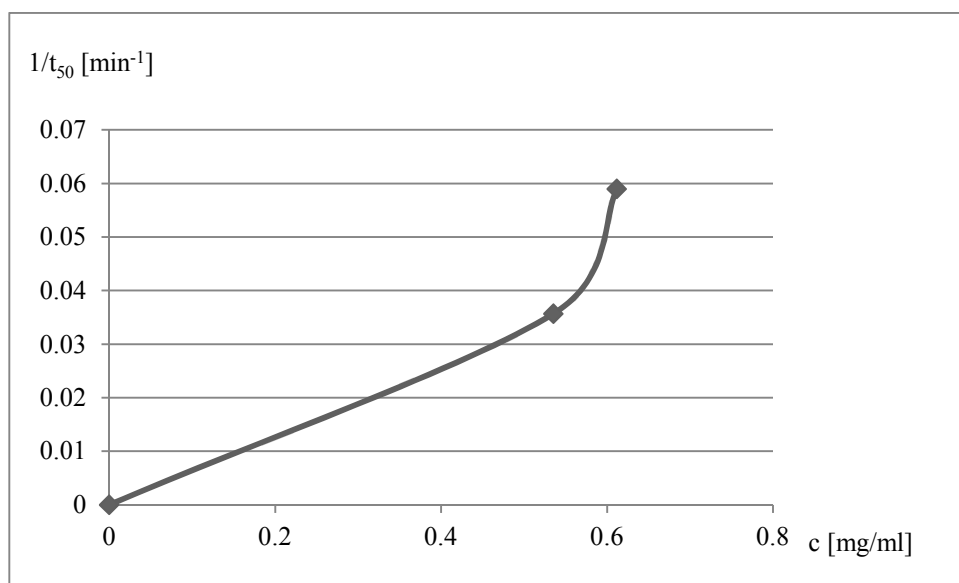
Hemolitično aktivnih je bilo 11 od 33 testiranih vzorcev. Pet vzorcev je povzročilo šibko hemolizo (vzorec 10, 34, 167, 45h, 48/1), 5 vzorcev je bilo zmerno hemolitičnih (vzorec 8, 27, 124, 41, 55), medtem ko je vzorec 46 (*Lantrunculia* sp.) kazal močno hemolitično aktivnost. Vsem vzorcem smo določili polovični čas hemolize (t_{50}). To je čas, v katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pri 650 nm pade za 50%. Šibko hemolizo lahko definiramo kot tisto, pri kateri vzorec ni dosegel vrednosti t_{50} v 10 minutah, zmerna je tista, kjer jo doseže v 5-10 minutah, močna hemolitična aktivnost pa je tista, kjer vzorec doseže vrednosti t_{50} v manj kot 5 minutah. Poskuse smo nadaljevali le z vzorcem št. 46, ki smo ga ustrezno redčili.



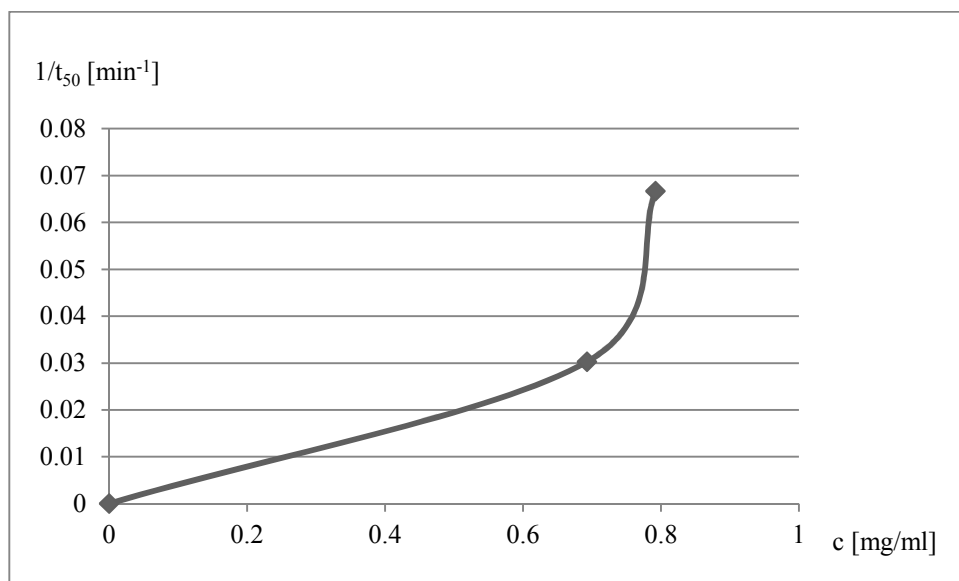
Slika 8: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 10 (neidentificirana spužva 1). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



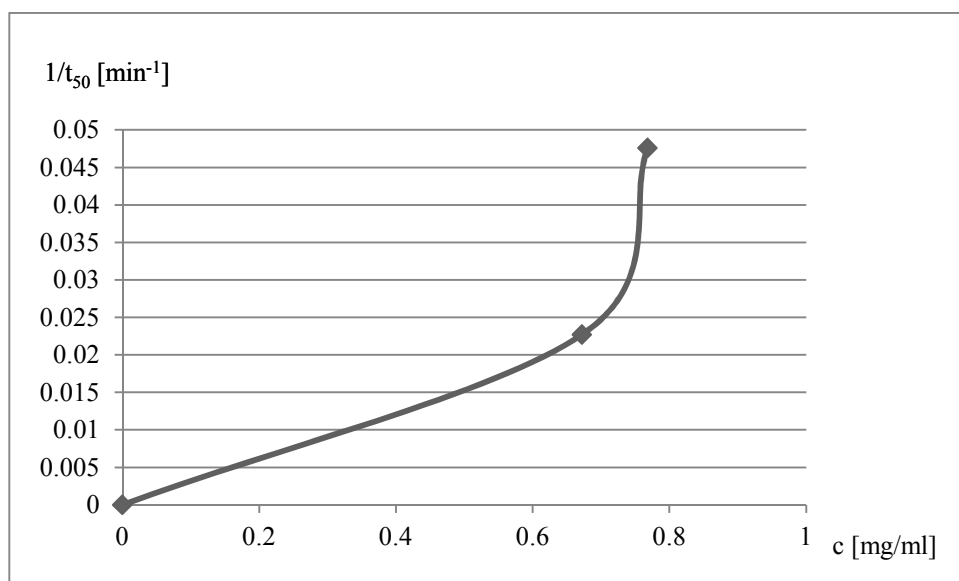
Slika 9: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 34 (*Rossella* sp.). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



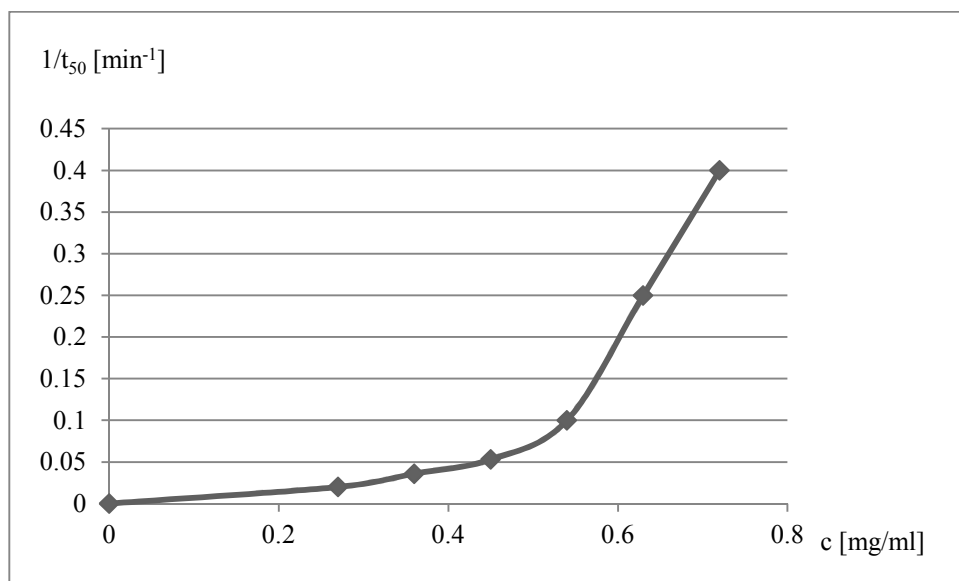
Slika 10: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 45h (*Halichondria osculum*). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



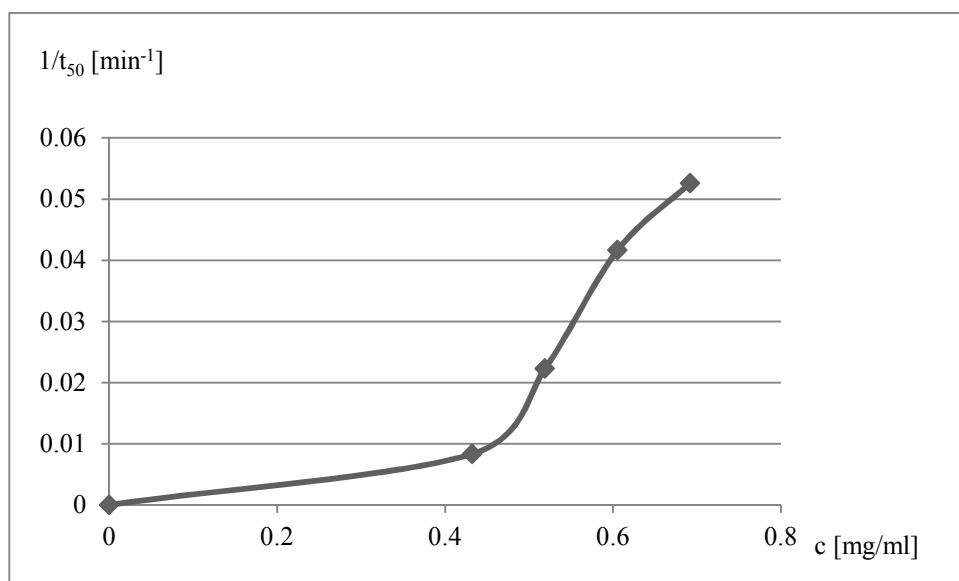
Slika 11: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 48/1 (*Xestospongia* sp.). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



