

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Metka LOTRIČ

**VPLIV ETANOLNIH EKSTRAKTOV
KARIBSKIH IN AVSTRALSKIH MORSKIH
SPUŽEV NA AKTIVNOST GLUTATION S-
TRANSFERAZE IN ENCIMOV IZ SKUPINE
HOLINESTERAZ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Metka LOTRIČ

**VPLIV ETANOLNIH EKSTRAKTOV KARIBSKIH IN
AVSTRALSKIH MORSKIH SPUŽEV NA
AKTIVNOST GLUTATION S-TRANSFERAZE IN
ENCIMOV IZ SKUPINE HOLINESTERAZ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SCREENING OF ETHANOLIC EXTRACTS FROM
CARIBBEAN AND AUSTRALIAN MARINE
SPONGES FOR GLUTATHIONE S-TRANSFERASE
AND CHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Celotno delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, Oddelku za biologijo, Katedri za biokemijo.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorico doc. dr. Andrejo Ramšak in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Anita JEMEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: 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

Članica: doc. dr. Andreja RAMŠAK

Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja

Datum zagovora: 14.09.2016

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Metka Lotrič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du1

DK 593.4:6(043.2)=163.6

KG karibske in avstralske morske spužve/biološko aktivne snovi/antioksidativna aktivnost/hemolitična aktivnost/acetilholinesteraza/butirilholinesteraza/glutation S-transferaza/Alzheimerjeva bolezen/rak

AV LOTRIČ, Metka

SA SEPČIĆ, Kristina (mentorica)/RAMŠAK, Andreja (somentorica)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2016

IN VPLIV ETANOLNIH EKSTRAKTOV KARIBSKIH IN AVSTRALSKIH MORSKIH SPUŽEV NA NA AKTIVNOST GLUTATION S-TRANSFERAZE IN ENCIMOV IZ SKUPINE HOLINESTERAZ

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XI, 57 str., 10 preg., 16 sl., 1 pril., 138 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Prilagoditev morskih spužev (Porifera) na sesilni način življenja v močno biodiverzitetnem okolju je produkcija številnih sekundarnih metabolitov, ki jim služijo za obrambo, zaščito in prehranjevanje. Iz spužev izolirane snovi predstavljajo skoraj polovico vseh farmakološko aktivnih učinkovin morskega izvora. Mnoge med njimi so potencialne učinkovine za boj proti raku in alzheimerjevi bolezni. V zadnjih letih se raziskave novih zdravil usmerjajo v iskanje učinkovin, ki bi delovale hkrati na več celičnih mehanizmov. Zato smo v sklopu diplomskega dela testirali etanolne ekstrakte avstralskih in karibskih morskih spužev (skupaj 66 vzorcev) na več različnih bioloških aktivnosti. Uporabili smo teste inhibicije acetilholinesteraze (AChE), butirilholinesteraze (BChE) in glutation S-transferaze (GST) ter hkrati preverili antioksidativno in hemolitično aktivnost vzorcev. Najboljše rezultate inhibicije AChE in BChE ter hemolitične aktivnosti smo zabeležili pri vrsti *Agelas clathrodes*. GST je inhibiralo 7 ekstraktov, med njimi izstopajo vzorci vrste *Pseudoceratina crassa*. Močno antioksidativno aktivnost smo opazili le pri ekstraktu nedeterminirane karibske spužve. Avstralske spužve so se pri vseh testih izkazale za manj aktivne kot karibske.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du1

DC 593.4:6(043.2)=163.6

CX Caribbean and Australian marine sponges/biologically active compounds/
antioxidative activity/hemolytic activity/acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase/
glutathione S-transferase/Alzheimer's disease /cancer

AU LOTRIČ, Metka

AA SEPČIĆ, Kristina (mentorica)/RAMŠAK, Andreja (somentorica)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of biology

PY 2016

TI SCREENING OF ETHANOLIC EXTRACTS FROM CARIBBEAN AND
AVSTRALIAN MARINE SPONGES FOR GLUTATHIONE S-TRANSFERASE
AND CHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 57 p., 10 tab., 16 fig., 1 ann., 138 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Marine sponges (Porifera) are sessile metazoans living in highly biodiverse environment. They consequently produce large number of different secondary metabolites that serve them mostly for predation and for antifouling purposes. Sponge derivatives represent almost half of all pharmacologically active substances of marine origin. Many of them have high potential as anti-cancer and anti-Alzheimer's disease drugs. In recent years, multi target drugs have become one of the primary targets in the field of drug research. Therefore, we tested 66 ethanolic extracts obtained from 18 marine sponge species from the Caribbean Sea (Curaçao) and 7 species from the Great Barrier Reef (Lizard Island) on several biological activities. We conducted anti-acetylcholinesterase (AChE), anti-butyrylcholinesterase (BChE) and anti-glutathione S-transferase (GST) tests, while also examining the antioxidant and haemolytic activity of these extracts. The most interesting activities were obtained with extracts of *Agelas clathrodes*, where the strongest AChE-inhibitory, BChE-inhibitory and hemolytic activities were observed. Samples from *Pseudoceratina crassa* had the highest GST inhibiting activity. Strong antioxidant activity was found only in an extract of the undetermined Caribbean sponge. Australian sponges were proved to be less active than the Caribbean ones.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NARAVNI PRODUKTI IZ MORSKIH ORGANIZMOV	3
2.2 MORSKE SPUŽVE IN NJIHOVI METABOLITI	3
2.3. ALZHEIMERJEVA BOLEZEN IN HOLINSTERAZE KOT TARČE ZDRAVIL	5
2.3.1 Alzheimerjeva bolezen	5
2.3.2 Acetilholinesteraza – AChE	7
2.3.3 Butirilholinesteraza – BChE	8
2.3.4 Holinesteraze kot tarče zdravil	8
2.4. RAK IN GLUTATION S-TRANSFERAZA KOT TARČA PROTITUMORSKIH ZDRAVIL	9
2.5. ANTIOKSIDANTI IN NJIHOV TERAPEVTSKI POMEN	11
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 MATERIAL	12
3.1.1 Vzorci spužev	13
3.1.2 Priprava etanolnih ekstraktov	16
3.2 METODE DOLOČANJA BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI	17
3.2.1 Test inhibicije acetilholinesteraze	17
3.2.2 Test inhibicije butilholinesteraze	18
3.2.3 Test inhibicije glutation S-transferaze	18
3.2.4 Test določanja antioksidativne aktivnosti	19
3.2.5 Hemolitični test	20
4 REZULTATI	21
4.1 KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V ETANOLNIH EKSTRAKTIH	21
4.2 ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST	23
4.3 ANTIBUTILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST	25
4.4 ANTIGLUTATION S-TRANSFERAZNA AKTIVNOST	29
4.5 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	33

4.6 HEMOLITIČNA AKTIVNOST	34
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	39
5.1 RAZPRAVA.....	39
5.2 SKLEPI.....	44
6 POVZETEK.....	46
7 VIRI	47
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste in oznake spužev, nabranih na morskem grebenu otoka Curaçao (Karibsko morje).	15
Preglednica 2: Vrste in oznake spužev, nabranih na lokaciji Lizard Island (Avstralija).....	16
Preglednica 3: Masa suhe snovi v etanolnih ekstraktih morskih spužev nabranih na lokaciji Lizard Island (Avstralija).....	21
Preglednica 4: Masa suhe snovi v etanolnih ekstraktih morskih spužev nabranih na morskem grebenu otoka Curaçao (Karibsko morje).	22
Preglednica 5: Koncentracije suhe snovi v etanolnih ekstraktih karibskih in avstralskih spužev, pri katerih dosežemo 50% inhibicijo holinesteraznih encimov.....	29
Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi v etanolnih ekstraktih karibskih in avstralskih spužev, pri katerih dosežemo 50% inhibicijo glutation-S-transferaze.	32
Preglednica 7: Rezultati testa določanja antioksidativne učinkovitosti etanolnih ekstraktov karibskih spužev z DPPH`radikalom.....	33
Preglednica 8: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov karibskih spužev.	35
Preglednica 9: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov avstralskih spužev.....	36
Preglednica 10: Zasedovanje hemolize v razrečenih aktivnih ekstraktih avstralskih in karibskih morskih spužev.	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Otok Curaçao.	13
Slika 2: Otok Lizard.	14
Slika 3: Sprememba barve raztopine iz vijolične (DPPH') v blede svetlo rumeno (DPPH-H).	19
Slika 4: Delež aktivnosti acetilholinesteraze po dodatku etanolnih ekstraktov karibskih morskih spužev.	23
Slika 5: Krivulja inhibicije acetilholinesteraze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti karibskih spužev	24
Slika 6: Delež aktivnosti acetilholinesteraze po dodatku etanolnih ekstraktov avstralskih morskih spužev	24
Slika 7: Krivulja inhibicije acetilholinesteraze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti avstralskih spužev.	25
Slika 8: Delež aktivnosti butirilholinesteraze po dodatku etanolnih ekstraktov karibskih morskih spužev.	26
Slika 9: Krivulja inhibicije butirilholinesteraze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti karibskih spužev	27
Slika 10: Delež aktivnosti butirilholinesteraze po dodatku etanolnih ekstraktov avstralskih morskih spužev.	27
Slika 11: Krivulja inhibicije butirilholinesteraze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti avstralskih spužev.	28
Slika 12: Delež aktivnosti glutation-S-transferaze po dodatku etanolnih ekstraktov karibskih morskih spužev.	30
Slika 13: Krivulje inhibicij glutation-S-transferaze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti karibskih spužev.	31
Slika 14: Delež aktivnosti glutation-S-transferaze po dodatku etanolnih ekstraktov avstralskih morskih spužev.	31

Slika 15: Krivulja inhibicije glutation-S-transferaze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti avstralske spužve.	32
Slika 16: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize od koncentracije suhe snovi v etanolnih ekstraktih karibskih ter avstralskih spužev	38

KAZALO PRILOG

Priloga A: Pregled objav	2
--------------------------------	---

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AChE	acetilholinesteraza
ACh	acetilholin
AOH	antioksidant
APP	prekurzor amiloidnega proteina
BChE	butirilholinesteraza
BACE1	asparaginska proteaza
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPPH-H	difenilpikrilhidrazin
EtOH	etanol
FDA	Zvezna agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Agency)
GST	Glutation S-transferaza
GSTP1	Izoencim GST
IC₅₀	polovična inhibitorna koncentracija
MDR	Večkratna odpornost (ang. Multidrug resistance)
t₅₀	razpolovni čas hemolize
1/t₅₀	recipročni polovični čas hemolize
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organisation)

1 UVOD

Morske spužve (Porifera) so najstarejše in najenostavnejše večcelične živali na Zemlji, ki so se razvile pred več kot milijardo let. Zaradi sesilnega načina življenja so spužve začele proizvajati številne biološko aktivne sekundarne metabolite, s katerimi preprečujejo obraščanje, se branijo pred plenilci in kompetitorji ter jim rabijo za omamljanje in pljenje. Mnoge metabolite so v zadnjih dveh desetletjih že izolirali in strukturno določili. Med njimi je tudi veliko spojin, ki imajo sposobnost inhibicije terapevtsko pomembnih encimov in so posledično zanimive kot potencialna zdravila.

S staranjem prebivalstva je alzheimerjeva bolezen postala ena glavnih skrbi javnega zdravstva. Skupno število oseb z demenco v letu 2010 je ocenjeno na 35,6 milijona ljudi ter se bo po napovedih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) podvojilo vsakih 20 let. Letni stroški zdravljenja in skrbi za ljudi z demenco znašajo več kot 604 milijarde €. Do leta 2030 se pričakuje povečanje stroškov za 43% oz. za dodatnih več kot 250 milijard € (Duthey, 2013).

Poleg pojavljanja možganskih degeneracij kot so amiloidni plaki in nevrofibrilarne pentlje, je pri razvoju Alzheimerjeve bolezni ključna oslabitev delovanja holinergičnega sistema. Ti patološki znaki se značilno pojavijo na predelih možganske skorje in hipokampusu, torej na delih možgan, kjer so centri za učenje, spomin, vedenje in čustvene odzive. Oslabitev holinergičnega sistema je posledica zmanjšanja izločanja acetilholina in povečanja delovanja holinesteraz. Slednje spadajo v družino encimov, ki katalizirajo hidrolizo neurotransmiterja acetilholina (ACh) na postsinaptični membrani. Vretenčarji imajo dva encima: eden od teh je substratno dokaj nespecifična butirilholinesteraza (BChE), drugi pa substratno zelo specifična acetilholinesteraza (AChE). Fiziološka vloga prve je še vedno nejasna. Zdi se, da opravlja več nalog - detoksificira strupene holinske estre ter služi kot rezerva ob zmanjšani dejavnosti AChE v holinergičnem živčnem sistemu. Za razvoj učinkovitega zdravila proti Alzheimerjevi bolezni je iskanje novih inhibitorjev AChE ključnega pomena.

Rak je nenadzorovana rast celic, ki se lahko razširijo in napadejo celice oddaljenih delov telesa. V svetovnem merilu velja rak za enega glavnih vzrokov smrti. V letu 2012 je za posledicami rakavih obolenj umrlo 8,2 milijona ljudi, kar predstavlja 13% vseh smrti (Globocan, 2012). Glutation S-transferaze (GST) spadajo v družino izoencimov biotransformacije (druge faze detoksifikacije), pri kateri katalizirajo konjugacijo molekul z glutationom (Tew in Townsend, 2012). Glede na to, da so encimi iz družine GST specifični za različne substrate, in glede na to da sta konjugacija glutationa in peroksidazna aktivnost vključeni v detoksifikacijo številnih zdravil, danes prevladuje mnenje, da je povečana

ekspresija GST v tumorskih celicah odgovorna za odpornost teh celic na številna protitumorska zdravila. Inhibitorji GST bi zato lahko predstavljali zanimiva sredstva v boju proti raku.

Slaba učinkovitost enotarčnih zdravil je posledica bioloških mehanizmov, ki ublažijo delovanje zdravila. Posledično mnoga enotarčna zdravila ne morejo v celoti odpraviti kompleksne bolezni kot je rak. V zadnjih letih je razvoj tako napredoval, da se je število tarčnih mehanizmov enega zdravila povečalo iz 1,8 na 2,5 tarč na zdravilo. Znanost se je v zadnjih letih lotila raziskav zdravil, ki bi delovala hkrati na več celičnih mehanizmov, ki so specifični za rakovo celico. Zaradi specifičnosti delovanja, imajo omenjena zdravila manj stranskih učinkov, večje število tarč pa onemogoča razvoj odpornosti. Tradicionalna medicina že od nekdaj uporabljajo rastlinske in živalske ekstrakte, ki hkrati delujejo na več tarčnih sistemov (Zimmermann in sod., 2007; Csermely in sod., 2005)

V okviru diplomske naloge smo raziskali vpliv etanolnih ekstraktov karibskih in avstralskih morskih spužev na aktivnost AChE, BChE in GST. Za testiranja smo uporabili komercialno dostopne encime: AChE iz električne jegulje, BChE iz konjskega seruma ter GST iz konjskih jeter. Vzporedno smo opravili tudi teste antioksidativne in hemolitične aktivnosti, pri čemer ima antioksidativna aktivnost dodatno pozitiven, hemolitična aktivnost pa možni negativni učinek. Glede na dejstvo, da so morske spužve zelo bogat vir biološko aktivnih in farmakološko zanimivih sekundarnih metabolitov smo predvidevali, da bodo etanolni ekstrakti karibskih in avstralskih morskih spužev inhibirali encime AChE, BChE in GST. Predvidevamo, da bodo karibske vrste morskih spužev imele večjo aktivnost kot avstralske, saj karibsko morje predstavlja eno od »vročih točk« glede na število izoliranih in opisanih biološko aktivnih produktov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NARAVNI PRODUKTI IZ MORSKIH ORGANIZMOV

Morsko okolje predstavlja 70% zemeljske površine in je vsebuje habitate, kot so koralni grebeni, z največjo biodivezitetno na svetu. Velika biotska pestrost se odraža tudi v raznolikosti biološko aktivnih sekundarnih metabolitov, ki jih najdemo v morskih organizmih. Morski organizmi predstavljajo potencialni vir novih zdravilnih učinkovin z edinstvenimi mehanizmi delovanja (Sepčić in sod. 2010).

Prevladujoči vir naravnih morskih proizvodov so kremenaste spužve (*Porifera, Demospongiae*) in koralnjaki (*Cnidaria, Anthozoa*). Izjema so polarna območja, kjer prevladujejo iglokožci (*Echinodermata*). Biodivezitetne vroče točke, kot je Karibsko morje, poleg japonske biodiverzitetne vroče točka (zahodni del Tihega oceana) in Južno kitajskega morja, veljajo za najbolj bioproduktivna morska območja (Leal in sod., 2012).

Med leti 1960 in 2011 je bilo odkritih več kot 20.000 naravnih spojin iz morskih organizmov, od tega so jih 10.000 odkrili v zadnjem desetletju. V zadnjih letih trend izrazito narašča, vsako leto odkrijejo približno 500 novih naravnih produktov iz morskih organizmov (Hu in sod., 2011). Sesilni morski organizmi (mahovnjaki, plaščarji, ožigalkarji in spužve) so posebno bogat vir spojin s številnimi biološkimi učinki. Sesilni način življenja ter kemični odgovor na stresne dejavnike se odraža v širokem spektru biološko aktivnih sekundarnih metabolitov. Med omenjenimi organizmi so prav spužve tiste, ki so se izkazale kot prave »kemične tovarne« (Sepčić in sod. 2010).

Vse hitrejši napredek razvoja analitičnih metod, presejalnih testov visoke zmogljivosti, robotike ter visoko občutljivih detektorjev omogoča opravljanje hitrih in zanesljivih kemijskih, genetskih ter farmakoloških testov (Montaser in Luesch, 2012). Optimizacija identifikacije novih aktivnih spojin je pripeljala do porabe le nekaj miligramov vhodnega biološkega materiala. Le to je omogočilo, da so leta 1999 morski organizmi že zagotavljali večji delež bioaktivnih naravnih produktov kakor kopenski organizmi.

Prva zdravila izdelana na osnovi naravnih produktov iz morskih organizmov so prišla na trg konec šestdesetih let prejšnjega stoletja. Citarabin (odobren od Zvezne agencije za hrano in zdravila (FDA) odobren leta 1969 kot zdravilo proti raku) in Vidarabin (FDA odobren leta 1976 kot protivirusno sredstvo) sta sintetična nukleozida sintetizirana na osnovi struktur nukleozidov izoliranih iz karibske spužve *Tethya crypta*. Med zadnjimi je na trg prišel Eribulin mesilat (Halaven™; FDA odobren novembra 2010 za zdravljenje metastatskega

raka dojke), ketonski analog močno citotoksičnega halikondrina B izoliranega iz spužve *Halichondria okadai* (Montaser in Luesch, 2012).

2.2 MORSKE SPUŽVE IN NJIHOVI METABOLITI

Spužve (Porifera) so raznolika kozmopolitska skupina primitivnih metazojev s približno 5000 vrstami. Spužve so predvsem morske, izjemoma sladkovodne. Njihova telesa nimajo pravih organov, imajo pa dobro razvita vezivna tkiva, ki omogočajo agregacijo celic (Myers, P. 2001). Različne celice opravljajo različne funkcije, vendar se podobne celice ne organizirajo v tkiva.

Odrasla telesa spužev so sestavljena iz sistema por in kanalov, skozi katere se pretaka voda. Gibanje vode poganjajo specializirane celice z ovratnikom in bičkom, imenovane hoanocite. Vodni tok prinaša hrano (detritni delci, plankton, bakterije) in kisik ter odnaša presnovke ter tudi spolne celice. Odsotnost prebavil nadomesti filtriranje vode s fagocitozo ter prebavo v celicah, večinoma v hoanocitah. Rast in oblika sta močno odvisni od vodnih tokov ter podlage. Vse spužve imajo na površini telesa odprtine: male in številne so dotekalke, velike in manj številne so odtekalke.

Glede na pojavljanje hoanocit v sistemu kanalov in kamric, ločimo tri gradbene tipe spužev: askon, sikon in levkon. Najpreprostejši tip, askon, se pojavlja pri malih spužvah, kjer odsotne kanale in kamrice nadomesti ena osrednja odprtina s hoanocitami, imenovana spongocel. Bolj kompleksna tipa, sikon in levkon, težita k čim večji funkcionalni površini, manjšem deležu kanalov brez hoanocit ter optimizaciji pretoka vode skozi telo spužve. Zunanja površina spužev je prekrita s ploščatimi celicami pinakocitami. Dotekalke obdajajo porocite, ki prebavljajo hrano pri askonoidnih spužvah ter juvenilnih sikonoidnih in levkonoidnih osebkih. Pod epidermalnimi celicami je želatinasta plast, imenovana mesofil oziroma mezoglea. Sestavljajo jo amebocite (npr. skleroblasti, ki izdelujejo spužvin skelet), miociti in skelet. Le ta je sestavljen iz apnenca ali kremena (osnovni skeletni elementi – iglice oz. spikule) ter iz beljakovine spongina (sponginski skelet). Skelet je lahko trden ali prožen ter je pomemben dejavnik za taksonomsko določanje spužev. Spikule se delijo na razpršene, nepovezane mikrosklere in megasklere, ki gradijo mrežast skelet in so pri nekaterih vrstah povezane s sponginom. Nekatere spužve imajo ogrodje sestavljeno izključno iz spongina. Kljub preprosti telesni zgradbi je sestava skeleta precej zapletena.

Zaradi sesilnega načina življenja ter odsotnosti trdega zunanjega skeleta, so spužve razvile izredno pester nabor kemičnih snovi. Izločanje le teh na površino in v okolico jim omogoča obrambo pred plenilci, teritorialno obrambo ter preprečuje, da bi se na njih naselile druge

živali. (Turk, 2007). Kljub sicer učinkoviti kemični obrambi, so se številne vrste polžev gološkrjarjev (*Nudibranchia*), specializirale za prehranjevanje s spužvami. Gološkrjarji lahko zadržijo toksično kemično substanco ter jo uporabljajo za lastno zaščito (Proksch, 1994). Iz morskih spužev so osamili številne kemijsko edinstvene spojine z različnimi biološkimi aktivnostmi. Najpogostejše vrste molekul, izolirane iz spužev, so bromopiroolni alkaloidi, diterpenski alkaloidi, glikosfingolipidi in seskviterpeni. Med biološke učinke teh spojin spadajo protibakterijsko, protiglivno, protimalarijsko, protirakavo, antihistaminsko, antiholinergično, antiserotonergično delovanje in še mnoge druge aktivnosti (Trampuž, 2014). Metaboliti morskih spužev so tudi močni inhibitorji encimov, vpletenih v mehanizme bolezni kot so rak, Alzheimerjeve bolezni in ateroskleroza (Skropeta in sod., 2011).

2.3. HOLINSTERAZE KOT TARČE ZDRAVIL ZA ALZHEIMERJEVO BOLEZEN

2.3.1. Alzheimerjeva bolezen

Alzheimerjeva bolezen je progresivna nevrodegenerativna bolezen, ki neizogibno vodi v invalidnost, izgubo intelektualnih sposobnosti, vedenjske spremembe, upad splošnega zdravja in smrt (Borisovskaya in sod., 2014). Bolezen je prvi opisal dr. Alois Alzheimer leta 1907. V posmrtni histološki raziskavi pacientke Auguste Deter je našel in opisal 2 tipa možganskih degeneracij, amiloidne plake in neurofibrilarne pentlje.

Normalno procesiranje prekursorja amiloidnega proteina (APP) v membranah nevronov poteka v dveh stopnjah. Najprej encim α -sekretaza odcepi prvi del APP, nato γ -sekretaza odcepi drug del proteina (delček P3 peptid). Odcepljeni deli sodelujejo pri funkciji nevronov. V primeru Alzheimerjeve bolezni pride do sprememb v procesiranju APP. V tem primeru β -sekretaza odcepi prvi del APP na drugem mestu kot α -sekretaza. Posledično nastane zelo toksična proteina: amiloidni β -peptid 40 (A β 40) in amiloidni β -peptid 42 (A β 42). Amiloidni delci se povezujejo z vodikovimi vezmi in tvorijo β -amiloidne skupke ali plake. Le ti postajajo vedno večji, netopni ter močno citolitični (poškodujejo bližnje nevrone). Amiloidni plaki nastanejo zunaj celice. Najprej se pojavijo v korteksu nato v hipotalamusu. Centripetalno širjenje amiloidnih plakov povzroča lezije po celotnih možganih (Perl, 2010).

Neurofibrilarne pentlje nastanejo znotraj celice z modifikacijo *tau* proteina. V zdravi celici *tau* proteini stabilizirajo mikrotubule, ki igrajo pomembno vlogo v transportu hranil in drugih snovi znotraj celice. V primeru Alzheimerjeve bolezni pride do modifikacije *tau* proteinov z vezavo fosfatnih skupin. Spremenjeni proteini se odcepijo in povzročijo razpad mikrotubulov ter posledično transportnega sistema in končno razpad celotnega nevrona.

Odcepljeni proteini se združujejo v vozlje ali pentlje. Nevrofibrilarne pentlje se najprej pojavijo v hipokampusu, v katerem so centri za spomin in učenje. Centrifugalno širjenje pentelj povzroča počasno atrofijo možgan ter sovpada s kliničnimi znaki bolezni (Perl, 2010).

Prve histološke spremembe se pojavijo več kot 10 let pred kliničnimi znaki bolezni. Čeprav še vedno ni jasno zaporednje molekularnih dogodkov, predvidevajo, da pojav amiloidnih oligomerov na sinapsah prispeva k modifikaciji *tau* proteina. Degradacija holinergičnih, noradrenergičnih in serotoninergičnih sistemov privede do upada prenosa živčnega signala. Nevrodegenerativne spremembe in znižanje holinergičnega prenosa v hipokampusu vodi v motnje prehajanja kratkotrajnega v trajni spomin. Nazadnje degeneracija zajame še parietalni in temporalni predel možganov, dokler ne zajame celotnega neokorteksa. Po klinični diagnozi je pričakovana življenjska doba bolnika z Alzheimerjevo boleznijo od 5 do 8 let, izjemoma do 20 let, vendar je kvaliteta življenja takega bolnika slaba, saj so močno okrnjene njegove intelektualne sposobnosti in s tem možnost samostojnega življenja (Bracco in sod., 1984).

Bolezen je razdeljena na štiri faze, z značilnim sosledjem kognitivnih in funkcionalnih sprememb (Förstl in Kurz, 1999):

- Faza pred demenco: Bolniki ne kažejo izrazitega poslabšanja vsakodnevnih aktivnosti. Zmanjšana sposobnost opravljanja težjih nalog. Pojav socialnega umika in depresivne disforbije.
- Faza blage demence: klinična značilnost večine pacientov sta bistveno poslabšanje spomina in učenja. Zmanjša se sposobnost načrtovanja, presoje in organizacije. Pogosto se pojavi depresija.
- Faza zmerne demence: okvara kratkotrajnega spomina. Močno poslabšanje logičnega razmišljanja, načrtovanja, organiziranja, branja, pisanja in govora. Pojavi se nezmožnost prepoznavanja znanih obrazov (prosopagnosia), nemir, agresivnost, zmedenost in inkontinenca.
- Faza hude demence: oseba postane povsem nemočna, besedne komunikacije ni več. Huda okvara vseh kognitivnih funkcij. Značilna agresivnost in nemir sta lahko tudi izraza bolečine ali posledica močno motenega cirkadialnega ritma. Bolniki so apatični in izčrpani. Vzrok smrti je običajno zunanji dejavnik, kot so okužbe preležanin ali pljučnica.

Bolniki z Alzheimerjevo boleznijo kažejo značilen primanjkljaj živčnega prenašalca ACh, zlasti v bazalnem delu temporalnega režnja velikih možgan. V začetni fazi bolezni igra pomembno vlogo encim AChE, ki se večinoma nahaja v živčnih sinapsah in motoričnih ploščicah, kjer katalizira cepitev ACh (Lane in sod., 2004). Inhibicija AChE v živčnih sinapsah upočasni razgradnjo živčnega prenašalca ACh in izboljša prenos živčnega signala. Klinične študije so pokazale, da inhibicija holinesteraz predstavlja obetavno strategijo pri

zdravljenju Alzheimerjeve bolezni, saj lahko z njimi upočasnimo zmanjševanje kognitivnih in vedenjskih funkcij (Giacobini, 2004). Posledično najdemo inhibitorje AChE v večini današnjih zdravil proti Alzheimerjevi bolezni.

S staranjem prebivalstva ter potrditvijo povezave med pomakanjem ACh v možganih in Alzheimerjevo boleznijo je oživelo raziskovanje inhibitorjev AChE kot blažilca simptomov bolezni. Danes poznamo tudi številne nove terapije zdravljenja kot so terapije vezane na *tau* proteinov, terapije vezane na oksidativni stres oziroma, protivnetne terapije ter amiloidne strategije z inhibitorji β - in γ -sekretaz (Singh in sod., 2013).

2.3.2. Acetilholinesteraza – AChE

Acetilholinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) je življenjsko pomembna serinska proteaza locirana v sinaptični špranji holinergetičnih sinaps. Pri prenosu živčnega dražljaja se acetilholin sprosti iz predsiniptičnega živca v sinaptično špranjo in se veže na acetilholinski receptor na postsiniptično membrano ter tako prenese signal iz enega na drug živec ali mišico. Biološka vloga AChE je ustavitev impulza na holinergetičnih sinapsah s hidrolizo acetilholina na acetat in holin. Manjši del acetilholinskih molekul pobegne v intersticij in kri, kjer jih razgradi na eritrocite vezana AChE in serumska butirilholinesteraza. Sproščeni holin se ponovno privzame v predsiniptični živec, kjer se s pomočjo encima holinacetiltransferaze veže z acetyl koencimom-A ter ponovno tvori acetilholin. AChE ima izjemno visoko specifično katalitično aktivnost - posamezna molekula AChE razcepi okoli 25.000 molekul ACh na sekundo (Quinn, 1987). Čeprav je AChE zelo specifičen encim, je sposoben hidrolizirati tudi številne druge estre.

Glavna oblika AChE, ki se izraža v možganih in motoričnih ploščicah pri normalnih odraslih sesalcih, se sprošča kot 69 kDa monomer. Ta se lahko sestavi v dimere, tetramere ali heterooligomere (Inestrosa in sod., 1987). Aktivno mesto encima leži na dnu 20 nm globokega »aktivne zajede« in je sestavljena iz dveh podenot: anionske in estrske. Zgradbo in mehanizem delovanja acetilholinesteraze so pojasnili s pomočjo kristalne strukture encima iz električnega skata. Na anionsko podenoto se veže pozitivni kvartarni amin v molekuli acetilholina ali drugega substrata. Na esterski podenoti se acetilholin hidrolizira do acetata in holina. V aktivnem mestu encima je katalitična triada taminokislin serina, histidina in glutaminske kisline (Sussman in sod., 1991). V primerjavi z drugimi serinskimi proteazami ima AChE na tretjem mestu namesto aspartata glutamat (Tripathi in Srivastava, 2010). Na vhodu v aktivno zajedo je še eno mesto za vezavo pozitivno nabitih ligandov, ki ga imenujemo periferno anionsko mesto in rabi za usmerjanje substrata v aktivno zajedo. Na periferno anionsko mesto se lahko vežejo nekateri nekompetitivni inhibitorji AChE.

2.3.3 Butirilholinesteraza – BChE

Butirilholinesteraza (BChE; E.C. 3.1.1.8) je tetramerni glikoprotein sestavljen iz štirih enakih podenot. Vsaka podenota je sestavljena iz 574 aminokislin s skupno molekulsko maso blizu 85 kDa. Strukturna podobnost z AChE je 54% (Taylor in sod., 2007).

Medtem ko je izvor in pogostost AChE vezana predvsem na centralni živčni sistem, trombocite in membrane eritrocitov, se BChE sintetizira v jetrih ter jo najpogosteje najdemo v serumu. BChE deluje na hidrofilne in hidrofobne holinske estre ter hidrolizira različne ksenobiotike (Iwasaki in sod., 2007). BChE razstruja veliko število eksogenih snovi (npr.: kokain, heroin, acetilsalicilno kislino) in ščiti telo pred vplivi organofosfatnih inhibitorjev AChE. Molekula BChE ima višjo katalitsko sposobnost pretvorb butirilholina na sekundo kot AChE. Kljub temu glavni razlog obstoja BChE še vedno ni znan (Pohanka, 2011).

BChE ni nujno potreben za preživetje, saj njegova odsotnost ne povzroči negativnih simptomov. V možganih je BChE slabše zastopana kot v mišicah in se pojavlja predvsem izven sinaps. Predvidevajo, da BChE s hidrolizo izvensinaptičnega acetilholina zagotavlja minimalno raven holinergičnih funkcij. Descarries in sod. predlagajo možnost difuznega prenosa signala v možganski skorji, hipokampusu in neostriatumu (Descarries, 1998). Hipoteza vključuje holinske receptorje na dendritičnih membranah, ne le v sinapsah, ter je skladna z izvensinaptično hidrolizo živčnega prenašalca z BChE (Li in sod., 2000). Najverjetnejša funkcija BChE je tako nadomeščanje AChE.

2.3.4. Holinesteraze kot tarče zdravil

Holinesteraze so ključni encimi centralnega in perifernega holinergičnega živčnega sistema pri živalih. Vretenčarji imajo dve vrsti holinesteraznih encimov, acetilholinesterazo (AChE) in butirilholinesterazo (BChE). Oba encima učinkovito katalizirata hidrolizo neurotransmiterja acetilholina. Encima ločimo na osnovi substratne afinitete, tkivne porazdelitve in občutljivosti na inhibitorje (Singh in sod., 2013).