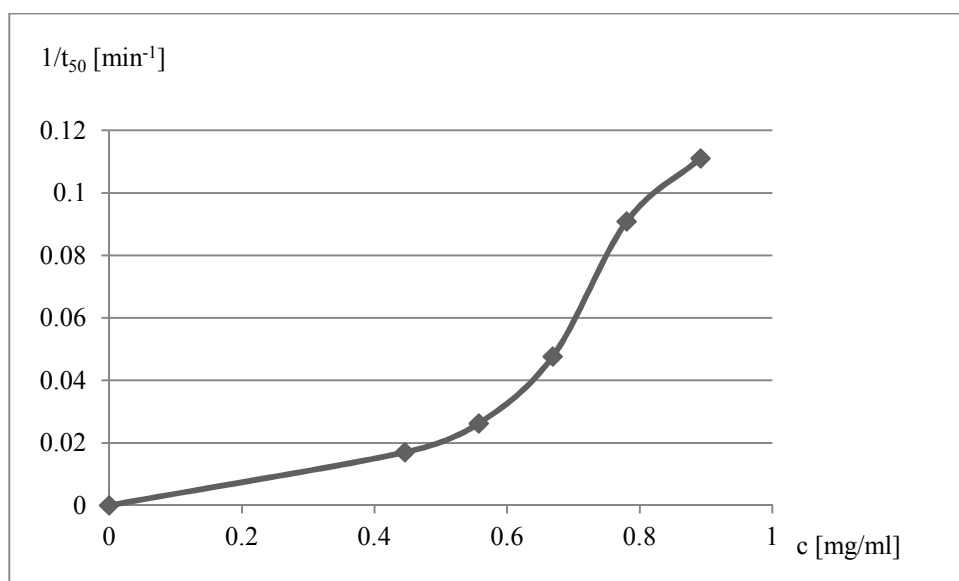
Slika 12: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 167 (*Rossella* sp.). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



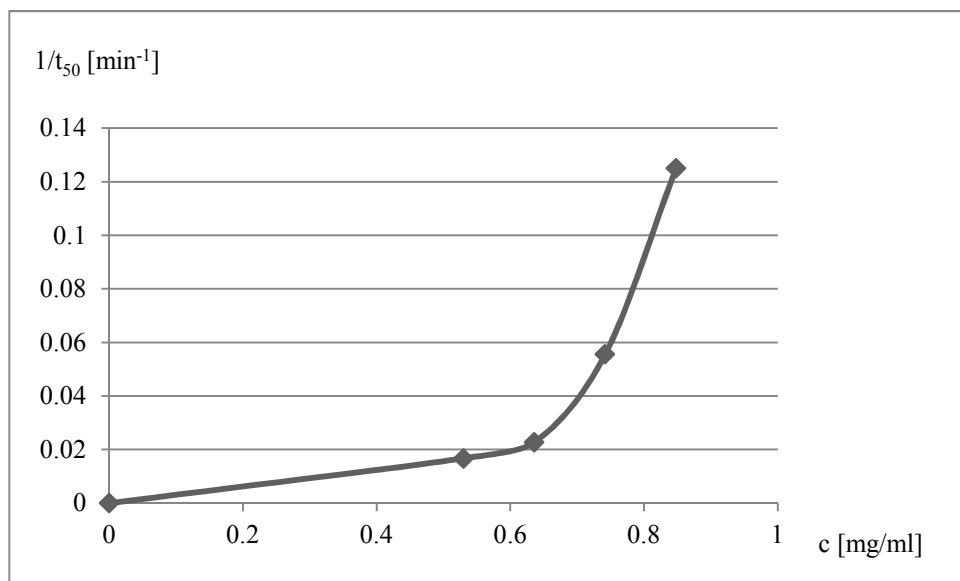
Slika 13: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 8 (*Bathydorus* sp.). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



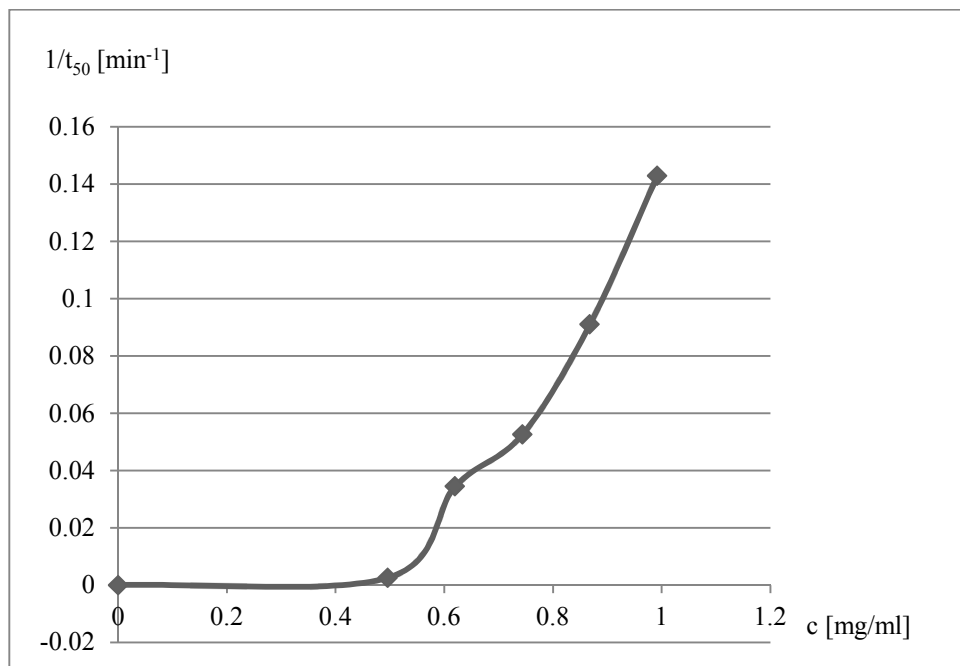
Slika 14: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 27 (*Chinachyra* sp.). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



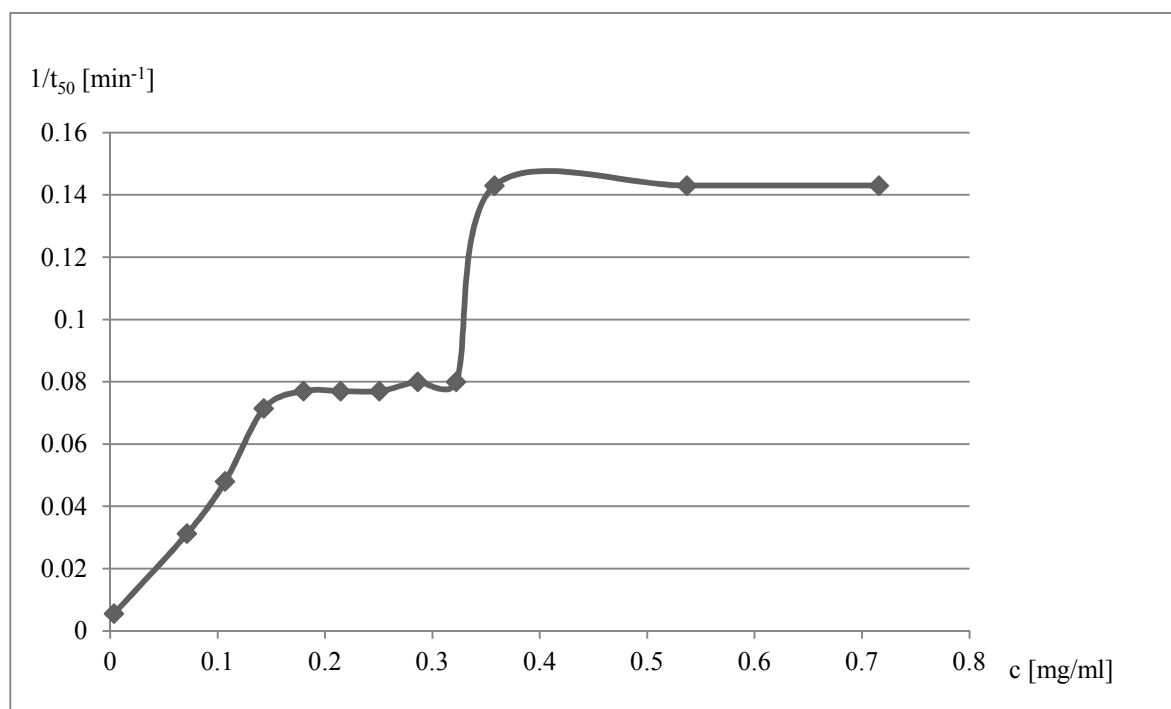
Slika 15: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 41 (*Microcionidae*). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



Slika 16: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 55 (*Tetillia* sp.). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.



Slika 17: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 124 (*Demospongiae*). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.

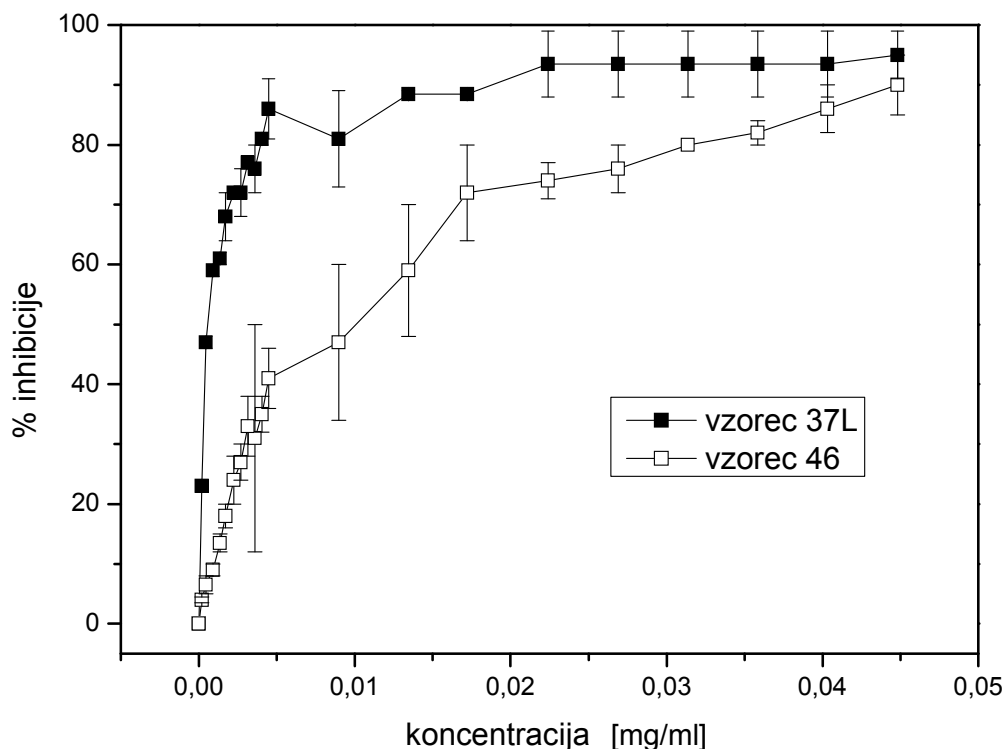


Slika 18: Hemolitična aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 46 (*Lantrunculia* sp.). Aktivnost je izražena kot recipročna vrednost polovičnega časa hemolize $1/t_{50}$.

4.3 ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST

Antiacetilholinesterazno aktivnost sta kazala samo 2 od 33 testiranih vzorcev. To sta bila vzorec 37L (*Latrunculia* cf. *lendenfeldi*) in 46 (*Latrunculia* sp.). Te dva vzorca smo tudi naknadno redčili v razmerjih 1:10 in 1:100.

Slika 19 prikazuje aktivnost vzorcev 37L in 46 pri 1:10 in 1:100 redčenjih v dveh ponovitvah. Iz grafa je razvidno, da kaže vzorec 37L večjo antiacetilholinesterazno aktivnost kakor vzorec 46. Pri prvem vzorcu se je namreč inhibicija pričela že pri veliko nižjih koncentracijah kakor pri vzorcu 46 (pri koncentraciji 0,0025 mg/ml je dosegla že okoli 70% inhibicijo, medtem ko je bila pri vzorcu 46 ta le okrog 20%). Prav tako je prišlo pri vzorcu 37L do 100% inhibicija že pri koncentraciji 0.0225 mg/ml, pri vzorcu 46 pa smo popolno inhibicijo encima dosegli šele pri koncentraciji 0.04 mg/ml.



Slika 19: Antiholinesterazna aktivnost etanolnega izvlečka vzorca 37L (*Latrunculia cf. lendenfeldi*) in vzorca 46 (*Latrunculia* sp.) pri 1:10 in 1:100 redčenjih v dveh ponovitvah.

4.4 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Protibakterijsko aktivnost proti bakterijskem sev *Exignobacterium* je kazalo 17 od 33 testiranih vzorcev, od tega je kazalo močno aktivnost 5 vzorcev, te smo dodatno redčili v razmerjih 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 in ugotavljali približne minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Etanol je kazal zelo majhne inhibitorne aktivnosti (okrog 1 mm), kar smo odšteli od dejanskih inhibitornih con.

Aktivnost proti bakterijskem sev *Pseudoalteromonas* je kazalo 15 od 33 testiranih vzorcev, izmed katerih je bilo 5 bolj aktivnih. Proti sev *Alteromonas* so kazali aktivnost le 4 vzorci, od tega je bil vzorec 37L (*Latrunculia cf. lendenfeldi*) bolj aktiven. Aktivnost proti sev *Vibrio ruber* sp. je kazalo 12 vzorcev, od tega je bil samo en vzorec 41a (*Hemigellius bidens*) bolj aktiven. Vsi omenjeni sevi zgoraj so bili izolirani iz morske vode.

Pri sevih iz ledenika so bili izvlečki najbolj aktivni proti bakterijskem sevu *Janthinobacterium svalbandensis*. Aktivnost je kazalo 11 vzorcev, od katerih je bil najbolj aktiven 37L (*Latrunculia cf. lendenfeldi*). Za vse ostale seve iz ledenika so bili vzorci neaktivni.

Rezultate inhibicije rasti morskih bakterijskih sevov prikazuje **preglednica 4**, bakterijskih sevov izoliranih iz ledenika **preglednica 5**. Približne minimalne koncentracije (MIK) vzorcev in antibiotika kloramfenikola prikazuje **preglednica 6**. Vrednosti MIK pri nobenem od preiskovanih vzorcev niso bile nižje od 0,3 mg/ml.

Preglednica 4: Protibakterijska aktivnost etanolnih izvlečkov spužev in bakterijskih sevov iz morja. Aktivnost je izražena kot širina inhibicijske cone v milimetrih.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncen - tracija (mg/mL)	Širina ihibicijske cone [mm] <i>Exignobacterium</i>	Širina ihibicijske cone [mm] <i>Pseudoalteromonas</i>	Širina ihibicijske cone [mm] <i>Alteromonas</i>	Širina ihibicijske cone [mm] <i>Vibrio ruber</i> sp.
Hexactinellida	4	4,72	11	2	1	2
<i>Myxilla</i> sp.	26	7,4	\	5	\	1
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37/L	8,96	6	6	6	3
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	5,94	4	4	3	5
Demospongiae	38	5,44	3	2	1	1
<i>Halichondria osculum</i>	45h	3,06	3	1	\	\
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	3,80	\	\	\	\
<i>Monosyringa</i> sp.	6	4,56	\	\	\	\
<i>Bathydorus</i> sp.	8	3,60	1	\	\	\
<i>Chinachyra</i> sp.	27	3,46	1	3	\	\
<i>Rossella</i> sp.	34	6,50	1	4	\	\
Demospongiae	36	3,70	1	1	\	\
<i>Rossella ractovitzae</i>	37/R	5,74	\	\	\	\
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	7,22	\	1	\	\
Microcionidae	41	4,46	1	1	\	1

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

<i>Rossella cf. racovitzae</i>	43	6,40	\	\	\	\
Demospongiae	45d	3,88	2	\	\	1
<i>Lantrunculia sp.</i>	46	7,16	\	\	\	\
<i>Xestospongia sp.</i>	48/1	3,69	\	\	\	\
Neidentificirana	48/2	6,94	1	\	\	\
<i>Isodictya toxophila</i>	51	4,28	\	\	\	\
<i>Homaxinella sp.</i>	52	4,60	1	3	\	\
<i>Tetillia sp.</i>	55	4,24	1	\	\	1
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	5,30	\	2	\	1
<i>Isodictya setifer</i>	58	6,52	1	\	\	1
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	4,20	\	\	\	\
Demospongiae	105	4,92	\	1	\	1
<i>Tetillidia sp.</i>	119	10,26	1	\	\	\
Demospongiae	124	4,96	1	1	\	1
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	6,14	\	\	\	\
<i>Rossella racovitzae</i>	166	6,48	\	\	\	\
<i>Rossella sp.</i>	167	3,84	\	\	\	\

Preglednica 5: Protibakterijska aktivnost etanolnih izvlečkov spužev in bakterijskih sevov iz ledenika. Aktivnost je izražena kot širina inhibicijske cone v milimetrih.

Vrsta spužve	Koncentracija (mg/mL)	Širina ihibicijske cone [mm] <i>Janthinobacterium svalbandensis</i>	Širina ihibicijske cone [mm] <i>Pseudomonas</i> CR 13	Širina ihibicijske cone [mm] <i>Pseudomonas</i> CR 14	Širina ihibicijske cone [mm] <i>Pseudomonas</i> CR 285
Hexactinellida	4,72	\	\	\	\
<i>Myxilla</i> sp.	7,4	2	\	\	\
<i>Latrunculia</i> cf. <i>lendenfeldi</i>	8,96	4	\	\	\
<i>Hemigellius bidens</i>	5,94	3	\	\	\
Demospongiae	5,44	2	\	\	\
<i>Halichondria osculum</i>	3,06	2	\	\	\
<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>	3,80	\	\	\	\
<i>Monosyringa</i> sp.	4,56	\	\	\	\
<i>Bathydorus</i> sp.	3,60	\	\	\	\
<i>Chinachyra</i> sp.	3,46	\	\	\	\
<i>Rossella</i> sp.	6,50	\	\	\	\
Demospongiae	3,70	\	\	\	\
<i>Rossella ractovitzae</i>	5,74	\	\	\	\
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	7,22	1	\	\	\
Microcionidae	4,46	\	\	\	\
<i>Rossella</i> cf. <i>racovitzae</i>	6,40	1	\	\	\
Demospongiae	3,88	\	\	\	\
<i>Lantrunculia</i> sp.	7,16	\	\	\	\
<i>Xestospongia</i> sp.	3,69	\	\	\	\
Neidentificirana	6,94	\	\	\	\
<i>Isodictya toxophila</i>	4,28	\	\	\	\
<i>Homaxinella</i> sp.	4,60	\	\	\	\
<i>Tetillia</i> sp.	4,24	\	\	\	\
<i>Haliclona flagellifera</i>	5,30	\	\	\	\

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

<i>Isodictya setifer</i>	6,52	\	\	\	\
<i>Suberitidae</i> gen. sp.	4,20	\	\	\	\
Demospongiae	4,92	1	\	\	\
<i>Tetillidia</i> sp.	10,26	\	\	\	\
Demospongiae	4,96	1	\	\	\
<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>	6,14	1	\	\	\
<i>Rossella racovitzae</i>	6,48	1	\	\	\
<i>Rossella</i> sp.	3,84	\	\	\	\

Preglednica 6: Približne minimalne koncentracije etanolnih izvlečkov spužev in bakterijskih sevov iz morja in ledenika. Preglednica prikazuje tudi MIK antibiotika kloramfenikola.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija [mg/ml]	MIK [mg/ml] <i>Exignobacterium</i>	MIK [mg/ml] <i>Pseudoalteromonas</i>	MIK [mg/ml] <i>Alteromonas</i>	MIK [mg/ml] <i>Vibrioruber</i> sp.	MIK [mg/ml] <i>Janthinobacterium svalbandensis</i>	MIK [mg/ml] <i>Pseudomonas</i> CR 13	MIK [mg/ml] <i>Pseudomonas</i> CR 14	MIK [mg/ml] <i>Pseudomonas</i> CR 285
Hexactinellida	4	4,72	med 0,472 in 4,72	med 0,472 in 4,72	med 0,472 in 4,72	med 0,472 in 4,72	med 0,472 in 4,72	\	\	\
<i>Myxilla</i> sp.	26	7,4	Med 0,74 in 7,4	med 0,74 in 7,4	med 0,74 in 7,4	med 0,74 in 7,4	med 0,74 in 7,4	\	\	\
<i>Latrunculia</i> cf. <i>lendenfeldi</i>	37/L	8,96	0	0	0,9	0	0,9	\	\	\
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	5,94	med 0,594 in 5,94	med 0,594 in 5,94	med 0,594 in 5,94	med 0,594 in 5,94	med 0,594 in 5,94	\	\	\
Demospongiae	38	5,44	med 0,544 in 5,44	med 0,544 in 5,44	med 0,544 in 5,44	med 0,544 in 5,44	med 0,544 in 5,44	\	\	\
<i>Halichondria osculum</i>	45h	3,06	med 0,306 in 3,06	med 0,306 in 3,06	med 0,306 in 3,06	med 0,306 in 3,06	med 0,306 in 3,06	\	\	\
<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>	3	3,80	\	\	\	\	\	\	\	\