Inhibitorji holinesteraz (zdravila, naravni strupi, pesticidi, kemični bojni strupi) so široka skupina kemičnih spojin z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Inhibitorji AChE imajo pomembno vlogo v biokemičnih procesih človeškega telesa, predvsem zaradi velikega fizioloških pomen AChE. Specifični inhibitorji BChE imajo v glavnem diagnostični pomen (Pohanka, 2011). Inhibitorje holinesteraz razdelimo na dve skupine, reverzibilne in ireverzibilne. Reverzibilni inhibitorji so navadno večji in zato zelo redko dosežejo prehodno

stanje (npr. protitumorsko zdravilo CPT-11 in butirilholin). Irevezibilni inhibitorji so majhni in se kovalentno vežejo v aktivno mesto ter se potem ne odcepijo (Poisons, 2008).

V medicini se inhibitorji AChE uporabljajo za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni, glavkoma, živčno-mišične blokade pri kirurški anesteziji in miastenije gravis. Povečana dejavnost AChE pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo povzroča okvaro in znižanje koncentracije živčnega prenašalca acetilholina v možganih. Acetilholin regulira aktivnost korteksa in posledično kognitivne sposobnosti. Inhibicija AChE povečuje koncentracijo acetilholina v sinapsi. Povečana koncentracija in daljši čas vezave nevrottransmitterja na receptor optimizirata prenos signala na postsinaptični nevron (Hartzell in sod., 1975). Z inhibitorji AChE poskušamo doseči upočasnitev degradacije kognitivnih funkcij. Poleg optimizacije holinergičnega prenosa signala inhibitorji holinesteraz vplivajo tudi na sintezo, odlaganje in združevanje toksičnih β -amiloidov. Tako AChE kot BChE tvorita komplekse z vlakni β -amiloidov ter pospešujeta agregacijo peptidnih fragmentov. Ti kompleksi so se izkazali za bolj citotoksične od samih β -amiloidnih vlaken (Singh in sod., 2013; Alvarez in sod., 1997).

Naravni, polysintetični ali sintetični inhibitorji AChE so najpogostejša zdravila za blaženje simptomov Alzheimerjeve bolezni (Anand in Singh, 2013). Kljub temu še vedno ni zdravila, ki bi uspešno ustavilo ali vsaj upočasnilo napredovanje bolezni. Za razvoj novih zdravil je potrebno odkritje novih inhibitorjev AChE. Številne nove bioaktivne spojine nam zagotavlja narava sama. Rastline, živali in mikroorganizmi predstavljajo obsežen vir naravnih spojine s potrjeno uspešnimi inhibitorynimi funkcijami. Odkrivanje novih inhibitorjev AChE je ključnega pomena pri razvoju novih učinkovitejših zdravil (Orhan, 2013).

2.4. RAK IN GLUTATION S-TRANSFERAZA KOT TARČA PROTITUMORSKIH ZDRAVIL

Rak je skupina različnih obolenj za katere je značilna nekontrolirana rast celic, ki lahko s časom pridobijo sposobnost invazije v sosednja tkiva ter razširjanja (metastaziranja) v druge dele telesa. Proces nastanka raka (karcinogeneza) ima tri stopnje: iniciacijo, rast in širjenje. Iniciacija se začne z mutacijo, ki celici omogoči prednost v razmnoževanju in posledično nastanek tumorja. Z nadaljnjimi mutacijami se tumor veča, posamezne tumorske celice pa se začnejo širiti po telesu (maligni tumor) (Salmon in sod., 1997). Karcinogeneza je najpogostejša v starejši populaciji, pojav raka se poveča za 30% pri populaciji starejši od 70 let. (Dreosti 1998). Kljub temu, da poznamo več kot 200 tipov raka, je za nastanek malignega tumorja potrebnih šest bistvenih sprememb v delovanju celice: samozadostnost rastnih signalov, neobčutljivost za protirastne signale, izognitev programirani celični smrti ali

apoptozi, sposobnost neomejenega razmnoževanja, tvorba novih žil ali angiogeneza in invazija tumorskih celic – nastanek metastaz (Hanahan in Weinberg, 2011).

Glutation S-transferaze (GST; E.C. 5.2.1.18) spadajo v družino izoencimov biotransformacije (druge faze detoksifikacije), pri kateri katalizirajo konjugacijo molekul z glutationom (Tew in Townsend, 2012). Konjugacija glutationa vodi do nastanka manj toksičnih vodotopnih spojin, ki se lažje izločijo iz telesa. GST so se evolucijsko razvijale vzporedno z glutationom ter jih najdemo v vseh organizmih. Humane GST so razdeljene v tri glavne kategorije: citosolne GSTs (cGSTs), mitohondrijske GST (GST kapa) in na membrano vezane mikrosomske GSTs (MAPEGs). Molekule GST imajo dimerno strukturo iz bodisi identičnih (homodimeri) ali različnih (heterodimeri) podenot, pri čemer je molekulska masa podenot v območju od 17 do 28 kDa (Singh, 2015). Vsaka podenota dimernega encima ima aktivno mesto sestavljeno iz dveh ločenih funkcionalnih regij: hidrofilno G stran in hidrofobno H stran. Zaradi visoke specifičnosti za glutation je G stran strukturno podobna med vsemi GST. H stran pa je zaradi vezave substratov različna ter posledično določa specifičnost GST izoencimov (Deponte, 2013). V človeških celicah obstaja sedem razredov topnih citosolskih GSTs, ki jih označimo z grškimi črkami imenovanih alfa – α , mi – μ , pi – Π , sigma – Σ , zeta – ζ , omega – Ω in theta – θ (Mannervik in sod., 2005).

Nove substance, ki bi zmanjšale ali onemogočile večkratno odpornost (MDR – ang. multi drug resistance) tumorskih celic, bi pripomogle k uspešnemu zdravljenju rakavih obolenj. Rakave celice pridobijo odpornost na zdravila s prekomernim izražanjem encimov, ki pospešijo detoksifikacijo in tako izničijo citotoksično delovanje protitumorskih zdravil. V terapijah rakavih obolenj se uporabljajo različne alkilirane snovi, za katere vemo, da so substrati GSTs (Townsend in Tew, 2003). Povečanje izražanja GSTs in koncentracije glutationa (GSH) v tumorju je povezano z razvojem MDR.

Preko GST pridobljena odpornost je odvisna od tipa in lokacije tumorja ter vrste in kombinacije zdravil (Singh, 2015; Ishikawa in sod., 1997). Pri nekaterih vrstah tumorjev lahko GSTs neposredno razvijejo MDR preko katalitičnih aktivnosti samih tumorjev (npr. izoencim GSTP1). Citosolna GSTP1-1 je najpogostejša GST izražena zunaj jeter (Laborde, 2010). Povečano izražanje v večini humanih tumorjev ter pojavljanje v kemoterapevtsko odpornih tumorjih potrjuje pomembno vlogo GST pri razvoju raka in MDR (Singh, 2015). Inhibitorji GST tako predstavljajo potencial za izboljšanje učinkovitosti zdravil proti raku (Tew in Townsend, 2012; Board in Menon, 2013; Hayes in sod., 2004).

2.5. ANTIOKSIDANTI IN NJIHOV TERAPEVTSKI POMEN

Antioksidant je vsaka snov, ki že v zelo nizki koncentraciji zmanjša oksidacijo drugih snovi v celici; največkrat tako, da prepreči nastajanje prostih radikalov. Oksidativni stres je posledica porušena ravnotežja med pro-oksidativnimi in anti-oksidativnimi procesi v celici. Pri tem nastajajo radikali in reaktivni intermediati, ki lahko poškodujejo DNA ter povzročijo mutacije, ki lahko vodijo v nastanek rakave celice. Poznamo tri mehanizme delovanja antioksidantov:

- Preventivni antioksidanti – nase vežejo kovinske ione (npr.: železo in baker) in s tem preprečujejo njihovo interakcijo z vodikovim peroksidom in superoksidnim radikalom ter posledičen nastanek nevarnih hidroksilnih radikalov.
- Encimski antioksidanti – katalizirajo pretvorbo radikalov v manj reaktivne produkte (npr. superoksidna dismutaza, glutathion peroksidaza, katalaza).
- »žrtveni« (*sacrificial*) antioksidanti - donorji elektronov, ki reagirajo z radikali, preden le-ti reagirajo z drugimi molekulami. Oksidiran antioksidant se bodisi regenerira ali pa izloči iz organizma (vitamin C, vitamin E, ubikinol 10, bilirubin, tiolne spojine, organske kisline, flavoni, polifenoli itd.) (Perdih in Pečar, 2006).

Vpletenost antioksidantov v preprečevanje razvoja patoloških procesov in zaviranje procesov staranja povečuje pomen razvoja antioksidantov kot zdravilnih učinkovin. Z njihovo pravilno uporabo bi razvoj mnogih bolezni preprečili ali upočasnili že na samem začetku (Day, 2004). Največji napredek k uresničitvi tega cilja je bil dosežen pri razvoju mimetikov encimskih antioksidantov – encimomimetikov (npr.: superoksid dismutaze).

Oksidativni stres in kopičenje prostih radikalov dodatno poškoduje nevrone pri Alzheimerjevi bolezni. Različne raziskave te bolezni potrjujejo upočasnitev napredovanja simptomov z uporabo antioksidantov (npr. vitamin E in selegelin zavirata napredovanje bolezni). Raziskave so pokazale, da selegelin (sintetični feniletilamin) pozitivno vpliva na kognitivne sposobnosti in vedenje Alzheimerjevih bolnikov. Kljub temu trenutno ni dovolj dokazov za uporabo selegelina v praksi (Feng in Wang, 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

V postopku priprave in analize etanolnih ekstraktov smo uporabili naslednje kemikalije, reagente in raztopine:

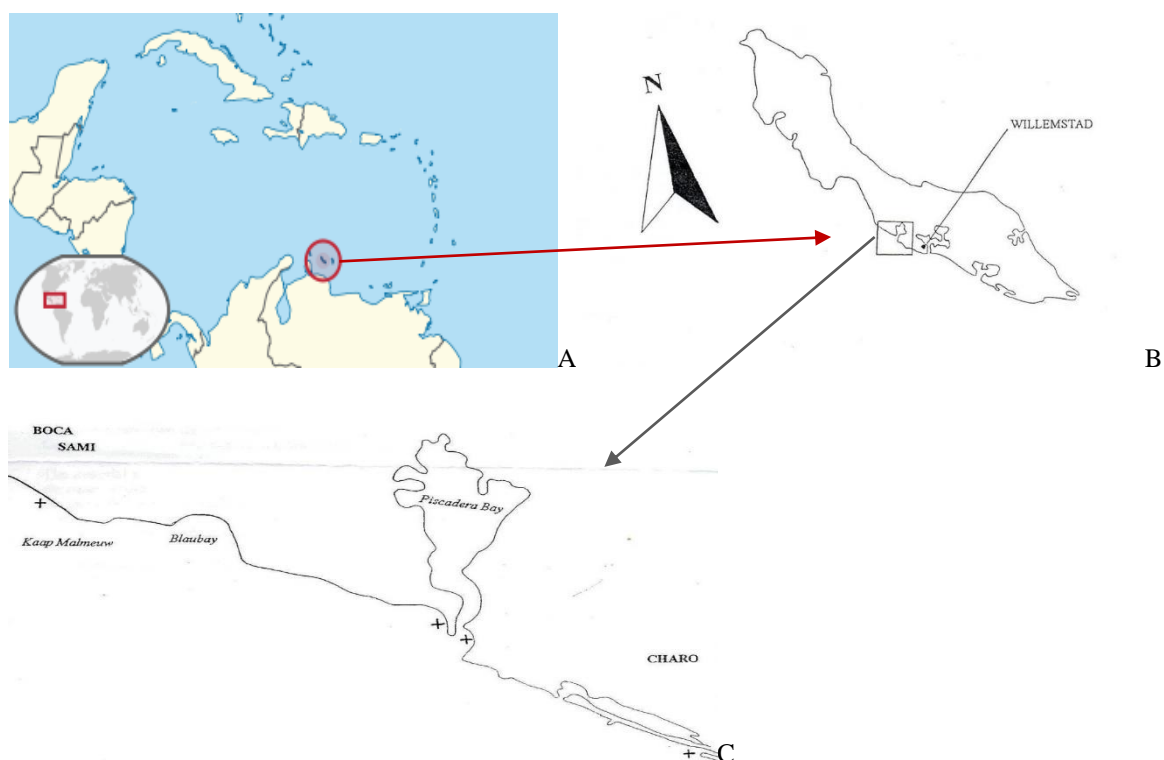
- AChE iz električne jegulje (kataloška št.: C2888-5KU, Sigma, ZDA),
- BChE iz konjskega seruma (kataloška št.: C4290, Sigma, ZDA),
- GST iz konjskih jeter
- 99% etanol (kat. št.: 1009832500, Merck KgaA, Darmstadt, NEM)
- 5,5-Ditio-bis 2-nitrobenzojska kislina – DTNB (kataloška št.: D-8130, Sigma, ZDA),
- NaCO₃ – Natrijev hidrogenkarbonat (kat.št.: 1063290500, Merck KgaA, Nemčija)
- KH₂PO₄ – Kalijev dihidrogen fosfat (kat.št.: 1048771000, Merck KgaA, Nemčija)
- K₂HPO₄ – Dikalijev hidrogenfosfat (kataloška št.: 1116108, Kemika d.d., Hrvaška)
- Acetiltioholin (kataloška št.: A-5626, Sigma, ZDA),
- 1-Kloro-2,4-dinitrobenzen (kataloška št.: 24438, Fluka, ZDA),
- L-glutation (kataloška št.: 49750, Fluka, ZDA),
- Na₂HPO₄ – Natrijev hidrogenfosfat (kat.št.: 1065860500, Merck KgaA, Nemčija)
- NaH₂PO₄ – Natrijev hidrogensulfat (kat.št.: 1065860500, Merck KgaA, Nemčija)
- 3,4,5-trihidroksibenzojska kislina (kataloška št.: K-0183, Sigma, ZDA),
- 1,1-difeni-2-pikrilhidrazil – DPPH^o reagent (kataloška št.: 082K3672, Sigma, ZDA).

Uporabili smo tudi naslednje aparature in orodja:

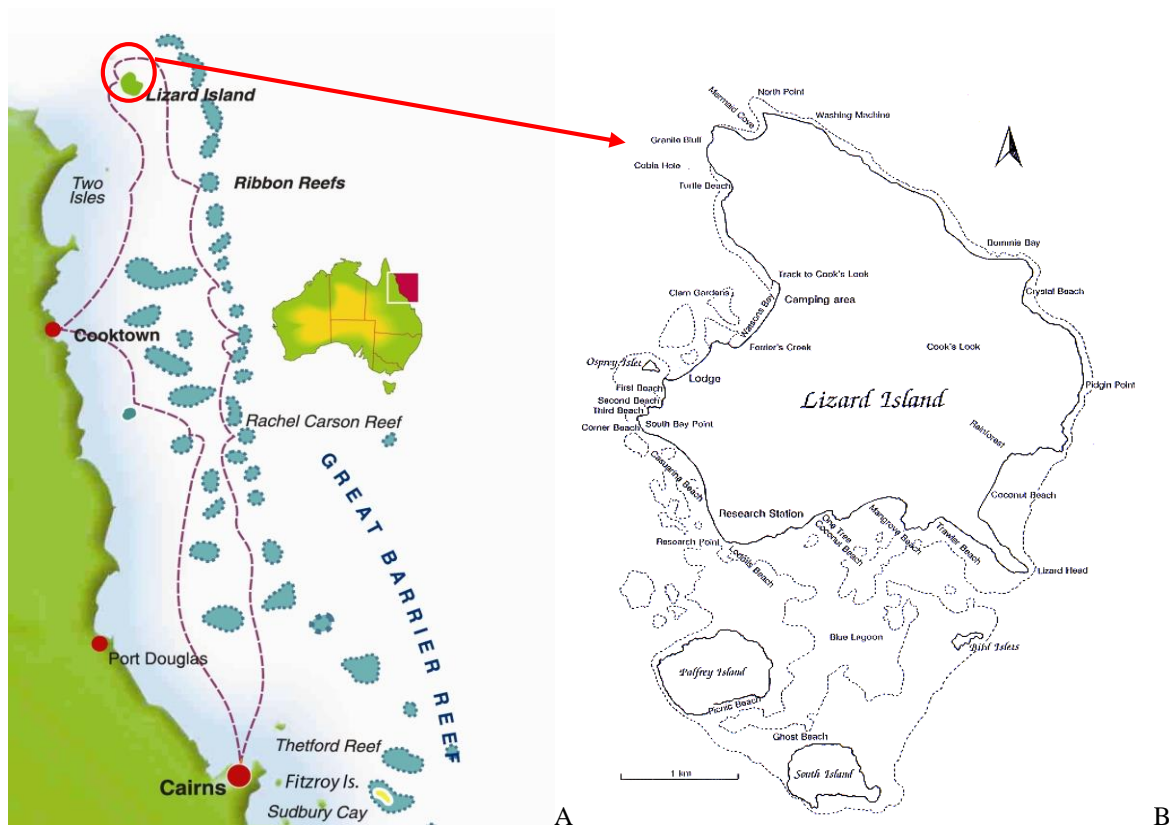
- spektrofotometer za čitalec mikrotitrne plošče (Dynex Technologies, ZDA)
- čitalec mikrotitrnih plošč (Anthos, VB)
- centrifuga (Centric 332A, Tehnica, Slovenija)
- rotavapor (R-200, Büchi, Švica)
- spektrofotometer Hewlett-Packard (model HP-8453, ZDA)
- pH meter (Mettler Toledo, Nemčija)

3.1.1 Vzorci spužev

Liofilizirane morske spužve smo prejeli od prof. Dietrich-a Mebs-a z Univerze v Frankfurtu. V nalogi smo obravnavali 66 vzorcev morskih spužev. Od tega jih je bilo 45 nabranih na morskem grebenu južne obale otoka Curaçao, avtonomne otoške države v Karibskem morju, ki spada pod Kraljevino Nizozemsko (**Slika 1**). Enaindvajset vzorcev je bilo nabrano na morskem grebenu otoka Lizard, največjega od 4 otokov, ki sestavljajo otočje Nacionalnega parka Lizard Island kakšnih. 35 km vzhodno od obale Avstralije (**Slika 2**).