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

<i>Monosyringa</i> sp.	6	4,56	\	\	\	\	\	\	\	\
<i>Bathydorus</i> sp.	8	3,60	0,4	\	\	\	\	\	\	\
<i>Chinachyra</i> sp.	27	3,46	0,3	< 0,346	\	\	\	\	\	\
<i>Rossella</i> sp.	34	6,50	0,7	< 0,65	\	\	\	\	\	\
Demospongiae	36	3,70	0,4	0,37	\	\	\	\	\	\
<i>Rossella ractovitzae</i>	37/R	5,74	\	\	\	\	\	\	\	\
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	7,22	0,7	0,72	\	\	0,7	\	\	\
Microcionidae	41	4,46	0,4	0,45	\	0,4	\	\	\	\
<i>Rossella</i> cf. <i>racovitzae</i>	43	6,40	\	\	\	\	0,6	\	\	\
Demospongiae	45d	3,88	\	\	\	0,4	\	\	\	\
<i>Lantrunculia</i> sp.	46	7,16	\	\	\	\	\	\	\	\
<i>Xestospongia</i> sp.	48/1	3,69	\	\	\	\	\	\	\	\
neidentificirana	48/2	6,94	0,9	\	\	\	\	\	\	\
<i>Isodictya toxophila</i>	51	4,28	\	\	\	\	\	\	\	\
<i>Homaxinella</i> sp.	52	4,60	0,5	< 0,46	\	\	\	\	\	\
<i>Tetillia</i> sp.	55	4,24	0,4	\	\	0,4	\	\	\	\
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	5,30	\	< 0,53	\	0,5	\	\	\	\
<i>Isodictya setifer</i>	58	6,52	0,7	\	\	0,7	\	\	\	\
<i>Suberitidae</i> gen. sp.	63	4,20	\	\	\	\	\	\	\	\
Demospongiae	105	4,92	\	0,49	\	0,5	0,5	\	\	\
<i>Tetillidia</i> sp.	119	10,26	1	\	\	\	\	\	\	\
Demospongiae	124	4,96	0,5	0,5	\	0,5	0,5	\	\	\
<i>Rossella</i> cf. <i>nuda/vanhoeffeni</i>	132	6,14	\	\	\	\	0,6	\	\	\
<i>Rossella racovitzae</i>	166	6,48	\	\	\	\	0,6	\	\	\
<i>Rossella</i> sp.	167	3,84	\	\	\	\	\	\	\	\
Kloramfenikol	\	10	ni podatka	< 10 mg/ml	< 0,01 mg/ml	< 0,01 mg/ml	< od 0,1 mg/ml	\	\	\

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Morski organizmi se morajo za razliko od kopenskih neprestano prilagajati ekstremnim morskim okoljskim razmeram. Te razmere so predvsem visok pritisk, visoke koncentracije soli, nizka koncentracija hranil, stalne nizke temperature (z izjemo visokih temperatur v bližini podvodnih vulkanov in ekstremno nizkih temperatur v polarnih morjih), omejena sončna svetloba in nizka vsebnost kisika. Morski organizmi imajo za prilagoditev na take razmere edinstvene rešitve, kot so presnova, obnašanje in strategije prilagajanja. Te strategije prilagajanja vključujejo tudi veliko raznolikost sekundarnega metabolizma (Hu in sod., 2011).

Sekundarni metaboliti so izjemno pomembne kemijske substance, ki jih človeštvo izkorišča že slabo stoletje, njihovo število pa se povečuje iz leta v leto. Število novih proizvodov pridobljenih iz morskih organizmov, ki so jih na novo odkrili vsako leto, je bilo pred letom 1985 manjše od 100. Število se je drastično povečalo na več kot 300 v letu 1987 in na okoli 500 na leto v poznih 90-ih letih prejšnjega stoletja. Na splošno se je kemija morskih naravnih produktov hitro začela razvijati od sredine 1980 (Hu in sod., 2011). Primer dobrega vira teh snovi, so spužve, kjer je obramba s sekundarnimi metaboliti nujna. V zadnjih desetletjih so tako iz morskih spužev izolirali vrsto novih, kemijsko edinstvenih spojin z zelo različnimi biološkimi aktivnostmi.

Veliko sekundarnih metabolitov je že pokazalo zanimive biološke aktivnosti kot na primer kalikulini izolirani iz spužve *Discodermia calyx* (Kato in sod., 1986), diskodermolidi iz spužve *D. dissoluta* (Gunasekera in sod., 1990), latrunkulini iz *Latrunculia magnifica* (Kashman in sod., 1980) ter spongistratin iz spužev *Spongia* sp. in *Spirastrella* sp. (Pettit in sod., 1993). Ti metaboliti so citotoksični, zavirajo rast celic in bi se lahko uporabili kot kemoterapevtiki. Te spojine se razlikujejo po strukturi in delujejo na različne elemente citoskeleta, imajo pa podobne antiproliferativne in protitumorske lastnosti (Sepčić in sod., 2010).

Zaradi izjemne biološke in kemijske diverzitete v morju smo se v tej nalogi odločili za iskanje potencialno zanimivih biološko aktivnih spojin iz organskih izvlečkov izbranih vrst

antarktičnih spužev in sicer s pomočjo ekstrakcije v etanolu. Za preverjanje biološke aktivnosti teh izvlečkov smo izbrali tri teste. Merili smo najprej hemolitično, nato antiacetilholinesterazno in na koncu še protibakterijsko aktivnost vzorcev.

Veliko raziskav so že opravili s tropskimi spužvami, zato smo se v našem primeru odločili raziskati tudi polarne vrste, ki bi lahko vsebovale nove potencialno aktivne učinkovine. Posebej antarktično območje postaja vedno bolj priljubljeno za odkrivanje novih naravnih proizvodov in je z obetajočimi kandidati že pripomoglo k razvoju novih vrst zdravil (Abbas in sod., 2011). Pričakovali pa smo, da bo aktivnost izvlečkov antarktični spužev manjša od izvlečkov iz tropskih vrst.

Hemolitično aktivnost je kazalo 11 od 33 testiranih vzorcev: izvlečki dveh vrst spužve *Rossella* sp., *Halichondria osculum*, *Xestospongia* sp., *Bathydorus* sp., *Chinachyra* sp., Demospongiae, Microcionidae, *Tetillia* sp. ter *Lantrunculia* sp.. Pri slednji je bila hemoliza najmočnejša, zato smo vzorec tudi večkrat redčili v različnih koncentracijah, pri drugih pa konkretnejše hemolitične aktivnosti nismo zasledili. V splošnem niti ni zelo presenetljivo, da je le dobra tretjina vseh vzorcev pokazala hemolitično aktivnost, saj so spužve sesilni organizmi, ki se prehranjujejo s filtracijo in zaradi tega ne potrebujejo specializiranih strupnih aparatov (s pomočjo katerih bi izbrizgali hemolitično aktivne učinkovine v telo žrtve) kot to počno nekatere druge sesilne morske živali, predvsem morske vetrnice (Sepčič in sod., 1997).

Zanimivo je predvsem to, da se od vseh izvlečkov, ki so kazali hemolitično aktivnost, v literaturi pojavljata samo dva rodova, to sta *Xestospongia* sp. in *Lantrunculia* sp., za katera je znano, da imata snovi s hemolitično aktivnostjo. V našem primeru je tudi izvleček iz spužve rodu *Rossella* kazal hemolitično aktivnost. Sklepamo lahko, da je vrst spužev, ki pripadajo različnim rodovom in katerih izvlečki kažejo hemolitično aktivnost več, a so antarktične vrste teh spužev premalo raziskane, da bi se večkrat pojavile v znanstveni literaturi.

Hemolitična aktivnost antarktičnih vrst spužev ni bila v literaturi nikoli posebej omenjena, našli pa smo poročila o citotoksičnosti, ki bi lahko bila posledica membranske aktivnosti snovi, prisotnih v preučevanih spužvah. Spužve, ki so v literaturi bile opisane kot citotoksične, in smo jih uporabili tudi v naši raziskavi, so bile *Lantrunculia* sp. (Perry in sod., 1988, Genta-Jouve in sod., 2011) in *Xestospongia* sp. (Suwanborirux in sod., 2003, Amnuoypol in sod., 2004, Tsukamoto in sod., 2000, Kobayashi in sod., 1995, Edrada in sod., 1996, Williams in sod., 2002, Calcul in sod., 2003, Tasdemir in sod., 2001, Concepcion in sod., 1995, Cao in sod., 2005, Shoji in sod., 1992, Liu in sod., 2011, Kobayashi in sod., 1994).

Poleg tega je v zvezi s citotoksičnostjo omenjena v literaturi tudi *Homaxinella* sp., ki je bila tudi ena izmed naših vzorcev, vendar v našem primeru ni kazala znakov hemolitičnosti in je njena citotoksičnost verjetno posledica drugih mehanizmov.

Vseh 33 vzorcev spužev smo prav tako testirali z encimskim testom, kjer smo iskali spojine, ki bi imele sposobnost inhibicije encima acetilholinesteraze (AChE). Po prvi seriji testa smo ugotovili, da sta le dva vzorca od 33 testiranih kazala antiacetilholinesterazno aktivnost z visoko stopnjo inhibicije, zato smo jih dodatno redčili v razmerjih 1:10 in 1:100. Že prej omenjeno spužvo *Latrunculia* sp., ki je pri teh dveh redčitvah še vedno močno inhibirala encim, smo razredčili še dodatno. Dodatno smo redčili tudi drugi vzorec, ki je pripadal vrsti *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, tako da smo v obeh primerih imeli aktivne izvlečke iz istega rodu. Vseeno pa smo zaznali večjo aktivnost slednjega vzorca kot pa prej omenjenega. Glede na to, da so bili vzorci iz tega rodu tako aktivni pri inhibiciji encima, bi pričakovali, da bodo v zvezi s tem bili omenjeni v literaturi, vendar niso. Zatorej tudi ne izključujemo možnosti, da gre morda za aktivnost, ki še ni bila prej opisana. V raziskavi s tropskimi spužvami (Sepčić in sod., 2010) rod *Latrunculia* prav tako ni kazal aktivnosti pri testiranju na inhibicijo encima acetilholinesteraze.

Poleg hemolitične aktivnosti in sposobnosti inhibicije encima acetilholinesteraze (AChE) smo vse vzorce testirali tudi s protibakterijskim testom. Ker je bila ena od naših nalog ugotoviti tudi možen ekološki vpliv spužev na bakterije, smo izvlečke testirali proti sevom, ki zasedajo ekološke niše v katerih živijo tudi spužve. Ene od teh so bile morske bakterije, druge pa bakterije, izolirane iz ledenika. Vse bakterije so bile po Gramu negativne.