Slika 1: Otok Curaçao. A) Umestitev v širšo geografsko regijo Karibskega morja, B) Zemljevid otoka Curaçao ter C) izrez zgornje slike (1:30000 povečava). S + so označena mesta vzorčenja.



Slika 2: Otok Lizard. A) Umestitev v širšo geografsko regijo - Avstralija. B) Zemljevid otočja Lizard

Vzorci so bili nabrani v globini med 5 in 45 metri. Globoko zamrznjene (na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) so prepeljali v Evropo, kjer so jih taksonomsko določili, liofilizirali in shranili. Vzročenje, transport, determinacija in shranjevanje je potekalo pod vodstvom Dr. Daniela Schaft-a z Univerze v Frankfurtu.

V **preglednici 1** so navedene vrste spužev in oznake vzorcev z lokacij na morskem grebenu otoka Curaçao. Vse nabrane vrste tega območja pripadajo razredu *Demospongia*. Najštevilčnejše je zastopan rod *Agelasida*, s tremi vrstami in skupaj 12 vzorcev. Močno sta zastopana tudi rodova *Dictyoceratida* (dve vrsti, skupaj 10 vzorcev) ter *Verongida* (pet vrst, 9 vzorcev). Ostali redovi imajo po enega do dva predstavnika, z 1-2 vzorcev.

Preglednica 1: Vrste in oznake spužev, nabranih na morskem grebenu otoka Curaçao (Karibsko morje).

razred	rod	družina	red	VZORCI rod in vrsta	# OZNAKA VZORCA
<i>Demospongiae</i>	<i>Agelasida</i>	<i>Agelasidae</i>	<i>Agelas</i>	<i>Agelas clathrodes</i>	18, 24, 26, 27, 52, 62, 80
				<i>Agelas conifera</i>	60, 73, 115
				<i>Agelas dispar</i>	20, 109
	<i>Dictyoceratida</i>	<i>Irciniidae</i>	<i>Ircinia</i>	<i>Ircinia felix</i>	82, 82*, 101, 116, 123, 126
				<i>Ircinia strobilina</i>	17, 36, 91, 125
	<i>Hadromerida</i>	<i>Clionaidae</i>	<i>Sphaciospongia</i>	<i>Sphaciospongia vesparium</i>	69, 111
	<i>Halichondrida</i>	<i>Heteroxyidae</i>	<i>Myrmekioderma</i>	<i>Myrmekioderma styx</i>	86
		<i>Dictyonellidae</i>	<i>Scopalina</i>	<i>Scopalina ruetzleri</i>	78
	<i>Haplosclerida</i>	<i>Callyspongiidae</i>	<i>Callyspongia</i>	<i>Callyspongia plicifera</i>	43, 128
		<i>Petrosiidae</i>	<i>Xestospongia</i>	<i>Xestospongia muta</i>	131
	<i>Poecilosclerida</i>	<i>Microcionidae</i>	<i>Pandaros</i>	<i>Pandaros acanthifolium</i>	65
	<i>Verongida</i>	<i>Aplysinidae</i>	<i>Aplysina</i>	<i>Aplysina archei</i>	11
				<i>Aplysina cauliformis</i>	85
				<i>Aplysina fulva</i>	10
				<i>Aplysina lacunosa</i>	41
<i>Pseudoceratina</i>				<i>Pseudoceratina crassa</i>	1, 31, 39, 118, 121
		<i>Holospamma</i>	<i>Holospamma helwigi</i>	37, 102	
		neidentificirana	<i>neidentificirana</i>	29, 30, 90, 108	
Σ	7	9	12	18	45

V **preglednici 2** so navedene vrste spužev in oznake vzorcev iz lokacije Lizard Island, Avstralija. Šest vrst morskih spužev spada v razred *Demospongia*, ena vrsta pa v razred *Calcarea*. Od skupaj 21 vzorcev, jih največ pripada redu *Spongia* (5 vzorcev *Spongia sp.*). S štirimi vzorci sta zastopana redova *Ircinia* (vrsta *Ircinia sp.*) in *Pericharax* (vrsta *Pericharax heteroraphis*). Ostale vrste imajo po 3 ali manj vzorcev.

Preglednica 2: Vrste in oznake spužev, nabranih na lokaciji Lizard Island (Avstralija).

razred	rod	družina	red	VZORCI rod in vrsta	# OZNAKA VZORCA
<i>Demospongiae</i>	<i>Axinellida</i>	<i>Axinellidae</i>	<i>Phakellia</i>	<i>Phakellia stipitata</i>	LI-14H, LI-22H, LI-30H
		<i>Irciniidae</i>	<i>Ircinia</i>	<i>Ircinia sp.</i>	LI-17H, LI-33H, LI-45H, LI-49H
	<i>Dictyoceratida</i>	<i>Spongiidae</i>	<i>Spongia</i>	<i>Spongia sp.</i>	LI-8H, LI-13H, LI-21H, LI-29H, LI-36H
			<i>Hyrtios</i>	<i>Hyrtios erecta</i>	LI-9H
		<i>Thorectidae</i>	<i>Thorectandra</i>	<i>Thorectandra sp.</i>	LI-18H, LI-32H, LI-41H
<i>Haplosclerida</i>	<i>Petrosiidae</i>	<i>Xestospongia</i>	<i>Xestospongia pacifica</i>	LI-2H	
<i>Calcarea</i>	<i>Clathrinida</i>	<i>Leucettidae</i>	<i>Pericharax</i>	<i>Pericharax heteroraphis</i>	LI-1H, LI-4H, LI-15H, LI-16H
Σ	4	6	7	7	21

3.1.2. Priprava etanolnih ekstraktov

Liofilizirane vzorce smo presortirali, spravili v zaprte plastične epruvete in primerno označili (vrsta, številčna oznaka vzorca). Vsakega vzorca smo zatehtali 0,2 g ter ga s škarjicami ter s pomočjo terilnice strli do prahu. V predhodno označenih 2 ml epicah smo zdrobljeni vzorec prelili z 1,5 ml 99% etanolom. Zaprte pokrove vsake epice z vzorcem smo oblepili z parafinskim trakom. Nato smo jih vstavili v stresalnik in pustili, da se stresajo čez noč na 600 rpm. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 15 min pri 12000 obratih na minuto. Sledilo je odpipetiranje supernatanta v predhodno označene in zatehtane 1,5 ml epice. Preostalo usedlino v 2,0 ml epicah smo prelili z 99% etanolom do oznake 2 ml. Le te smo ponovno postavili na stresalnik pri 600 o/min do naslednjega dne. Tretji dan smo vzorce ponovno centrifugirali 15 min pri 12000 o/min, odpipetirali supernatant v epice z supernatantom prve ekstrakcije največ do oznake 1,5 ml. Preostanke vzorcev v 2,0 ml epicah smo zaprli, oblepili s parafinskim trakom in shranili v hladni sobi pri 4°C.

Etanolne ekstrakte smo posušili s centrifugiranjem v vakuumu. Odprte epice smo položili v rotavapor (vse obrnjene v isto smer). Centrifugirali smo trikrat po 20 min. Med posameznimi centrifugami smo vstavili rotavapor za 10 min in na ta način vzdrževali temperaturo pod 35 °C. Epice s suho snovjo smo ponovno stehali na 10 µg natančno. Tako dobljenim težam smo odšteli težo praznih epic. Dobljena razlika predstavlja količino suhe snovi (s.s.) v etanolnem ekstraktu.

S ponovnim raztapljanjem v preračunanem volumnu 99% etanola smo ekstrakte razredčili na 2, 5, 10 ali 15 mg s.s. na 1 ml etanola (**Preglednica 4**). Za potrebe bioloških testov smo pripravili 1 ml vsakega ekstrakta razrečenega na 2 mg s.s./ml etanola. Vse epice smo oblepili s parafilmom in jih shranili v hladni sobi pri 4 °C.

3.2 METODE DOLOČANJA BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI

3.2.1 Test inhibicije acetilholinesteraze

Aktivnost AChE in njeno inhibicijo v testnih vzorcih smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961), s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Uporabili smo encim AChE iz električne jegulje (Sigma, ZDA), ki smo ga raztopili v 100 mM fosfatnem pufru (pH 7.3) v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/ml. Mikrotitrno ploščo smo napolnili s 50 µl 100 mM fosfatnega pufra (pH 7.3). Nato smo v vsako vdolbinico dodali po 10 µl ekstrakta s koncentracijo 2 mg/ml (vsak vzorec s tremi ponovitvami). Na vsaki plošči smo v tri vdolbinice namesto ekstrakta dodali 10 µl 99% etanola (kontrola). V erlenmajerici (zaviti v folijo) smo zamešali 30 ml Ellmanovega reagenta (raztopina 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg) in natrijevega hidrogen karbonata (37.5 mg) v 25 mM fosfatnem pufru, pH 7.0) in 30 µl substrata acetiltioholina (1 M). V vsako vdolbinico mikrotitrne plošče smo dodali po 100 µl raztopine substrata v Ellmanovem reagentu. Nastavili smo program za 5-minutno merjenje absorbance pri 405 nm (1 meritev na 30 sekund). Tik pred pričetkom merjenja smo 8 µl encima AChE razredčili v 10 ml 100 mM fosfatnem pufru ter v vsako vdolbinico dodali po 50 µl razredčine. Končna koncentracija s.s. v testu je bila 95 µg/ml.

Pri ponovnem testu smo aktivne ekstrakte rečili v 100 mM fosfatnem pufru (pH 7.3). Pripravili smo po 50 µl razredčin v končnih koncentracijah od 0 do 100 µg s.s./ml. Za vsak ekstrakt smo uporabili 3 ponovitve redčitev. Na vsaki plošči smo v enakih razmerjih redčili tudi 99% etanola (kontrola). V vsako vdolbinico mikrotitrne plošče smo dodali po 100 µl raztopine Ellmanovega reagenta in substrata. Nastavili smo program za 5-minutno merjenje absorbance pri 405 nm (1 meritev na 30 sekund). Tik pred pričetkom merjenja smo 8 µl encima AChE razredčili v 10 ml 100 mM fosfatnem pufru ter v vsako vdolbinico dodali po 50 µl razredčine. Z opisanimi rečitvami so določili koncentracijo ekstrakta, pri kateri dosežemo 50% inhibicijo (IC₅₀).

3.2.2 Test inhibicije butirilholinesteraze

Aktivnost BChE in njeno inhibicijo v testnih vzorcih smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961), s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA) na isti način, kot je opisano v točki 3.2.1. Kot substrat smo uporabili acetiltioholin, kot encim pa BChE iz konjskega seruma (kataloška št.: C4290), ki smo ga raztopili v 100 mM fosfatnem pufru (pH 7.3) v koncentraciji 1000 encimskih enot (EE)/ml.

3.2.3 Test inhibicije glutation S-transferaze

Inhibicijo GST v testnih vzorcih smo zasledovali z metodo po Habigu (Habig in sod., 1974). Kot encim smo uporabili GST iz konjskih jeter, ki smo jo raztopili v 100 mM fosfatnem pufru (pH 6.5) v koncentraciji 25 encimskih enot (EE)/ml. Pred pričetkom testa smo pripravili dve raztopini: (A) 1600 μ l raztopine 20,128 mg Cl-2,4-dinitrobenzena in 2 ml 99% etanola smo dodali k 18,4 ml 100 mM fosfatnega pufra (pH 6.5); (B) 12,28 mg L-glutaciona (reducirana oblika) smo raztopili v 20 ml 100 mM fosfatnega pufra (pH 6.5).

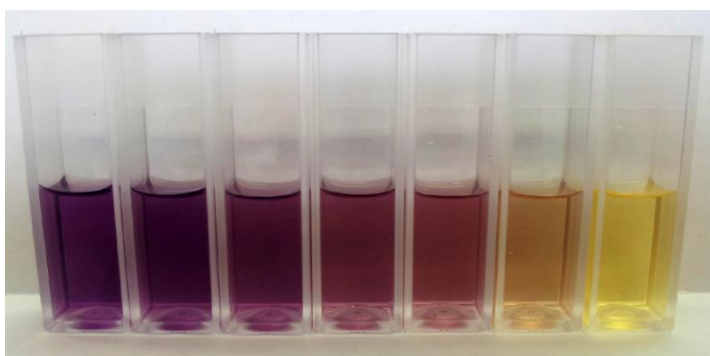
Vsako vdolbinico mikrotitrne plošče smo napolnili s 100 μ l raztopine B, 50 μ l raztopine A ter 50 μ l 100 mM fosfatnega pufra (pH 6.5). Nato dodali po 10 μ l ekstrakta (vsak ekstrakt v tri luknjice). Na vsaki plošči smo v tri vdolbinice namesto ekstrakta dodali 10 μ l 99% etanola (kontrola). Nastavili smo program za 5-minutno merjenje absorbance pri 340 nm (1 meritev na 30 sekund). Tik pred pričetkom merjenja smo 20 μ l encima GST razredčili v 5 ml 100 mM fosfatnem pufru (pH 6.5) ter v vsako vdolbinico dodali po 50 μ l razredčine. Končna koncentracija s.s. v testu je bila 77 μ g/ml.

Z opisanim testom smo izpostavili ekstrakte, ki so dosegli več kot 30% inhibicijo delovanja encima. Pri ponovnem testu smo aktivne ekstrakte rečili v 100 mM fosfatnem pufru (pH 6.5). Pripravili smo po 50 μ l razredčin v končnih koncentracijah od 0 do 100 μ g/ml. Za vsak vzorec smo napravili 3 ponovitve rečitev. Na vsaki plošči smo v enakih razmerjih redčili tudi 99% etanol (kontrola). V vsako vdolbinico mikrotitrne plošče smo dodali po 100 μ l raztopine B in 50 μ l raztopine A. Nastavili smo program za 5 minutno merjenje absorbance pri 340 nm (1 meritev na 30 sekund). Tik pred pričetkom merjenja smo 20 μ l encima GST razredčili v 5 ml 100 mM fosfatnem pufru (pH 6.5) ter v vsako vdolbinico dodali po 50 μ l razredčine. Z opisanimi redčitvami so določili koncentracijo ekstrakta pri kateri dosežemo 50% inhibicijo GST (IC_{50}).

3.2.4 Test določanja antioksidativne aktivnosti

Za določanje antioksidativnega potenciala etanolnih ekstraktov morskih spužev smo uporabili metodo s prostim radikalom DPPH[·] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Metoda temelji na redukciji radikala DPPH[·] s fenolno spojino posameznega antioksidanta (AOH) pri čemer se zmanjša količina radikala DPPH[·]. V reakciji gre najprej za prenos vodikovega atoma ($\text{DPPH}^{\cdot} + \text{AOH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{AO}^{\cdot}$) nato pa za prenos elektrona na DPPH[·] ($\text{AO}^{\cdot} + \text{DPPH}^{\cdot} \rightarrow$ produkti reakcije). Ko torej zmešamo raztopino DPPH s snovjo, ki lahko odda vodikov atom, nastane reducirana oblika molekule difenilpikrilhidrazilin (DPPH-H) in vijolična barva raztopine se pretvori v blede svetlorumeno barvo (**slika 3**).

Pripravili smo raztopino DPPH[·] radikala s koncentracijo 0,1 mmol/L. Zatehtali smo 9,85 mg DPPH[·] reagenta na tehtalni ladjici in ga prenesli v čašo tako, da smo ga sprali iz ladjice s 50 ml 96% etanolom. Z magnetnim mešalom smo raztopino dobro premešali. Pred uporabo smo 10ml raztopine DPPH prenesli v 50-ml merilno bučko ter jo dopolnili z 96% etanolom do oznake. Bučko in čašo z raztopino DPPH smo zavili v aluminijasto folijo.



Slika 3: Sprememba barve raztopine iz vijolične (DPPH[·]) v blede svetlo rumeno (DPPH-H).

V 1,5 ml kiveto smo odmerili po 50 μ l posameznega ekstrakta (3 ponovitve) ter po 50 μ l 96% etanola za kontrolo (3 ponovitve). Dodali smo 1,45 ml 0,1 mmol/l raztopine DPPH[·]. Skupni volumen reagenta in ekstrakta ali etanola (kontrola) je bil 1,5 ml.

Ekstraktom (oz. etanolu oz. razredčini galne kisline) smo dodali raztopino DPPH ter po preteku 30 min izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm.

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo izrazili kot delež inhibicije prostega DPPH[·] radikala (%):

$$\% \text{ inhibicije DPPH}^{\cdot} = \frac{(A_{k517} - A_{517})}{A_{k517}} * 100 \quad \dots(1)$$

3.2.5 Hemolitični test

Eritrocitom shranjenim v citratnem pufu (reducent) smo najprej s kapalko odstranili supernatant. Nato smo dodali fiziološko raztopino (0,9% NaCl), premešali ter centrifugirali 5 minut pri 2500 rpm (Centric 332A, Tehnica, Slovenija). Spiranje smo ponovili 4x oziroma dokler ni bil supernatant relativno prozoren. Za testiranje smo jih resuspendirali v pufu za eritrocite (raztopina 0.13 M NaCl in 0.02 M TRIS.HCl, pH 7.4). Pripravili smo suspenzijo eritrocitov, ki je pri 650 nm imela navidezno absorpcijo 0.5 ± 0.01 .

Hemolitično aktivnost smo spremljali s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA), ki omogoča hkratno zasledovanje 96 časovnih potekov. Na mikrotitrni plošči smo napolnili vdolbinice s po 90 μ l eritrocitnega pufra in 10 μ l posameznega ekstrakta (2 ponovitvi vsakega ekstrakta). Nato smo v vsako vdolbinico dodali še po 100 μ l eritrocitov in pričeli z meritvijo. Končna koncentracija s.s. v testu je bila 100 μ g/ml. Hemolizo smo opazovali kot padec absorpcije pri 650 nm. Kot kontrolo smo uporabili 90 μ l eritrocitnega pufra, 10 μ l 99% etanola in 100 μ l eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 30 minut pri 25 °C.

Vzorci, ki so kazali srednjo ali močno hemolitično aktivnost, smo ponovno testirali. Pripravili smo po 100 μ l razredčin v končnih koncentracijah od 0 do 100 μ g s.s./ml. Za vsak ekstrakt smo napravili 3 ponovitve redčitev. Na vsaki plošči smo v enakih razmerjih redčili tudi 99% etanol (kontrola). Nato smo v vsako vdolbinico dodali še po 100 μ l eritrocitov in pričeli z meritvijo. Odčitali polovični čas hemolize (t_{50}) oz. čas pri katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pade na polovico svoje začetne vrednosti.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V ETANOLNIH EKSTRAKTIH

V **preglednicah 3 in 4** so prikazane mase suhih snovi v etanolnih ekstraktih spužev. Posušene ekstrakte smo ponovno raztopili v 99% etanolu kot je opisano v točki 3.2.1.

Preglednica 3: Masa suhe snovi v etanolnih ekstraktih morskih spužev nabranih na lokaciji Lizard Island (Avstralija). # zaporedna št. vzorca

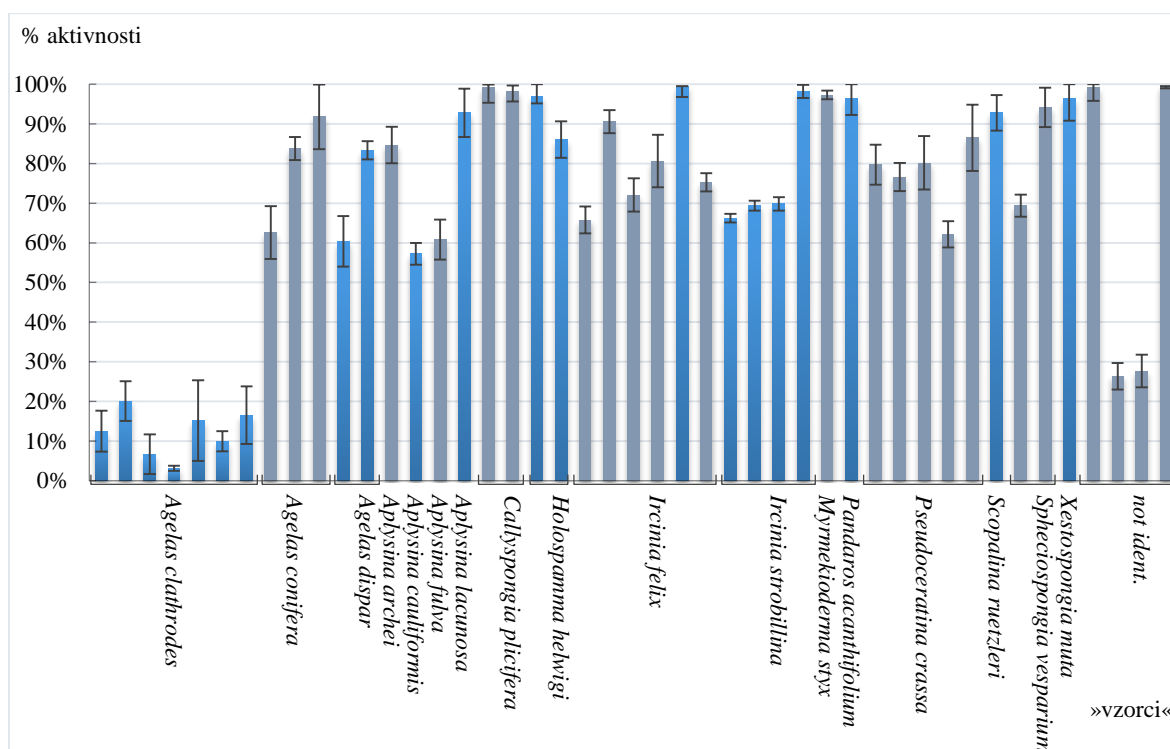
VZOREC		masa suhe snovi (mg)
vrsta	#	
<i>Hyrtios erecta</i>	LI-9H	1,66
	LI-17H	2,80
<i>Ircinia sp.</i>	LI-33H	2,11
	LI-45H	2,21
	LI-49H	1,51
	LI-1H	5,87
<i>Pericharax heteroraphis</i>	LI-4H	3,45
	LI-7H	2,02
	LI-15H	3,40
	LI-16H	3,97
	LI-14H	8,41
<i>Phakiella stipitata</i>	LI-22H	4,80
	LI-30H	3,57
	LI-8H	3,15
<i>Spongia sp.</i>	LI-13H	4,45
	LI-21H	5,02
	LI-29H	2,26
	LI-36E	3,38
	LI-18H	1,93
<i>Thorectandra sp.</i>	LI-32H	2,09
	LI-41H	1,12
	LI-2H	18,16
<i>Xestospongia pacifica</i>		

Preglednica 4: Masa suhe snovi v etanolnih ekstraktih morskih spužev nabranih na morskem grebenu otoka Curaçao (Karibsko morje). # zaporedna št. vzorca.

VZOREC		masa suhe snovi (mg)
vrsta	#	
<i>Agelas clathrodes</i>	18	14,86
	24	14,41
	26	13,58
	27	13,40
	52	17,84
	62	8,42
<i>Agelas conifera</i>	80	17,77
	60	7,96
	73	7,94
<i>Agelas dispar</i>	115	9,86
	20	2,92
<i>Aplysina archei</i>	109	5,40
	11	6,75
<i>Aplysina cauliformis</i>	85	3,41
<i>Aplysina fulva</i>	10	4,42
<i>Aplysina lacunosa</i>	41	6,31
<i>Callyspongia plicifera</i>	43	10,56
	128	9,89
<i>Holospamma helwigi</i>	37	4,76
	102	3,34
<i>Ircinia felix</i>	82	5,92
	82*	5,93
	101	5,55
	116	5,98
	123	11,83
<i>Ircinia strobilina</i>	126	4,00
	17	2,61
	36	2,20
	91	2,93
<i>Myrmekioderma styx</i>	125	11,12
	86	5,99
<i>Pandaros acanthifolium</i>	65	6,42
<i>Pseudoceratina crassa</i>	1	4,27
	31	6,99
	39	4,42
	118	3,92
	121	8,78
<i>Scopalina ruetzleri</i>	78	5,69
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	69	1,74
	111	4,72
<i>Xestospongia muta</i>	131	8,07
neidentificirana	29	14,76
	30	13,76
	90	21,11
	108	11,87

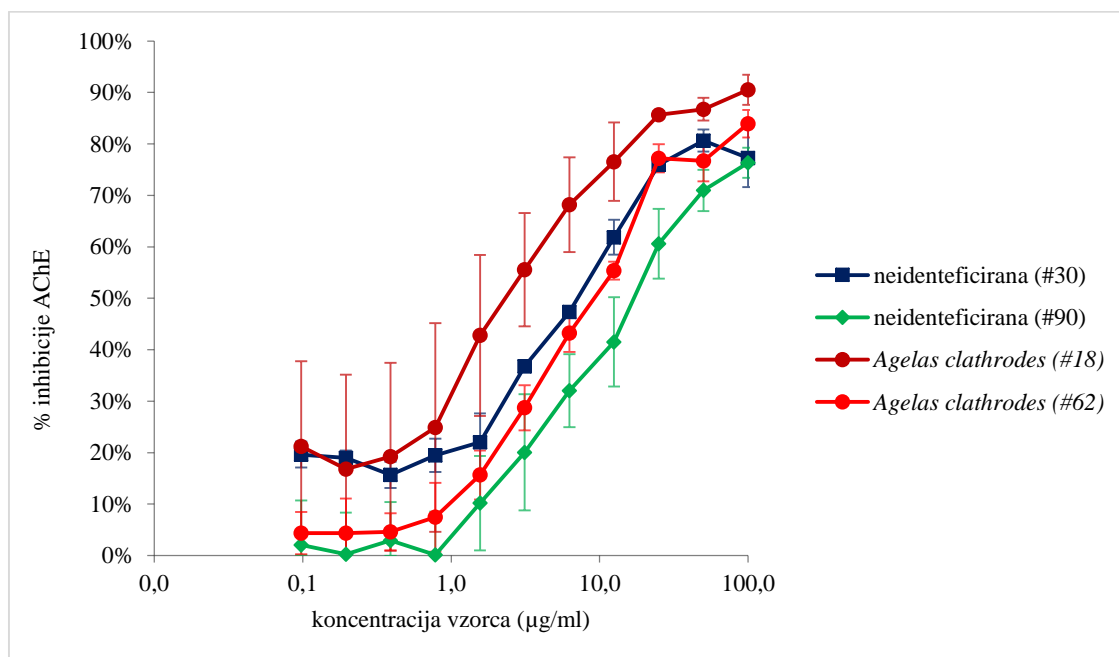
4.2 ANTI-ACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST

V preliminarnem testu smo opazovali znižanje aktivnosti AChE ob prisotnosti etanolnih ekstraktov karibskih morskih spužev s koncentracijo suhe snovi 95 µg/ml. Rezultati so pokazali, da 9 od 45-ih etanolnih ekstraktov inhibira aktivnost AChE za več kot 70% (**Slika 4**). Od tega sta dva neidentificirana vzorca (#30 – 74% padec aktivnosti; #90 – 72% padec aktivnosti) ter sedem ekstraktov iz vzorcev vrste *Agelas clathrodes* (#18 – 88%; #24 – 80%; #26 – 93%; #27 – 97%; #52 – 85%; #62 – 85%; #80 – 83%). Etanolni ekstrakti omenjene vrste so povzročili od 80 do 97% padec aktivnosti AChE. Pri desetih vzorcih nismo zaznali vpliva ekstraktov na aktivnost AChE, saj je le ta v okviru standardne napake ostala 100%.



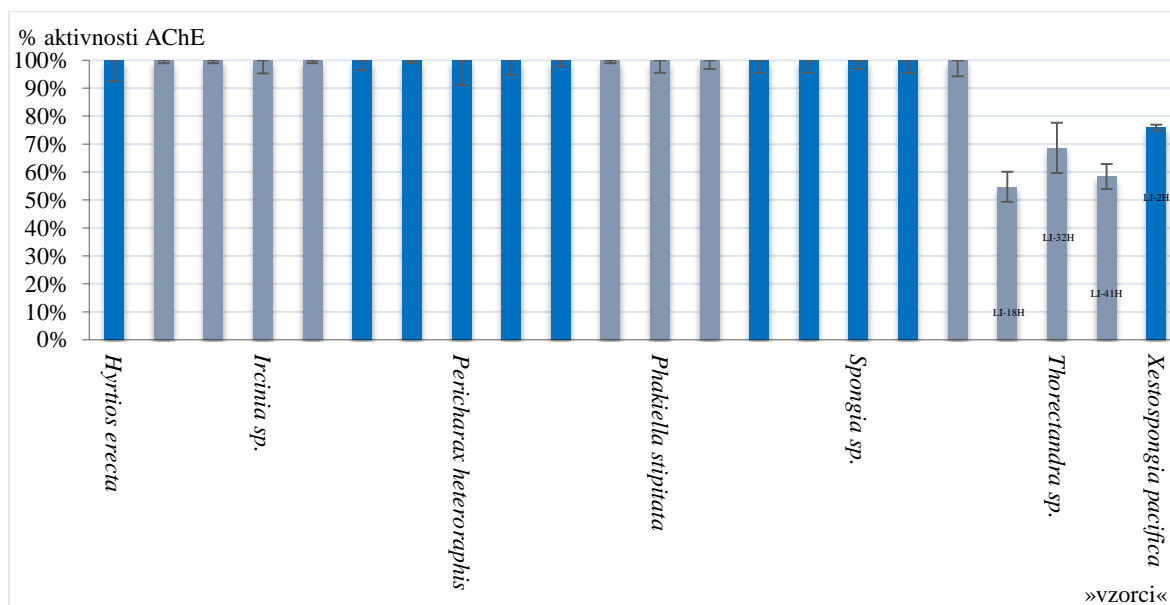
Slika 4: Delež aktivnosti acetilholinesteraze po dodatku etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 95 µg/ml) karibskih morskih spužev.

Rezultati ponovnega testa z razredčitvami dveh aktivnih ekstraktov vrste *Agelas clathrodes* (#18 in #62) ter neidentificiranih vzorcev #30 in #90 so prikazani na **Sliki 5**. Iz enačbe linearne dela krivulje smo preračunali koncentracijo ekstrakta pri kateri dosežemo 50% inhibicijo (IC₅₀). Rezultati kažejo, da ekstrakti vrste *Agelas clathrodes* dosežejo IC₅₀ pri koncentracijah med 2,4 µg/ml (#18) in 9,7 µg/ml (#62). Ekstrakti neidentificiranih vzorcev pa pri 7,4 µg/ml (#30) in 18,0 µg/ml (#90).



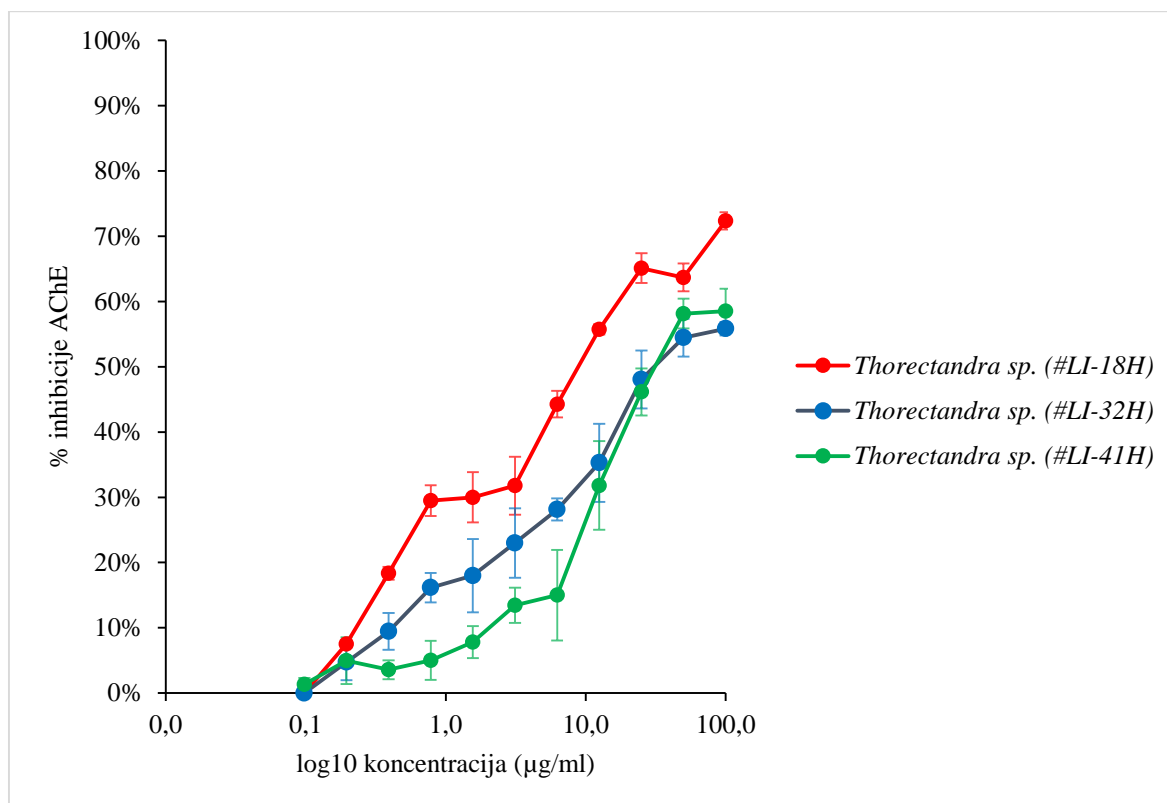
Slika 5: Krivulja inhibicije acetilholinesteraze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti karibskih spužev

Preliminarni test aktivnosti AChE v prisotnosti etanolnih ekstraktov avstralskih spužev s koncentracijo suhe snovi 95 µg/ml so pokazali, da le štirje od 21-ih vzorcev inhibirajo AChE aktivnost (**Slika 6**). Med njimi so trije vzorci vrste *Thorectandra sp.* s inhibicijo aktivnosti med 45% (#LI-18H) in 31% (#LI-32H) ter edini vzorec vrste *Xestospongia pacifica* (#LI-2H), ki je dosegel le 24% padec aktivnosti.