Protibakterijsko aktivnost proti bakterijskem sevu *Exignobacterium* je kazalo 17 od 33 testiranih vzorcev, kar je dobra polovica vseh. Od tega je kazalo močnejšo aktivnost 5 vzorcev, ki smo jih dodatno redčili v razmerjih 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:250 ter ugotavljali minimalno inhibitorno koncentracijo za posamezen vzorec. Verjetno ni nenavadno, da je med vzorci, ki so imeli največjo aktivnost, tudi *Latrunculia* sp., kar potrjujejo tudi podatki iz literature. Zanimivo je, da v literaturi nismo zasledili aktivnosti spužve *Hexactinellida* sp., ki je kazala proti dotičnem sevu veliko aktivnost pred redčenjem. Nenavadno je tudi, da vzorec spužve *Xestospongia* sp. ni kazal nikakršne aktivnosti, kar ni v skladu z bogato paleto opisanih protibakterijskih učinkov iz literature (Harrison in sod., 1996, Edrada in sod., 1996, Kobayashi in sod., 1993, Liu in sod., 2011, Jimenez in sod., 1990) in aktivnostmi proti Gram pozitivnim bakterijam *Bacillus subtilis* in *Staphylococcus aureus* (Edrada in sod., 1996). To

si lahko razlagamo s pojavljanjem vseh protibakterijskih aktivnosti v drugačnem topilu kot smo ga imeli mi – metanolu, ali pa s selektivnim delovanjem na po Gramu pozitivne bakterije.

Aktivnost proti bakterijskem sevu *Pseudoalteromonas* je kazalo 15 vzorcev od 33 testiranih, izmed katerih je bilo 5 bolj aktivnih. Tu se spet pojavlja *Latrunculia* sp. z aktivnostjo, ki je bila še po redčenju dokaj velika.. Nenavaden rezultat smo dobili pri vzorcih iz spužev *Myxilla* sp., *Hemigellius bidens* in *Rossella* sp., ki sta kazala precejšnjo aktivnost, vendar podatkov o aktivnosti v objavljeni literaturi nismo zasledili..

Proti sevu *Alteromonas* so kazali aktivnost le 4 vzorci, med njimi je bil vzorec 37L (*Latrunculia* cf. *lendenfeldi*) najbolj aktiven. Aktivnost proti sevu *Vibrio ruber* sp. je kazalo 12 vzorcev, med njimi je izstopal vzorec spužve *Hemigellius bidens*, ki je bil zelo aktiven, sledi pa mu ponovno vzorec spužve *Latrunculia* sp.. Kot lahko razberemo iz rezultatov, je nenavaden predvsem podatek za spužvo *Hemigellius bidens*, kjer pa nismo našli nobene objave, ki bi omenjala raziskave protibakterijskih snovi iz te spužve. Morda gre torej za še neopisano aktivnost.

Pri preizkušanju vzorcev na protibakterijsko aktivnost proti sevom iz ledenika so na splošno izvlečki delovali le proti sevu *Janthinobacterium svalbandensis*. Aktivnost je kazalo 11 vzorcev, od katerih je izstopal ponovno vzorec *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*. Sledil je vzorec *Hemigellius bidens*, kar spet priča o potencialni neopisani aktivnosti.

Precej presenetljivi so bili rezultati delovanja izvlečkov proti ostalim bakterijskim sevom iz ledenika, saj so bile bakterije *Pseudomonas* CR 13, *Pseudomonas* CR 14 in *Pseudomonas* CR 285. proti delovanju izvlečkov popolnoma odporne. Nobeden od 33 vzorcev torej ni kazal protibakterijske aktivnosti, še bolj pa je presenetljiv podatek, da niti testirani antibiotik kloramfenikol na njih ni imel učinka.

Rezultati protibakterijskih testov kažejo na očitno razliko med delovanjem na morske bakterije, ki so vsaj delno občutljive, in ledeniškimi, kjer z izjemo enega seva, druge bakterije na delovanje izvlečkov niso bile občutljive.

Po končanih testiranjih vzorcev spužev smo ugotovili, da po bioloških aktivnostih izstopata dva vzorca. Prvi je bil iz rodu *Latrunculia* (eden od vzorcev je določen do vrste *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*), ki je kazala veliko hemolitično aktivnost, delovala je inhibitorno proti encimu AChE in imela v večini primerov prav tako izrazito protibakterijsko aktivnost. V literaturi

smo zasledili veliko spojin, ki so jih že izolirali iz tropskih vrst rodu *Latrunculia* in imajo različne učinke kot so: protiglivična in anti-HIV aktivnost (Zampella in sod., 2002, Sepe in sod., 2006, D'Auria in sod., 2007), citotoksičnost (Perry in sod., 1988, Genta-Jouve in sod., 2011), protimikrobna aktivnost (Capon in sod., 1987, Ford in sod., 2000, Lang in sod., 2005, Perry in sod., 1988, D'Auria in sod., 2007) ter zaviranje različnih tumorjev (Lang in sod., 2005, Reyes in sod., 2004, Ahmed in sod., 2007, El Sayed in sod., 2008). Tipični metaboliti rodu *Latrunculia* so latrunkulini, ki imajo učinke kot so: zaviranje tumorskih celic prostate (El Sayed in sod., 2008), reorganizacija mikrofilamentov v celicah (Kashman in sod., 1980) ter spremembe v morfologiji celic (Smith in sod., 1992). V raziskavi arktičnih vrst rodu *Latrunculia* (Abbas in sod., 2011) so prav tako odkrili veliko biološko aktivnih spojin, vendar bistveno manj kot pri tropskih spužvah. Zaradi tega bi se v prihodnosti lahko osredotočili na polarne vrste omenjene spužve, ki predstavljajo potencial za odkritje novih bioaktivnih molekul.

Druga izstopajoča vrsta je bila spužva *Hemigellius bidens*, ki je kazala izrazito protibakterijsko aktivnost. V nadaljnih raziskavah bi se bilo tako vsekakor koristno lotiti izolacij aktivnih snovi iz omenjene spužve, saj objav o metabolitih te spužve ni, prav tako pa predstavlja potencial v raziskovanju aktivnih substanc za nove vrste naravnih proizvodov farmacevtske industrije.

Glede na primerjavo naših rezultatov v zvezi s testiranjem izvlečkov tropskih spužev (Sepčić in sod., 2010) lahko zaključimo, da so bile aktivnosti v povprečju podobne z izjemo protibakterijske aktivnosti, ki je bila v našem primeru manjša. To si lahko razlagamo s stališča ekologije, saj je v antarktičnih vodah kompeticija manjša kakor v tropskih morjih, kjer je biomasa in biodiverziteteta veliko večja. Tako je tudi kemijska obramba organizmov primerna ekološkim razmeram v njihovih habitatih.

5.2 SKLEPI

Za preverjanje bioloških aktivnosti etanolnih izvlečkov antarktičnih spužev smo izbrali tri teste: spremljali smo hemolitično, antiacetilholinesterazno in protibakterijsko aktivnost.

Hemolitično aktivnost je kazalo 11 od 33 testiranih vzorcev: izvlečki dveh vrst spužve *Rossella* sp., *Halichondria osculum*, *Xestospongia* sp., *Bathydorus* sp., *Chinachyra* sp., *Demospongiae*, Microcionidae, *Tetillia* sp. ter *Latrunculia* sp.. Pri slednji je bila hemoliza najmočnejša, zaradi tega smo vzorec tudi večkrat redčili, pri drugih pa konkretnije hemolitične aktivnosti nismo zasledili.

Proti encimu acetilholinesterazi sta le dva od 33 testiranih vzorcev kazala aktivnost z visoko stopnjo inhibicije, zato smo jih dodatno redčili v razmerjih 1:10 in 1:100. Dodatno smo razredčili še dva vzorca, ki pa sta oba pripadala istemu rodu *Latrunculia*.

Protibakterijske teste smo izvajali na bakterijskih sevih izoliranih iz morja in ledenika. Proti prvemu sevu iz morja (*Exiguobacterium*) je kazalo aktivnost 17 od 33 testiranih vzorcev, od tega je bilo 5 vzorcev zelo aktivnih. Aktivnost proti sevu *Pseudoalteromonas* je kazalo 15 vzorcev od 33 testiranih izmed katerih je bilo prav tako 5 zelo aktivnih. Proti sevu *Alteromonas* so kazali aktivnost le 4 vzorci, od tega je bil le vzorec spužve *Latrunculia* sp. zelo aktiven. Aktivnost proti sevu *Vibrio ruber* sp. je kazalo 12 vzorcev, od tega je izstopal vzorec spužve *Hemigellius bidens*, ki je bil zelo aktiven sledi pa mu ponovno vzorec spužve *Latrunculia* sp..

Pri sevih iz ledenika so bili izvlečki najbolj aktivni proti bakterijskem sevu *Janthinobacterium svalbandensis*. Aktivnost je kazalo 11 vzorcev, od katerih je izstopal ponovno vzorec *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*. Vzorci testirani na treh ostalih bakterijskih sevih iz ledenika: *Pseudomonas* CR 13, *Pseudomonas* CR 14 in *Pseudomonas* CR 285 niso kazali nobene aktivnosti.

Potrdili smo v literaturi zasledeno močno aktivnost izvlečkov iz spužev rodu *Latrunculia*, odkrili pa smo tudi nekaj novih bioloških aktivnosti, predvsem v izvlečkih spužve *Hemigellius bidens* v protibakterijskih testih.