Slika 6: Delež aktivnosti acetilholinesteraze po dodatku etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 95 µg/ml) avstralskih morskih spužev

Kljub temu, da v preliminarnih testih avstralskih spužev nismo zabeležili 50 (ali več) % padca aktivnosti, smo ekstrakte vrste *Thorectandra sp.* ponovno testirali. Z rečitvami od 100 μg s.s./ml do 0 μg s.s./ml, smo dobili krivuljo inhibicije AChE (**Slika 7**), iz katere preračunamo IC_{50} . Dobljene IC_{50} etanolnih ekstraktov avstralskih spužev so sledeče: 9,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (#LI-18H), 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (#LI-41), 32,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (#LI-32). Rezultati kažejo, da med avstralskimi vzorci #LI-18H najmočnejše inhibira encim AChE.

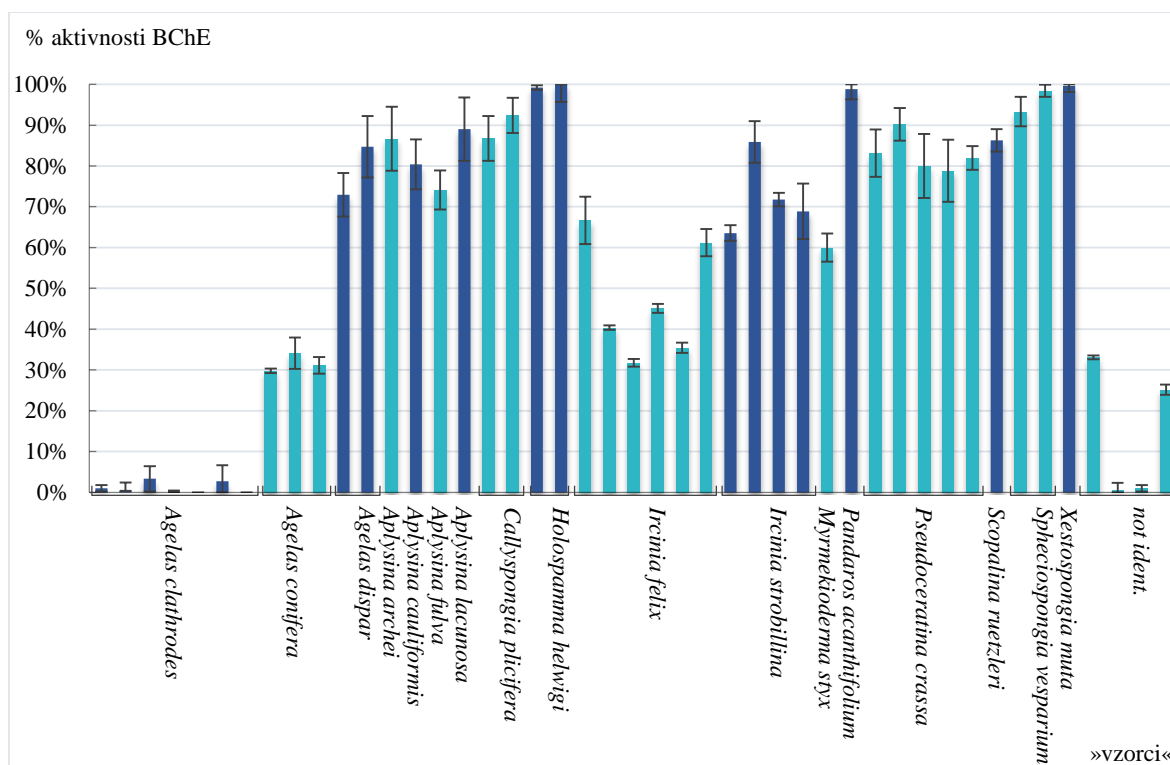


Slika 7: Krivulja inhibicije acetilholinesteraze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti avstralskih spužev.

4.3 ANTI-BUTIRILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST

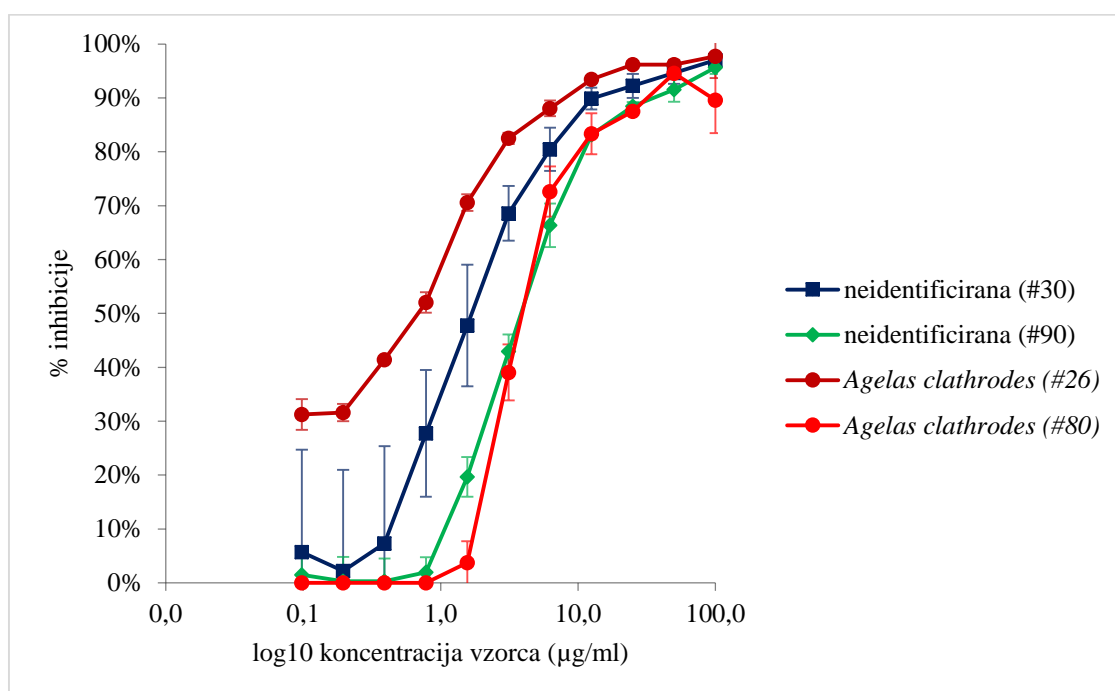
V preliminarnem testu smo opazovali padec aktivnosti BChE ob prisotnosti etanolnih ekstraktov karibskih in avstralskih morskih spužev s koncentracijo suhe snovi 95 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Rezultati so pokazali, da 11 od 45-ih etanolnih ekstraktov inhibira aktivnost BChE za več kot 70% (**Slika 8**). Od tega pripadajo trije ekstrakti neidentificiranim vzorcem (#30 - 99% padec aktivnosti; #90 - 99% padec aktivnosti; #108 - 75% padec aktivnosti), en ekstrakt vrst *Agelas conifera* (#60 - 70% padec aktivnosti), preostalih sedem pa vrsti *Agelas clathrodes* (#18 - 99%; #24 - 100%; #26 - 97%; #27 - 100%; #52 - 100%; #62 - 97%; #80 - 100%).

Najboljšo antibutirilholinesterazno aktivnost smo tako zabeležili pri etanolnih ekstraktih vrste *Agelas clathrodes*, le ti so dosegli med 97 in 100% inhibicijo BChE. Etanolni ekstrakti vrst *Agelas conifera* (#73 in #115), *Ircinia felix* (#82*, #101, #116, #123) ter neidentificiran vzorec #29 so povzročili 70 – 50% padec aktivnosti encima. Pri petih vzorcih nismo zaznali vpliva ekstraktov na aktivnost BChE.



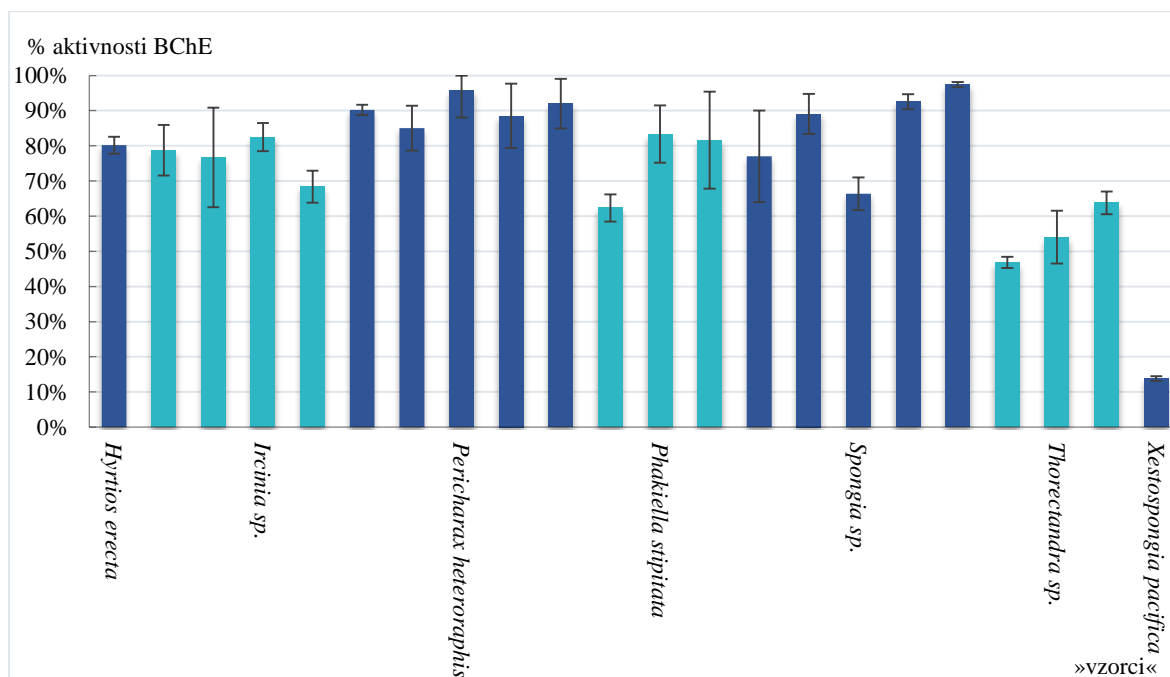
Slika 8: Delež aktivnosti butirilholinesteraze po dodatku etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 95 µg/ml) karibskih morskih spužev.

Rezultati ponovnega testa z razredčitvami (med 100 µg s.s./ml in 0 µg s.s./ml) aktivnih ekstraktov vrst *Agelas clathrodes* ter ekstraktov nedeterminiranih vzorcev #30 in #90 so prikazani v **Sliki 9**. Iz enačbe linearnega dela krivulje smo preračunali IC_{50} . Antibutirilholinesterazna aktivnost je najučinkovitejša pri ekstraktih vrste *Agelas clathrodes*, saj ti dosežejo IC_{50} že med 0,7 µg/ml (#26) in 4,1 µg/ml (#80). ter nedeterminiranega vzorca #30 ($IC_{50} = 6,9$ µg/ml). Ekstrakti neidentificiranih vzorcev pa pri 4,1 µg/ml (#30) in 1,7 µg/ml (#90). Ekstrakt iz vzorca #26 vrste *Agelas clathrodes* povzroči več kot 30% inhibicijo BChE že pri koncentracijah 0,1 µg s.s./ml.



Slika 9: Krivulja inhibicije butirilholinesteraze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti karibskih spužev

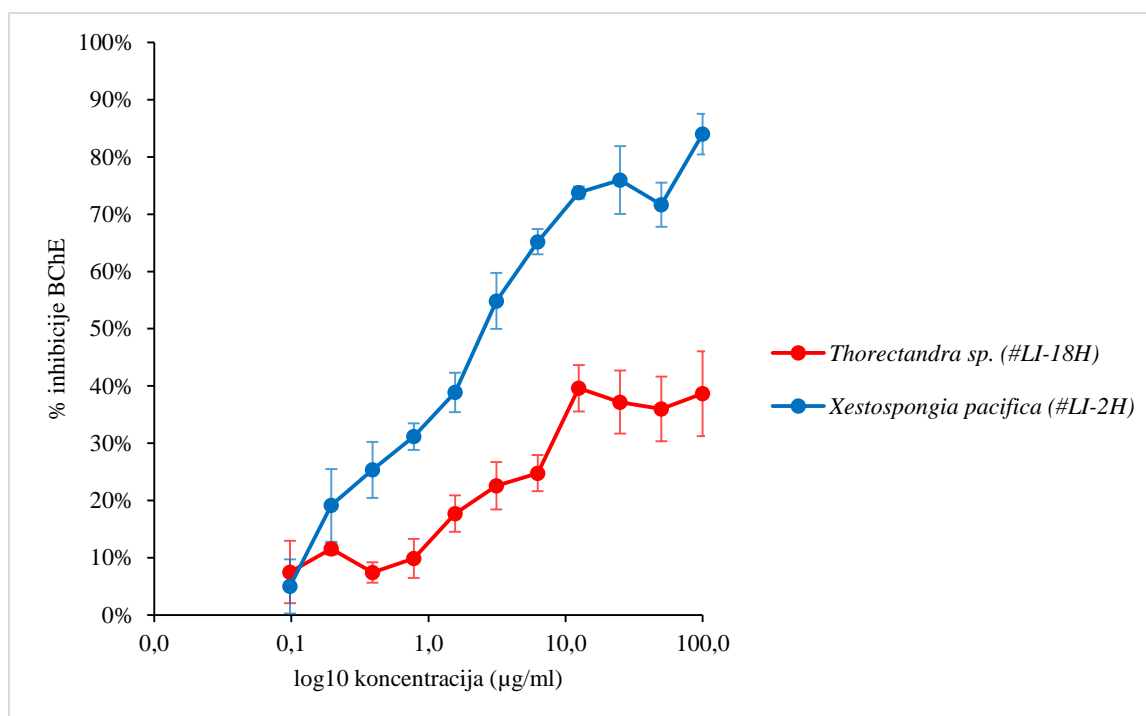
Rezultati preliminarnega testa aktivnosti BChE ob prisotnosti etanolnih ekstraktov avstralskih spužev so pokazali, da le eden od 21 vzorcev preseže 70% butirilholinesterazno inhibicijo pri koncentraciji 95 µg s.s./ml (**Slika 10**). To je ekstrakt vzorca #LI-2H vrste *Xestospongia pacifica* s 86% ± 0,007% inhibicijo encima BChE.



Slika 10: Delež aktivnosti butirilholinesteraze po dodatku etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 95 µg/ml) avstralskih morskih spužev.

Več kot 50% padec aktivnosti BChE smo opazili tudi pri ekstraktu vzorca #LI-18H vrste *Thorectandra sp.*. Pri vzorcih #LI-7H vrste *Pericharax heteroraphis* in #LI-36H vrste *Spongia sp.* nismo zaznali vpliva ekstraktov na aktivnost BChE.

V ponovnem testu smo se odločili testirati oba vzorca, ki sta pri koncentraciji 95 dosegla več kot 50% padec aktivnosti BChE. Rezultati testa z razredčitvami (med 100 $\mu\text{g s.s./ml}$ in 0 $\mu\text{g s.s./ml}$) aktivnih ekstraktov vrst *Thorectandra sp.* (#LI-18H) in *Xestospongia pacifica* (#LI-2H) so prikazani na **Sliki 11**. Iz enačbe linearnega dela krivulje smo izračunali IC_{50} . Antibutirilholinesterazna aktivnost ekstrakta vrste *Xestospongia pacifica* je pričakovano učinkovitejša in doseže IC_{50} pri 2,6 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrakt iz vrste *Thorectandra sp.* v ponovnem testu ni inhibiral BChE za več kot 50%.



Slika 11: Krivulja inhibicije butirilholinesteraze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti avstralskih spužev.