6. VIRI

Abbas S, Kelly M., Bowling J., Sims J., Waters A., Hamann M. 2011. Advancement into the Arctic Region for Bioactive Sponge Secondary Metabolites. *Mar. Drugs*, 9: 2423-2437

Ahmed S. A., Odde S., Daga P., Bowling J.J., Mesbah M.K., Youssef D.T., Khalifa S.I., Doerksen R.J., Hamann M.T. 2007. Latrunculin with a highly oxidized thiazolidinone ring: structure assignment and actin docking. *Org. Lett.* 9: 4773

Amnuoypol S., Suwanborirux K., Pummangura S., Kubo A., Tanaka C., Saito N. 2004. Chemistry of renieramycins. Part 5. Structure elucidation of renieramycin-type derivatives O, Q, R, and S from thai marine sponge *Xestospongia* species pretreated with potassium cyanide., *J. Nat. Prod.*, 67: 1023

Calcul L., Longeon A., Mourabit A. A., Guyot M., Bourguet-Kondracki M. L. 2003. Novel alkaloids of the aaptamine class from an Indonesian marinesponge of the genus *Xestospongia*. *Tetrahedron* 59: 6539

Cao S., Foster C., Brisson M., Lazo J.S., Kingston D.G. 2005. Halenaquinone and xestoquinone derivatives, inhibitors of Cdc25B phosphatase from a *Xestospongia* sp. *Bioorg Med Chem.*, 999: 1003

Cerqueira F., Watanadilok R., Sonchaeng P., Kijjoa A., Pinto M., Quarles van Ufford H., Kroes B., Beukelman C., Nascimento M.S. 2003. Clionasterol: a potent inhibitor of complement component C1. *Planta Med.*, 69: 174

Cheenpracha S., Park E-J., Rostama B., Pezzuto J.M., Chang L.C. 2010. Inhibition of Nitric Oxide (NO) Production in Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Murine Macrophage RAW 264.7 Cells by the Norsesterterpene Peroxide, Epimuqubilin A. *Mar. Drugs*, 8: 429-437

Concepción G.P., Foderaro T.A., Eldredge G.S., Lobkovsky E., Clardy J., Barrows L.R., Ireland C.M. 1995. Topoisomerase II-mediated DNA cleavage by adocia- and xestoquinones from the Philippine sponge *Xestospongia* sp. *J. Med. Chem.*, 38: 4503

D'Auria M. V., Sepea V., D'Orsio R., Bellotta V., Debitus C., Zampella A. 2007. Isolation and structural elucidation of callipeltins J–M: antifungal peptides from the marine sponge *Latrunculia* sp. *Tetrahedron*, 63: 131–140

Edrada R.A., Heubes M., Brauers G., Wray V., Berg A., Grafe U., Wohlfarth M., Muhlbacher J., Schaumann K., Sudarsono S., Bringmann G., Proksch P. 2002. Online analysis of xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium cf. montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua*. *J Nat Prod.*, 65: 1598-604

Edrada R.A., Proksch P., Wray V., Witte L., Müller W.E., Van Soest R.W. 1996. Four new bioactive manzamine-type alkaloids from the Philippine marine sponge *Xestospongia ashmorica*. *J. Nat. Prod.*, 59: 973

Ellman G. L., Courtney D., Anders V., Featherstone R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.*, 7: 88-95

Fenical W. 2006. Marine pharmaceuticals: Past, present and future. *Oceanography*, 19, 2: 110-119

Ford J., Capon R. 2000. Discorhabdin R: A New Antibacterial Pyrroloiminoquinone from Two Latrunculiid Marine Sponges, *Latrunculia* sp. and *Negombata* sp. *J. Nat. Prod.*, 63: 1527-1528

Fusetani N. 2000. Introduction. V: *Drugs from the Sea*. Fusetani N (ur.). Basel, Karger: 1-5

Genta- Jouve G., Francezon N., Puissant A., Auburger P., Vacelet P., Perez T., Fontana A., Mourabite A., Thomas O.P. 2011. Structure elucidation of the new citharoxazole from the Mediterranean deep-sea sponge *Latrunculia (Biannulata) citharistae*. *Magn. Reson. Chem.*, 49: 533-536

Gordaliz M. 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical & Translational Oncology*, 9, 12: 767-776

Gunasekera S.P., Gunasekera M., Longley R.E., Schulte G.K. 1990. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Org. Chem.*, 55: 4912–4915

Haefner B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8, 12: 536-543

Harrison B., Talapatra S., Lobkovsky E., Clardy J., Crews P. 1996. The structure and biogenetic origin of (-) halicyclamine B from a *Xestospongia* sponge. *Tetrahedron Lett.*, 37: 9151

Hu G., Yuan J., Sun L., She Z., Wu J., Lan X., Zhu X., Lin Y., Chen S. 2011. Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008. *Mar. Drugs*, 9: 514-525

Ito M., Yamanaka M., Kutsumura N., Nishiyama S. 2004. Total synthesis of eurypamides, marine cyclic-isodityrosines from the Palauan sponge *Microciona eurypa*. *Tetrahedron*, 60: 5623

Iwagawa T., Kaneko M., Okamura H., Nakatani M., Van Soest R.W., Shiro M. 2000. A new quinolizidine alkaloid from the Papua New Guinean sponge *Xestospongia exigua*. *J. Nat. Prod.* 63: 1310

Jimenez C., Crews P. 1990. Novel Marine Sponge Amino Acids, 10. Xestoaminoh from *Xestaspongia* sp. *J. Nat. Prod.*, 53: 978

Kashman Y., Groweiss A., Shmueli U. 1980. Latrunculin, a new 2-thiazolidinone macrolide from the marine sponge *Latrunculia magnifica*. *Tetrahedron Lett.*, 21: 3629–3632

Kato Y., Fusetani N., Matsunaga S., Hashimoto K., Fujita S., Furuya T. 1986. Bioactive marine metabolites. Part 16. Calyculin A. A novel antitumor metabolite from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 2780–2781

Kelecom A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74, 1: 151-170

Kobayashi J., Naitoh K., Ishida K., Shigemori H., Ishibashi M. 1994. Nepheliosyne A, new C47 acetylenic acid from the Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *J. Nat. Prod.*, 57: 1300-1303

Kobayashi M., Shimizu N., Kitagawa I., Kyogoku Y., Harada N., Uda H. 1985. Absolute stereostructures of halenaquinol and halenaquinol sulfate, pentacyclic hydroquinones from the okinawan marine sponge *Xestospongia sapra*, as determined by theoretical calculation of CD spectra. *Tetrahedron Lett.*, 26: 3833

Kobayashi M., Chen Y.-J., Aoki S., In Y., Ishida T., Kitagawa I. Four new β -carboline alkaloids isolated from two Okinawan marine sponges of *Xestospongia* sp. and *Haliclona* sp. *Tetrahedron*, 51: 3727

Kubo A., Kitahara Y., Nakahara S. 1989. Synthesis of new isoguinolinequinone metabolites of a marine sponge, *Xestospongia* sp., and the nudibranch *Jorunna funebris*. *Chem. Pharm. Bull.*, 37: 1384

Kubota T., Kon Y., Kobayashi J. 2008. Xestosaprol C, a New Pentacyclic Hydroquinone Sulfate from a Marine Sponge *Xestospongia sapra*. *Heterocycles*, 76: 1571

Lang G., Pinkert A. Blunt J. W., Munro M. 2005. Discorhabdin W, the First Dimeric Discorhabdin. *J. Nat. Prod.*, 68: 1796-1798

Lebar M.D., Heimbegner J.L., Baker B.J. 2007. Cold-water marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 24: 774–797

Lerch M. L., Faulkner D. J. 2001. Unusal polyoxygenated sterols from a Philippine sponge *Xestospongia* sp. *Tetrahedron*, 57: 4091

Liu D., Xu J., Jiang W., Deng Z., de Voogd N.J., Proksch P., Lin W. 2011. Xestospongienols A–L, Brominated Acetylenic Acids from the Chinese Marine Sponge *Xestospongia testudinaria*. *Helvetica Chimica Acta.*, 94: 9

Makareva T. N., Krasokhin V. B., Guzii A. G., Stonik V. A. 2010. Strong ethanol solvate of Discorhabdin A isolated from the far-east sponge *Latruculia oparinae*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46: 1

Mansoor T. A., Lee Y.M., Hong J., Lee C.-O., Im K. S., Jung J.H. 2006. 5,6:8,9-diepoxy and other cytotoxic sterols from the marine sponge *Homaxinella* sp. *J. Nat. Prod.*, 69: 131

May R.M. 1988. How many species are there on Earth? *Science* 241, 4872: 1441-1449

Moon S.S., MacMillan J.B., Olmstead M.M., Ta T.A., Pessah I.N., Molinski T.F. 2002. (+)-7S-Hydroxyxestospongina A from the marine sponge *Xestospongia* sp. and absolute configuration of (+)-xestospongina D. *J. Nat. Prod.*, 65: 249

Müller W. E. G., Schröder H. C., Wiens M., Petrović-Ottstadt S., Batel R., Müller I. M. 2004, Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part II-the Benefits, *eCAM*, 1(2)133-144

Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 7: 1022-1037

Northcote P., Andersen R.J. 1989. Xestovanin A and Secoxestovanin A, Triterpenoid Glycosides With New Carbon Skeletons from the Sponge *Xestospongia vanilla*. *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 6276-80

Oku N., Nagai K., Shindoh N., Terada Y., Van Soest R.W., Matsunaga S., Fusetani N. 2004. Three new cyclostelletamines, which inhibit histone deacetylase, from a marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 2617

Orabi K.Y., El Sayed K.A., Hamann M.T., Dunbar D.C., Al-Said M.S., Higa T., Kelly M. 2002. Araguspongines K and L, new bioactive bis-1-oxaquinolizidine N-oxide alkaloids from Red Sea specimens of *Xestospongia exigua*. *J. Nat. Prod.*, 65: 1782

Patil A.D., Kokke W.C., Cochran S., Francis T.A., Tomszek T., Westley J.W. 1992. Brominated polyacetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia muta*: inhibitors of HIV protease. *J. Nat. Prod.*, 55: 1170

Perry N.B., Blunt J.W., Munro M. 1988. Cytotoxic pigments from new zealand sponges of the genus *Latrunculia* : discorhabdins a, b and c. *Tetraedron*, 44, 6: 1727–1734

Pettit G. R., Cichacz Z. A., Gao F., Herald C. L., Boyd M. R., Schmidt J. M., Hooper J. N. A. 1993. Isolation and Structure of Spongistatin. *Journal of Organic Chemistry*, 58: 1302-1304

Pham N.B., Butler M.S., Hooper J.N., Moni R.W., Quinn R.J. 1999. Isolation of xestosterol esters of brominated acetylenic fatty acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *J. Nat. Prod.*, 62: 1439

Qian P. Y., Bobretsov S., Dahms H. U., Pawlik J. 2006. Antifouling activity and microbial diversity of two congeneric sponges *Callyspongia* spp. from Hong Kong and the Bahamas. *Marine Ecology Progress Series*, 324: 151-165

Qureshi A., Faulkner D. J. 1999. Haplosamates A and B: New steroidal sulfamate esters from two haplosclerid sponges. *Tetrahedron*, 55: 8323

Ravichandran S., Kathiresan K., Balaram H. 2007. Anti-malarials from marine sponges. *Academic Journals*, 2: 33-38

Reyes F., Martin R., Rueda A., Fernandez R., Montalvo D., Gomez C., Sanchez-Puelles J. 2004. Discorhabdins I and L, Cytotoxic Alkaloids from the Sponge *Latrunculia brevis*. *J. Nat. Prod.*, 67: 463-465

Rezanka T., Dembitsky V. M. 2003. Ten-Membered Substituted Cyclic 2-Oxecanone (Decalactone) Derivatives from *Latrunculia corticata*, a Red Sea Sponge. *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 2144

Roll D. M., Scheuer P. J., Matsumoto G. K., Clardy J. 1983. Halenaquinone, a pentacyclic polyketide from a marine sponge. *J. Am. Chem. Soc.*, 105: 6177

Ruppert E. E., Barnes R. D. 1996. *Invertebrate Zoologie*. 6th edition. ZDA, Harcourt College Publishers: 1056 str.