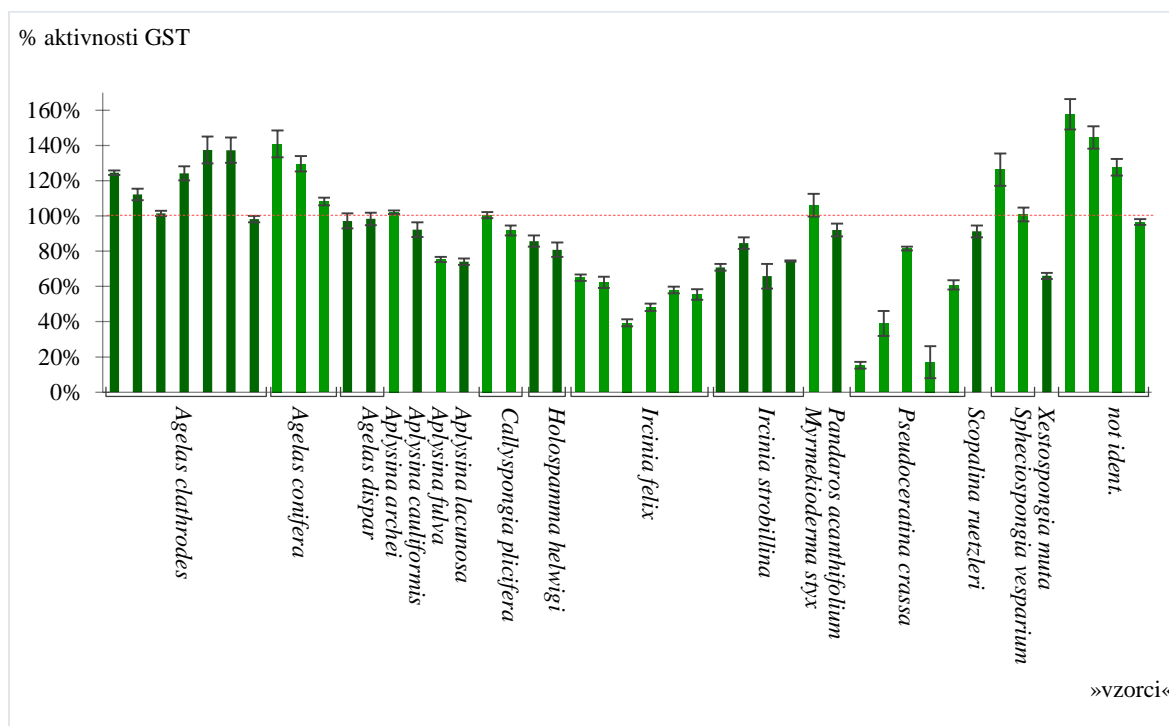
V **preglednici 5** so predstavljene koncentracije ekstraktov iz vzorcev karibskih in avstralskih spužev, pri katerih smo dosegli 50% inhibicijo encima AChE ter BChE. Najbolj učinkoviti so ekstrakti vzorcev vrste *Agelas clathrodes*: IC_{50} (AChE) smo zabeležili med 2,4 in 9,7 $\mu\text{g/ml}$ ter IC_{50} (BChE) med 0,9 in 4,1 $\mu\text{g/ml}$. Karibske morske spužve dosegajo boljše rezultate pri inhibiciji BChE kot AChE. Avstralske morske spužve so se izkazale kot manj učinkovite.

Preglednica 5: Koncentracije suhe snovi v etanolnih ekstraktih karibskih in avstralskih spužev, pri katerih dosežemo 50% inhibicijo holinesteraznih encimov.

vzorci		Koncentracija IC ₅₀ za AChE (µg/ml)	Koncentracija IC ₅₀ za BChE (µg/ml)
Karibske morske spužve	<i>Agelas clathrodes</i> (vsi vzorci)	2,4 – 9,7	0,7 – 4,1
	<i>Agelas clathrodes</i> (#18)	2,4	1,6
	<i>Agelas clathrodes</i> (#24)	3,3	2,1
	<i>Agelas clathrodes</i> (#26)	2,9	0,7
	<i>Agelas clathrodes</i> (#27)	7,1	0,9
	<i>Agelas clathrodes</i> (#52)	5,7	2,1
	<i>Agelas clathrodes</i> (#62)	9,7	3,6
	<i>Agelas clathrodes</i> (#80)	2,9	4,1
	neidentificirana (#30)	7,4	4,1
	neidentificirana (#90)	18,0	1,7
neidentificirana (#108)		26,2	
Avstralske morske spužve	<i>Xestospongia pacifica</i> (#LI-2H)		2,6
	<i>Thorectandra sp.</i> (#LI-18H)	9,3	
	<i>Thorectandra sp.</i> (#LI-32H)	32,1	
	<i>Thorectandra sp.</i> (#LI-41H)	33,0	

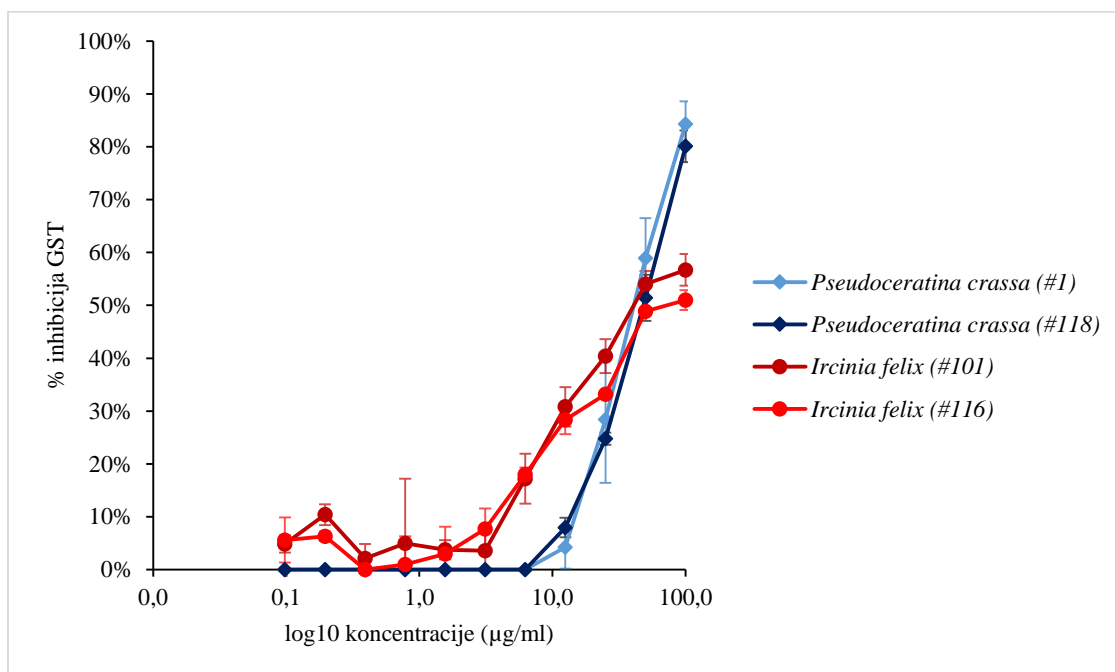
4.4 ANTI-GLUTATION S-TRANSFERAZNA AKTIVNOST

V preliminarnem testu smo opazovali aktivnost GST ob prisotnosti etanolnih ekstraktov karibskih in avstralskih morskih spužev s koncentracijo suhe snovi 77 µg/ml. Med vzorci karibskih spužev smo le pri petih ekstraktih zabeležili več kot 50% inhibicijo (**Slika 12**). Najmočnejšo inhibicijo smo zaznali pri ekstraktih vrste *Pseudoceratina crassa*, vzorca #1 in #118 sta dosegal 85% oziroma 83% padec aktivnosti GST. Pri treh ekstraktih, #101 in #116 vrste *Ircinia felix* in #31 vrste *Pseudoceratina crassa*, so zabeležili med 52% in 61% inhibicijo GST. Kar 16 od 45ih etanolnih ekstraktov karibskih spužev je povzročilo aktivacijo aktivnosti GST. Med njimi so vzorci vrst *Agelas clathrodes* (102 do 138% aktivacija GST), *Agelas conifera* (108 do 141% aktivacija GST), *Aplysina archei* (102 % aktivacija), *Myrmekioderma styx* (106% aktivacija), *Sphaciospongia vesparium* (101 do 126% aktivacija) ter neidentificirani vzorci #90 – 128%, #30 – 148% in #29 – 158% aktivacija GST.



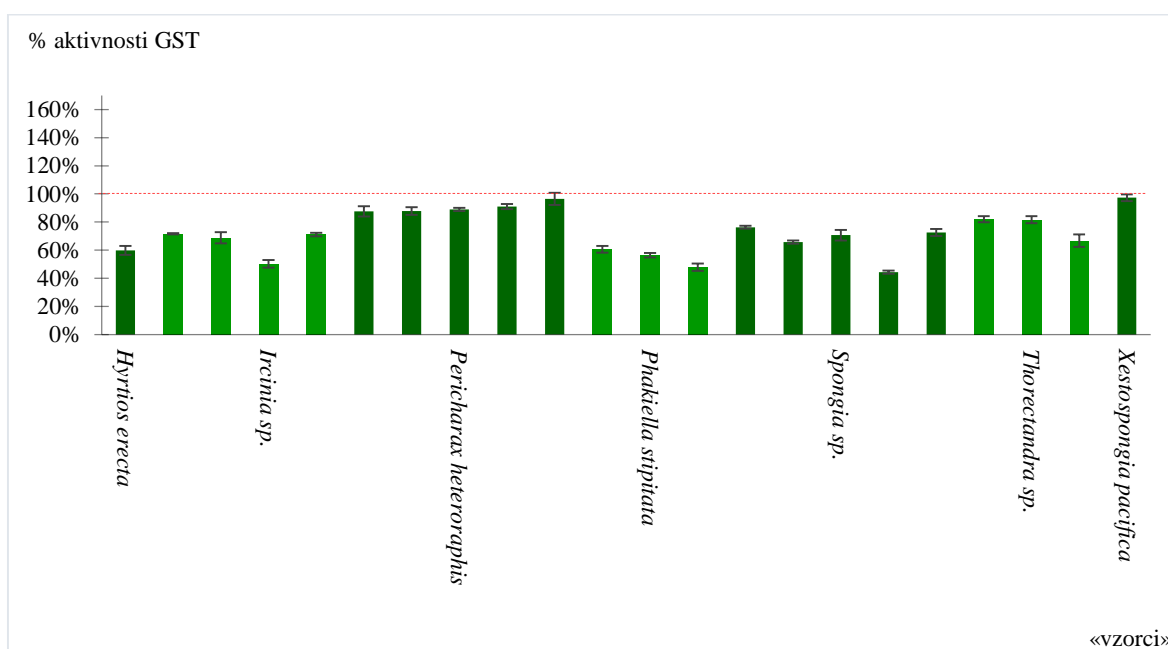
Slika 12: Delež aktivnosti glutation-S-transferaze po dodatku etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 77 µg/ml) karibskih morskih spužev.

Etanolne ekstrakte vrst *Pseudoceratina crassa* in *Ircinia felix*, ki so v preliminarnem testu najmočnejše inhibirali aktivnost GST, smo ponovno testirali. Iz krivulje inhibicije razredčin od 100 µg/ml do 0 µg/ml določimo koncentracijo pri kateri posamezen ekstrakt doseže 50% inhibicijo. Na **sliki 13** so krivulje inhibicije GST ponovno testiranih vzorcev. Kljub izraziti razliki krivulj med ekstrakti različnih vrst, so si preračunane IC₅₀ podobne. Ekstrakta #1 in #118 vrste *Pseudoceratina crassa* imata IC₅₀ 32,4 µg/ml oziroma 42,7 µg/ml, #101 in #116 vrste *Ircinia felix* pa 42,2 µg/ml oz. 82,3 µg/ml.



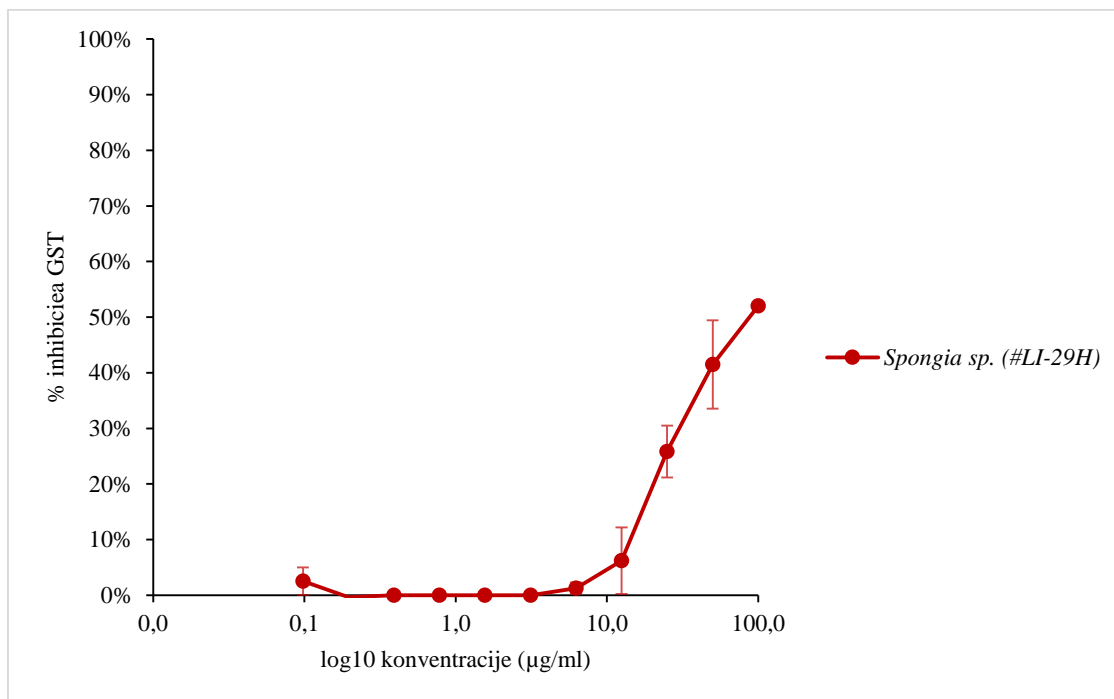
Slika 13: Krivulje inhibicij glutation-S-transferaze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti karibskih spužev.

Slika 14 prikazuje preliminarni test aktivnosti GST od dodatku ekstraktov avstralskih morskih spužev s koncentracijami 77 µg/ml. Od 21 testiranih ekstraktov smo le pri dveh opazili več kot 50% padec aktivnosti GST. Ekstrakta #LI-29H vrste *Spongia sp.* in #LI-30H vrste *Phakia stipitata* sta dosegla 56% oziroma 52% inhibicijo aktivnosti GST. Noben vzorec avstralskih spužev ni povzročil aktivacijo aktivnosti GST.



Slika 14: Delež aktivnosti glutation-S-transferaze po dodatku etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 77 µg/ml) avstralskih morskih spužev.

Ekstrakt vzorca #LI-29H vrste *Spongia sp.* smo dodatno testirali. Na **sliki 15** je krivulja inhibicije GST z razredčinami testiranega ekstrakta od 100 µg/ml do 0 µg/ml. Iz linearnega dela krivulje smo preračinali IC₅₀. Ugotovili smo, da etanolnega ekstrakta #LI-29H s koncentracijo 90,8 µg/ml doseže 50% inhibicijo GST.



Slika 15: Krivulja inhibicije glutation-S-transferaze z razredčenimi etanolnimi ekstrakti avstralske spužve.

Primerjava najbolj aktivnih vzorcev karibskih in avstralskih spužev je predstavljena v **preglednici 6**. Ekstrakti karibskih spužev skoraj dvakrat bolje inhibirajo encim GST, saj smo 50% inhibicijo dosegli z dvakrat manjšo koncentracijo substrata kot pri avstralskih spužvah.

Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi v etanolnih ekstraktih karibskih in avstralskih spužev, pri katerih dosežemo 50% inhibicijo glutation-S-transferaze. # zaporedna št. vzorca

VZOREC		Koncentracija IC ₅₀ za GST (µg/ml)
Karibske morske spužve	<i>Pseudoceratina crassa</i> (# 1)	42,7
	<i>Pseudoceratina crassa</i> (# 118)	32,4
	<i>Ircinia felix</i> (#101)	42,2
	<i>Ircinia felix</i> (#116)	82,3
Avstralske morske spužve	<i>Spongia sp.</i> (#LI-29H)	90,8

4.5 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

V **preglednici 7** so prikazani rezultati antioksidativnega testa etanolnih ekstraktov iz vzorcev karibskih spužev. Antioksidativno sposobnost, izraženo kot delež inhibicije prostega DPPH radikala, smo zaznali pri 20-ih ekstraktih. Med njimi je le ekstrakt nedeterminirane vrste (#90) presegel 50% inhibicijo. Po 30- minutni izpostavitvi raztopini DPPH smo pri valovni dolžini 517 nm izmerili 58% inhibicijo prostega DPPH radikala, kar predstavlja ekvivalent galne kisline pri koncentraciji $26,56 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/ml}$.

Testirali smo tudi vseh 21 etanolnih ekstraktov iz vzorcev avstralskih spužev z maksimalnimi koncentracijami 15 mg/ml. Sposobnosti lovljenja prostih radikalov nismo zaznali pri nobenem ekstraktu.