Sayed K.A., Khanfar M.A., Shallal H.M., Muralidharan A., Awate B., Youssef D.T., Liu Y., Zhou Y.D., Nagle D.G., Shah G. 2008. Latrunculin A and its C-17-O-carbamates inhibit prostate tumor cell invasion and HIF-1 activation in breast tumor cells. *J Nat Prod.*, 71: 396-402

Sepčić K., Batista U., Vacelet J., Maček P., Turk T. 1997. Biological Activities of Aqueous Extracts from Marine Sponges and Cytotoxic Effects of 3-Alkylpyridinium Polymers from *Reniera sarai*. *Comparative biochemistry and physiology*, 117C, 1: 47-53

Sepčić K., Kauferstein S., Mebs D., Turk T. 2010. Biological Activities of Aqueous and Organic Extracts from Tropical Marine Sponges. *Mar. Drugs*, 8: 1550-1566

Sepčić, K. 2008. Zdravila iz morja : prvaki so spužve, ki so prave "kemične tovarne". *Znanost (Ljubl.)*, let. 50, št. 77, str. 20

Sepea V., D'Orsi R., Borbone N., D'Auria M. V., Bifulco G., Monti M. C., Catania A., Zampella A. 2006. Callipeltins F–I: new antifungal peptides from the marine sponge *Latrunculia* sp. *Tetrahedron*, 62: 833

Shimura H., Iguchi K., Yamada Y., Nakaike S., Yamagishi T., Matsumoto K., Yokoo C. 1994. Aragusterol C: a novel halogenated marine steroid from an Okinawan sponge, *Xestospongia* sp., possessing potent antitumor activity. *Experientia*, 50: 134

Shoji N., Umeyama A., Shin K., Takeda K., Arihara S., Kobayashi J., Takei M. 1992. Two unique pentacyclic steroids with cis C/D ring junction from *Xestospongia bergquistia* Fromont, powerful inhibitors of histamine release. *J. Org. Chem.*, 57: 2996

Simmons T. L., Andrianasolo E., McPhail K., Flatt P., Gerwick W. H. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4, 2: 333-341

Sipkema D., Franssen M. C. R., Osinga R., Tramper J., Wijffels R. H. 2005. Marine Sponges as Pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7: 142-162

Suwanborirux K., Amnuoyopol S., Plubrukarn A., Pummangura S., Kubo A., Tanaka C., Saito N. 2003. Chemistry of renieramycins. Part 3.(1) isolation and structure of stabilized renieramycin type derivatives possessing antitumor activity from Thai sponge *Xestospongia* species, pretreated with potassium cyanide. *J. Nat. Prod.*, 66: 1441

Tasdemir D., Marshall K.M., Mangalindan G.C., Concepcion G.P., Barrows L.R., Harper M.K., Ireland C.M. 2001. Deoxyamphimedine, a New Pyridoacridine Alkaloid from Two Tropical *Xestospongia* Sponges. *J. Org. Chem.*, 66: 3246

Tsukamoto S., Takahashi M., Matsunaga S., Fusetani N., Van Soest R.W. 2000. Hachijodines A-G: seven new cytotoxic 3-alkylpyridine alkaloids from two marine sponges of the genera *Xestospongia* and *Amphimedon*. *J. Nat. Prod.*, 63: 682

Turk T. 2007. Pod gladino Mediterana. 1. izdaja. Ljubljana, Založba Modrijan: 590 str.

Vilozny B., Amagata T., Mooberry S. L., Crews P. 2004. A New Dimension to the Biosynthetic Products Isolated from the Sponge *Negombata magnifica*. *J. Nat. Prod.*, 67: 1055

White J. D., Kawasaki M. 1992. Total synthesis of (+)-latrunculin A, an ichthyotoxic metabolite of the sponge *Latrunculia magnifica* and its C-15 epimer. *J. Org. Chem.*, 57: 5292

Wilkins S.P., Blum A.J., Burkepile D.E., Rutland T.J., Wierzbicki A., Kelly M., Hamann M.T. 2002 Isolation of an antifreeze peptide from the Antarctic sponge *Homaxinella balfourensis*. *Cell Mol. Life Sci.*, 59: 2210–2215

Williams D.E., Craig K.S., Patrick B., McHardy L.M., Van Soest R., Roberge M., Andersen R.J. 2002. Motuporamines, anti-invasion and anti-angiogenic alkaloids from the marine sponge *Xestospongia exigua* (Kirkpatrick): isolation, structure elucidation, analogue synthesis, and conformational analysis. *J. Org. Chem.*, 67: 245

Yasuhara J., Lu Y. 2008. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral research*, 3: 231-240

Zampella A., Randazzo A., Borbone N., Luciani S., Trevisi L., Debitus C., D'Auria M. V. 2002. Isolation of callipeltins A–C and of two new open-chain derivatives of callipeltin A from the marine sponge *Latrunculia* sp. A revision of the stereostructure of callipeltins. *Tetrahedron Lett.*, 43: 6163

Zhou X., Xub T., Yanga X.W, Huanga R., Yanga B., Tange L., Liu Y. 2010. Chemical and Biological Aspects of Marine Sponges of the Genus *Xestospongia*. *Chemistry & Biodiversity*, 7: 2201

ZAHVALA

Ob koncu svojega študija bi se iskreno rad zahvalil ljudem, ki so imeli največ zaslug, da sem brez večjih težav opravil vse študijske obveznosti.

Najprej bi se rad zahvalil svoji mentorici prof. dr. Kristini Sepčić, ki mi je vedno stala ob strani in mi pomagala v vsakem trenutku ko sem jo potreboval. Bila mi ni le mentorica, ampak prijateljica na katero sem se lahko vedno zanesel. Hvala ti Kristina za vse kar si me naučila in za tvojo dobrosrčnost, ki ne pozna meja.

Za pomoč, koristne nasvete in prijaznost se prav tako zahvaljujem dr. Tjaši Danevčič s Katedre za mikrobiologijo, oddelka za živilstvo, kjer sem opravil del svoje naloge.

Za pregled in popravke bi se rad zahvalil recenzentu prof. dr. Tomu Turku in predsednici komisije doc. dr. Poloni Zalar.

Rad bi se tudi zahvalil svoji družini, ki mi je prav tako tekom študija vedno stala ob strani, posebno v trenutkih ko sem jih najbolj potreboval. Brez vaše moralne in finančne pomoči mi ne bi nikoli uspelo študirati v tujini in se udeleževati na vseh obštudijskih področjih, kot sem se tekom celotnega študija.

Za konec pa bi se še rad zahvalil Metki za vse potrpljenje in oporo, ki mi je namenila tekom zadnjega leta študija in časa izdelave diplomske naloge. Zahvala gre tudi vsem ostalim, ki tu niso omenjeni, a so na kakršenkoli način prispevali k nastanku diplomskega dela.

PRILOGE

Priloga A: Pregled objav

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Homaxinella</i> sp.	5,6:8,9-Diepoksi steroli	Polioksgenirani steroli	Metanol	Proti celičnim linijam različnih tumorjev	Mansoor in sod., 2006
Microcionidae	Euripamidi A in B	Ciklični peptidi	Ni podatka	Zavirajo kopičenje lipidnih kapljic v makrofagih	Ito in sod., 2004
<i>Latrunculia</i> sp.	Kalipeltini A - C	Aciklični peptidi	Etanol	Protiglivična in anti-HIV aktivnost, zaviralec Na ⁺ / Ca ²⁺ izmenjevalca, pozitiven inotropni agent v levem atriju morskega prašička, citotoksičnost proti KB celicam	Zampella in sod., 2002
	Kalipeltini F - I	Aciklični peptidi	Metanol	Protiglivično delovanje proti glivi <i>Candida albicans</i>	Sepe in sod., 2006
	Kalipeltini J - M	Aciklični peptidi	Metanol	Protiglivično delovanje proti <i>C. albicans</i> in citotoksična aktivnost proti L16 celicam	D'Auria in sod., 2007

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	Diskorabdin A	Policiklični alkaloidi	Etanol	Močan citotoksin proti tumorskim celicam, zavira karcinome mišjih Erlich celic	Makareva in sod, 2010
	Diskorabdin B	Policiklični alkaloidi	Ni podatka	Močno citotoksičen in protimikroben	Perry in sod., 1988
	Diskorabdin C, E	Piroliminokinoninski alkaloidi	Metanol	Citotoksičnost proti celicam opičjih ledvic in P388 mišjih levkemičnih celic. Antimikrobno delovanje proti Gram + in Gram - bakterijam in glivam	Copp in sod., 1994
	Diskorabdin W, D	Piroliminokinoninski alkaloidi	Metanol/ Diklorometan (1:1)	Delovanje proti mišjim levkemičnim celicam. Protimikrobno in protitumorsko delovanje	Lang in sod., 2005
	Diskorabdin I, L	Piroliminokinoninski alkaloidi	2-propanol	Citotoksičnost proti tumorskim celičnim linijam.	Reyes in sod., 2004
	Diskorabdin R	Piroliminokinoninski alkaloidi	Etanol	Protibakterijsko delovanje	Ford in sod., 2000
	Latrunkulosid A - B	Dekalaktonski glikozidi	Butanol	Inhibicija prehranjevanja zlatih ribic	Rezanka in sod., 2003
	Latrunkuleična kislina	Poliketid makrocikličnega in triazolidnega obroča	Metanol	Potencialni terapevtik, molekularne sonde v raziskavah citoskeleta	Vilozny in sod., 2004

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	Oksalatrunkulin B	Heterocikel s triazolidnim obročem	Metanol/ Diklorometan	Inhibicija aktina, delovanje proti glivam in proti raku	Ahmed in sod., 2007
	Latrunkulin A	Ketidne aminokisliline	Ni podatka	Zavira tumorske celice prostate, aktivacija celic raka prsi	El Sayed in sod., 2008
	Latrunkulin A in B	Ketidne aminokisliline	Petrolejski eter	Učinki na celične linije mišjih nevroblastov in fibroblastov, povzročijo reorganizacijo mikrofilamentov v celicah	Kashman in sod., 1980
	(+)-latrunkulin A (+)-latrunkulin B Latrunkulina C in M	Ketidne aminokisliline	Ni podatka	Povzroči reverzibilne spremembe v morfolgiji celic, ogrozi organizacijo mikrofilamenov, in zavira posredovanje mikrofilamentov med celično delitvijo	Smith in sod., 1992
	(+)-latrunkulin A (1) (+)-1Bepilatrunkulin A	Ketidne aminokisliline, knjugirani dieni	Ni podatka	Močan zaviralec mikrofilamentov med celično delitvijo	White in sod., 1992
	Citarokszazol	Aromatični alkaloid	Etanol	Citotoksično delovanje	Genta - Jouve in sod., 2011

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	Epimikubilin A	Norsesterterpenski peroksid	Metanol/ Diklorometan (1:1) in metanol	Zaviranje proizvodnje NO, protivnetni agensi	Cheenpracha in sod. 2010
	Mukubilon B				
	Epimukubilin B				
	Sigmosceptrelin A				
	metil ester				
	Sigmosceptrelin A				
	Sigmosceptrelin B				
	metil ester				
	Trunkulina A in B	Norsesterterpenski ciklični peroksidi	Etanol	Protimikrobna aktivnost	Capon in sod., 1987

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Xestospongia sp.	Renieron	Alkaloidi - Izokinolinski kinoni	Aceton in Metanol	Aktiven proti Gram + bakterijam <i>Bacillus subtilis</i> in <i>Staphylococcus aureus</i> . Prav tako deluje proti plesni <i>Cladosporium cucumerinum</i>	Edrada in sod., 1996
	7-Metoksi-1,6- dimetilisokinolin-5,8- dion				
	N-Etilen metil keton derivat renierona				
	Renierol acetat	Alkaloidi - Izokinolinski kinoni	Ni podatka	Protitumorska dejavnost	Kubo in sod., 1989
	Renierol propionat, N- formil-1,2- dihidrorenierol acetat				
	N-formil-1,2- dihidrorenierol propanoat				

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Renieramicin M	Alkaloidi - Izokinolinski kinoni	Metanol	Kažejo močno citotoksičnost in protitumorsko aktivnost	Suwanborirux in sod., 2003
Renieramicin G				
Renieramicin N				
Renieramicin O - S	Alkaloidi - Izokinolinski kinoni	Etil acetat	Citotoksičnost, protitumorske spojine	Amnuoyopol in sod., 2004
Hacijodini A - G	Alkaloidi – 3- Alkilpiridinski Alkaloidi	Metanol	Citotoksični proti celicam mišje levkemije	Tsakamoto in sod., 2000
Ciklosteletamin A	Alkaloidi – 3- Alkilpiridinski Alkaloidi	Etanol	Zavirajo človeške levkemične celice	Oku in sod., 2004
Ciklosteletamin G				
Dehidro- ciklosteletamin D				

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	Haliciklamin B	Alkaloidi – 3- Alkilpiridinski Alkaloidi	Metanol	Protimikrobna aktivnost, selektivna citotoksičnost proti tumorskim celicam	Harrison in sod., 1996
	Ksestomanzamin A, B, X	Alkaloidi – β - Kربولinski Alkaloidi	Aceton	Citotoksičnost proti KB celicam	Kobayashi in sod., 1995
	Manzamin A, Manzamin J, 3,4- Dihidromanzamin A 6-Deoksimanzamin X Manzamin A N-oksid Manzamin J N-oksid 3,4-Dihidromanzamin A N-oksid	Alkaloidi – β - Kربولinski Alkaloidi	Aceton in Metanol	Insekticidna aktivnost, delujejo proti Gram + bakterijam, citotoksičnost	Edrada in sod., 1996

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

(+)-3b,3'b-Dimetilksestospongin	Alkaloidi – Makrolitični Kinolizidini	Metanol	Protiglivično delovanje proti glivi <i>Candida</i> spp.	Moon in sod., 2002
(+)-(7S)-Hidroksiksestospongin A				
(+)-Araguspongin K, L	Alkaloidi – Makrolitični Kinolizidini	Etanol	Protimalarična in protituberkulozna aktivnost	Orabi in sod., 2002
Ksestosin A	Alkaloidi – Makrolitični Kinolizidini	Metanol	Vazodilatorna in ihtiotoksična aktivnost	Iwagawa in sod., 2000
Motuporamin A- I	Alkaloidi	Metanol	Zavira celično gibanje, citotoksična aktivnost	Williams in sod., 2002
Aaptamin	Alkaloidi	Metanol	Citotoksičnost proti KB celicam	Calcul in sod., 2003
Izoaaptamin				
Demetil(oksi)aaptamin				

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	Dimetilketal aaptamin				
	Benzo[de][1,6]naptirid in derivat A - derivat D				
	Ampimedín Neoampimedín Deoksiampimedín	Alkaloidi	Metanol in Metanol/ Kloroform	Citotoksičnost proti različnim vrstam tumorjev	Tasdemir in sod., 2001
	Halenakinon	Kinoni	Ni podatka	Kardiotonična aktivnost	Roll in sod., 1983
	Halenakinol Halenakinol sulfat	Kinoni	Ni podatka	Kardiotonične aktivnosti	Kobayashi in sod., 1985
	Ksestokinon	Kinoni	Metanol– Diklorometan	Inhibicija cdc25b fosfataze	Cao in sod., 2005

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	Adociakinon A - B Sekoadociakinon A -B 14- Metoksiksestokinon 15- Metoksiksestokinon 15-Kloro-14- hidroksiksestokinon 14-Kloro-15- hidroksiksestokinon 41	Kinoni	Metanol	Citotoksične aktivnosti, poskusi <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> kažejo na protitumorsko aktivnost pri živalih, citotoksičnost proti človeškem tumorju debelega črevesa	Concepcion in sod., 1995
--	---	--------	---------	--	--------------------------

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

3-Ketoadociakinon A - B	Kinoni	Ni podatka	Strupeni v človeških tumorskih celicah debelega črevesa, citotoksična aktivnost	Cao in sod., 2005
13-O-Metilksesestokinol sulfat				
Ksesosaprol C	Kinoni	Metanol	Inhibitor virusa HIV	Kubota in sod., 2008
Ksestovanin A	Terpenoidi	Metanol	Protiglivično delovanje proti <i>Pythium ultimum</i>	Northcote in sod. 1989
Sekoksestovanin A				
Klionasterol	Steroli, konvencionalni steroli	Ni podatka	Inhibitor CP celic	Cerqueira in sod., 2003
Ksestokerol A- B	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Protimikrobno delovanje proti bakterijam	Kobayashi in sod., 1993
Aragusterol A	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Močan protitumorski sterol	Iguchi in sod. 1993

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Aragusterol B Aragusterol D (Ksestokerol C)	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Antiproliferativna aktivnosti proti KB celicam <i>in vitro</i> (aragusterol d nima tega učinka)	Iguchi in sod. 1993
Aragusterol C	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Protitumorska aktivnost	Shimura in sod., 1994
Haplosamat A - B	Steroli – Polihidroksi steroli	Metanol	Inhibicija HIV-1 integraze	Qureshi in sod., 1999
Ksestobergsterol A - B	Steroli – Polihidroksi steroli	Ni podatka	Zavira sproščanje histamina iz podganjih celic, citotoksičnost proti celicam I-1210 mišje levkemije	Shoji in sod., 1992
Ibisterol sulfat B -C (22S)-4b,5b-Epoksi-2b,3a,12b,22-tetrahidroksi-14a-metilholesta-7,9(11)-diene-6,24-dion	Steroli – Polihidroksi steroli	Metanol	Inhibicija HIV-1 integraze	Lerch in sod., 2001

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	5a,8a-Epidioksi-24a- etilholest-6-en-3b-ol	Drugi steroli	Ni podatka	Inhibitor CP celic	Cerqueira in sod., 2003
	Ksesterol (9E,17E)-18- bromooctadeca-9,17- diene-7,15-dinoat Ksesterol (9E,17E)- 18-bromooktadeka- 9,17-dien-5,7,15- trinoat	Drugi steroli	Diklorometan	Inhibicija vezave ligandov na možganske podganje A1 receptorje	Pham in sod., 1999
	Ksestospongienol A – L	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Metanol	Protiglivični in protimikrobni učinki, zaviranje HIV-1 integraze, citotoksičnost	Liu in sod., 2011
	(9E,13E,17E)-18- Bromooktadeka- 9,13,17-trien-5,7,15- trinoična kislina	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	Metil (9E,13E,17E)-18-bromooktadeka-9,13,17-trien-5,7,15-trinoat	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	(7E,13E,17E)-18-Bromooktadeka-7,13,17-trien-5,15-dinoična kislina	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	Metil (7E,13E,17E)-18-bromooktadeka-7,13,17-trien-5,15-dinoat	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	(9E,17E)-18-Bromooktadeka-9,17-dien-5,7,15-trinoična kislina	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

	(9E,15E)-16-Bromoheksadeka-9,15-dien-5,7-dinoična kislina	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	Metil (9E,15E)-16-bromoheksadeka-9,15-dien-5,7-dinoat	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	(9E,17E)-18-Bromooktadeka-9,17-dien-5,7-dinoična kislina	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	Metil (9E,17E)-18-bromooktadeka-9,17-dien-5,7-dinoat	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

<p>Metil (9E,17E)-18-bromooktadeka-9,17-dien-5,7-dinoat</p> <p>(9E,15E)-18-Bromooktadeka-9,15-dien-5,7,17-trinoična kislina</p>	<p>Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline</p>	<p>Etil acetat</p>	<p>Inhibicija HIV proteaze</p>	<p>Patil in sod., 1992</p>
<p>Nefeliosin A</p>	<p>Maščobne kisline – druge</p>	<p>Metanol, etil acetat in voda</p>	<p>Protiglivično delovanje, citotoksičnost, protivirusna aktivnost</p>	<p>Kobayashi in sod., 1994</p>
<p>2-okso-2,5-dihidrofuran-5-ocetna kislina metil ester</p> <p>Ksestin A -B</p>	<p>Maščobne kisline – druge</p>	<p>Diklorometan</p>	<p>Aktivna spojina proti P388 celicam mišje levkemije</p>	<p>Quinoa in sod., 1986</p>
<p>Ksestoaminol A - C</p>	<p>Maščobne kisline – druge</p>	<p>Metanol</p>	<p>Aktivnosti proti parazitom, mikrobom in reverzni transkriptazi</p>	<p>Jimenez in sod., 1990</p>