Preglednica 7: Rezultati testa določanja antioksidativne učinkovitosti etanolnih ekstraktov karibskih spužev z DPPH radikalom (- pod mejo detekcije). # zaporedna št. vzorca

VZOREC		% inhibicije prostega DPPH radikala	ekvivalent koncentraciji galne kisline ($\mu\text{g/ml}$)
vrsta	#		
<i>Agelas clathrodes</i>	18	7%	$3,27 \cdot 10^{-3}$
	24	8%	$3,66 \cdot 10^{-3}$
	26	8%	$3,20 \cdot 10^{-3}$
	27	9%	$3,94 \cdot 10^{-3}$
	52	21%	$9,37 \cdot 10^{-3}$
	62	23%	$10,22 \cdot 10^{-3}$
	80	24%	$10,68 \cdot 10^{-3}$
<i>Agelas conifera</i>	60	49%	$21,93 \cdot 10^{-3}$
	73	24%	$10,82 \cdot 10^{-3}$
	115	25%	$11,78 \cdot 10^{-3}$
<i>Agelas dispar</i>	20	-	-
	109	-	-
<i>Aplysina archei</i>	11	23%	$10,17 \cdot 10^{-3}$
<i>Aplysina cauliformis</i>	85	-	-
<i>Aplysina fulva</i>	10	14%	$5,65 \cdot 10^{-3}$
<i>Aplysina lacunosa</i>	41	19%	$8,47 \cdot 10^{-3}$
<i>Callyspongia plicifera</i>	43	-	-
	128	-	-
<i>Holospamma helwigi</i>	37	-	-
	102	-	-
<i>Ircinia felix</i>	82	12%	$4,78 \cdot 10^{-3}$
	82*	-	-
	101	-	-
	116	-	-
	123	-	-
	126	-	-

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7: Rezultati testa določanja antioksidativne učinkovitosti etanolnih ekstraktov karibskih spužev z DPPH`radikalom (- pod mejo detekcije). # zaporedna št. vzorca

VZOREC		% inhibicije	ekvivalent koncentraciji
vrsta	#	prostega DPPH`radikala	galne kisline (µg/ml)
<i>Ircinia strobilina</i>	17	-	-
	36	-	-
	91	-	-
	125	-	-
<i>Myrmekioderma styx</i>	86	-	-
<i>Pandaros acanthifolium</i>	65	-	-
<i>Pseudoceratina crassa</i>	31	43%	7,44 *10 ⁻³
	39	-	-
	118	19%	8,35 *10 ⁻³
	121	-	-
	1	35%	15,35 *10 ⁻³
<i>Scopalina ruetzleri</i>	78	-	-
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	69	-	-
	111	-	-
<i>Xestospongia muta</i>	131	-	-
neidentificirana	29	-	-
	30	8%	3,34 *10 ⁻³
	90	57%	26,56 *10 ⁻³
	108	5%	1,63 *10 ⁻³

4.6 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

V testu hemolitične aktivnosti smo etanolnim ekstraktom iz vzorcev karibskih in avstralskih spužev določili polovični čas hemolize oziroma čas v katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov izmerjena pri 650 nm pade za 50%. Hemolitično aktivnost karibskih spužev smo zabeležili pri 15 od 45 testiranih ekstraktov, od tega je sedem ekstraktov (neidentificiran vzorec #30, vzorci vrste *Agelas clathrodes*: #24, #26, #27, #52, #62, #80) kazalo močno hemolitično aktivnost; polovični čas hemolize je bil krajši od 5 minut (**Preglednica 8**). Ekstrakt vzorca #27 vrste *Agelas clathrodes* je bil daleč najbolj hemolitičen, saj je hemoliza potekla le v 45 sekundah. Ekstrakt neidentificiranega vzorca #29 je šibko hemolitičen, polovični čas hemolize je potekel med 10 in 15 minut. Sedem ekstraktov karibskih spužev je kazalo zelo šibko hemolizo, polovični čas hemolize je bil daljši od 15 minut.

Preglednica 8: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 100 µg/ml) karibskih spužev. Hemolitično aktivnost smo ovrednotili na naslednji način:

- +++ → t_{50} poteče v času do 5 minut (močna hemoliza)
 ++ → t_{50} poteče v času od 5 do 10 minut (zmerna hemoliza)
 + → t_{50} poteče v času od 10 do 15 minut (šibka hemoliza)
 O → t_{50} poteče v času od 15 do 30 minut
 - → t_{50} poteče v času po 30 minutah oz. ni potekla

t_{50} = razpolovni čas hemolize oziroma čas, v katerem so lizira 50% eritrocitov; # zaporedna št. vzorca

VZOREC		Hemolitična aktivnost	
vrsta	#	$1/t_{50}$ (min ⁻¹)	t_{50}
<i>Agelas clathrodes</i>	18	0,06 ± 0,01	o
	24	0,25	+++
	26	0,23 ± 0,05	+++
	27	1,50 ± 0,5	+++
	52	0,23 ± 0,02	+++
	62	0,27 ± 0,02	+++
	80	0,33	+++
<i>Agelas conifera</i>	60		-
	73		-
	115		-
<i>Agelas dispar</i>	20		-
	109		-
<i>Aplysina archei</i>	11		-
<i>Aplysina cauliformis</i>	85		-
<i>Aplysina fulva</i>	10		-
<i>Aplysina lacunosa</i>	41		-
<i>Callyspongia plicifera</i>	43		-
	128		-
<i>Holospamma helwigi</i>	37		-
	102		-
<i>Ircinia felix</i>	82		-
	82*	0,04 ± 0,01	o
	101		-
	116	0,03	o
	123	0,04	o
<i>Ircinia strobilina</i>	126		-
	17	0,04	o
	36		-
	91		-
<i>Myrmekioderma styx</i>	125		-
	86		-
<i>Pandaros acanthifolium</i>	65		-
<i>Pseudoceratina crassa</i>	1		-
	31		-
	39		-
	118		-
	121		-
<i>Scopalina ruetzleri</i>	78		-
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	69	0,06	o
	111		-

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 8: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 100 µg/ml) karibskih spužev.

VZOREC		Hemolitična aktivnost	
vrsta	#	1/t ₅₀ (min ⁻¹)	t ₅₀
<i>Xestospongia muta</i>	131		-
neidentificirana	29	0,22 ± 0,18	+
	30	0,50	+++
	90	0,06	o
	108		-

V **preglednici 9** so rezultati hemolitičnega testa etanolnih ekstraktov vzorcev avstralskih spužev. Opazili smo manjšo hemolitično aktivnost kot pri karibskih spužvah. Močne in zmerne hemolitične aktivnosti nismo zabeležili. Pet ekstraktov je bilo zelo šibko hemolitičnih. Med njimi sta ekstrakta vzorcev *Spongia sp.* (#LI-13H in #LI-29H) in ekstrakti *Thorectandra sp.* (#LI-41H), *Ircinia sp.* (#LI-45H) ter *Phakiella stipitata* (#LI-14H). Izmed vseh 21 vzorcev avstralskih spužev je slednji izrazil najmočnejšo hemolitično aktivnost.

Preglednica 9: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 100 µg/ml) avstralskih spužev. Hemolitično aktivnost smo ovrednotili na naslednji način:

- +++ → t₅₀ poteče v času do 5 minut (močna hemoliza)
- ++ → t₅₀ poteče v času od 5 do 10 minut (zmerna hemoliza)
- + → t₅₀ poteče v času od 10 do 15 minut (šibka hemoliza)
- o → t₅₀ poteče v času od 15 do 30 minut
- → t₅₀ poteče v času po 30 minutah oz. ni potekla

t₅₀ = razpolovni čas hemolize oziroma čas, v katerem so lizira 50% eritrocitov; # zaporedna št. vzorca

VZOREC		Hemolitična aktivnost	
vrsta	#	1/t ₅₀ (min ⁻¹)	t ₅₀
Hirtios erecta	LI-9H		-
Ircinia sp.	LI-17H		-
	LI-33H		-
	LI-45H	0,033	o
	LI-49H		-
Pericharax heteroraphis	LI-1H		-
	LI-4H		-
	LI-7H		-
	LI-15H		-
	LI-16H		-
Phakiella stipitata	LI-14H	0,047 ± 0,005	o
	LI-22H		-
	LI-30H		-

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 9: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov (konc. s.s. 100 µg/ml) avstralskih spužev

VZOREC	Hemolitična aktivnost			
	vrsta	#	1/t ₅₀ (min ⁻¹)	t ₅₀
<i>Spongia sp.</i>		LI-8H	-	-
		LI-13H	0,036 ± 0,003	o
		LI-21H	-	-
		LI-29H	0,044 ± 0,002	o
		LI-36E	-	-
<i>Thorectandra sp.</i>		LI-18H	-	-
		LI-41H	0,038 ± 0,001	o
		LI-32H	-	-
<i>Xestospongia pacifica</i>		LI-2H	-	-

V **preglednici 10** so predstavljeni rezultati hemolitičnega testa razredčenih etanolnih ekstraktov karibskih spužev, ki so v preliminarnem testu kazali močno hemolitično aktivnost.. Močno hemolitične ekstrakte karibskih spužev smo redčili 1:2 od 100 µg/ml do 0 µg/ml ter ponovili test hemolize. Kljub šibki hemolitični aktivnosti smo v ponovni test vključili tudi ekstrakt vrste *Phakiella stipitata* (#LI-14H) iz skupine avstralskih spužev. Najhitrejši padec hemolitične aktivnosti smo opazili pri ekstraktu vrste *Agelas clathrodes* (#26), hemoliza je potekla le pri prvi razredčitvi 100 µg/ml. Vsi ostali razredčeni ekstrakti so bili hemolitični tudi pri razredčitvi 50 µg/ml. Najmanjši polovični čas hemolize pri redčiti 100 µg/ml je imel ekstrakt vrste *Agelas clathrodes* (#27) in sicer 60 sekund.

Preglednica 10: Zasledovanje hemolize v razredčenih aktivnih ekstraktih avstralskih in karibskih morskih spužev.

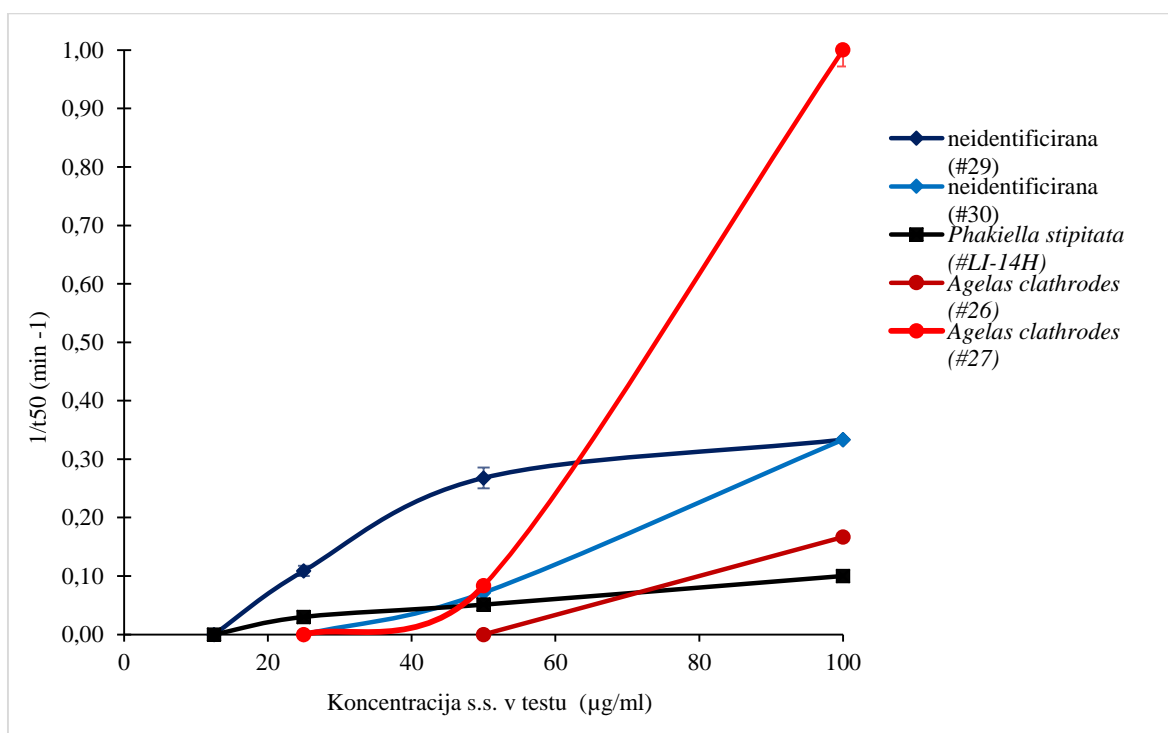
VZOREC	Koncentracija dodane snovi v testu (µg/ml)	aktivnost	
		hemolize 1/t ₅₀	
Karibske morske spužve	100	0,20	
	<i>Agelas clathrodes</i> (#24)	50	0,02 ± 0,017
		25	-
		100	0,17
	<i>Agelas clathrodes</i> (#26)	50	-
		25	-
		100	1,00
	<i>Agelas clathrodes</i> (#27)	50	0,08 ± 0,028
		25	-
	100	0,18 ± 0,017	
	50	0,03	
	25	-	
	100	0,25	
<i>Agelas clathrodes</i> (#62)	50	0,05 ± 0,001	
	25	-	

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Zasedovanje hemolize v razrečenih aktivnih ekstraktih avstralskih in karibskih morskih spužev.

VZOREC		Koncentracija dodane snovi v testu ($\mu\text{g/ml}$)	aktivnost hemolize $1/t_{50}$
Karibske morske spužve	<i>Agelas clathrodes</i> (#80)	100	0,33
		50	0,05
		25	-
	neidentificirana (#30)	100	0,33
		50	0,07
		25	-
Avstralske morske spužve	<i>Phakiella stipitata</i> (#LI- 14H)	100	0,1
		50	0,051
		25	0,03

Odvisnost recipročnega polovičnega časa hemolize od koncentracije testnih ekstraktov, ki so kazali najmočnejšo hemolitično aktivnost je prikazana na **sliki 16**. Karibske spužve zastopajo vzorci *Agelas clathrodes* (#26 in #27) ter neidentificiran vzorec #30. Avstralske spužve pa vzorec #LI-14H vrste *Phakiella stipitata*. Standardne deviacije so zanemarljivo majhne. Jasno je vidna razlika med avstralskimi (črna črta) in karibskimi (modri in rdeči črti) vzorci spužev. Avstralske spužev imajo manjšo hemolitično aktivnost kot karibske.



Slika 16: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize od koncentracije suhe snovi v etanolnih ekstraktih karibskih (modri in rdeči črti) ter avstralskih spužev (črna črta).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo testirali etanolne ekstrakte 21 vzorcev iz sedmih avstralskih vrst morskih spužev nabranih na morskem grebenu otoka Lizard (**slika 2**) ter 45 vzorcev iz osemnajstih karibskih vrst spužev nabranih na morskem grebenu južne obale otoka Curaçao (**slika 1**). S preliminarnimi testi smo etanolnim ekstraktom vseh 66 vzorcev določili anti-acetilholinazno, anti-butirilholinesterazno, anti-glutation-S-transferazno, hemolitično ter antioksidativno aktivnost. V prilogi A je preglednica objavljenih raziskav opisanih naravnih produktov iz morskih spužev, ki smo obdelali v tej raziskovalni nalogi. Podatke iz literature smo primerjali z našimi ugotovitvami. Zanimalo nas je namreč, če so aktivnosti opažene v naših testih že bile opisane.

Morske spužve so v odrasli fazi sesilni filtratorji in so za obrambo razvile sintezo raznolikih sekundarnih metabolitov oziroma bioaktivne komponente. Le te jim zagotavljajo kemično obrambo pred okoljskimi dejavniki kot so bakterijske okužbe, plenjenje, obraščanje z drugimi organizmi ter omogočajo tekmovanje za prostor. Največjo produkcijo strupenih metabolitov najdemo v habitatnem tipu koralnih grebenov, kjer intenzivno plenjenje (veliko število mesojedih rib) in močna konkurenca za prostor predstavljata velik ekološki pritisk na sesilne organizme. Bolj izpostavljene spužve tako razvijejo več obrambnih toksičnih metabolitov kot manj izpostavljene. Adaptacije na mikrohabitate povzročijo razlike v biokemični sestavi spužev znotraj ene vrste (Proksch, 1994). Omenjeni pojav smo opazili pri anti-acetilholinesterazni, anti-butirilholinesterazni in hemolitični aktivnosti rodu *Ircinia* ter pri antioksidativnem testu vzorcev vrste *Pseudoceratina crassa*. Obe vrsti, *Ircinia felix* in *Ircinia strobilina*, sta bili nabrani v karibskem morju (otok Curaçao). Izmed šestih ekstraktov vrste *I. felix*, so štiri povzročili med 55% in 68% inhibicijo BChE, medtem ko sta dva ekstrakta inhibirala le med 33% in 39%. Trije od štirih ekstraktov iz vrste *I. strobilina* so povzročili med 30% in 34% inhibicijo AChE, medtem ko je ekstrakt vzorca #125 dosegel le 2% inhibicijo. Med petimi vzorci vrste *Pseudoceratina crassa*, smo antioksidativno aktivnost zabeležili le pri treh. Ker nimamo točnih lokacijskih podatkov za vsak posamezni vzorec, ne moremo z gotovostjo trditi, da so omenjena odstopanja posledica mikrohabitatnih razlik.

V zadnjih letih so iz 25 vrst morskih spužev, pregledanih v tej nalogi, izolirali mnogo novih, kemijsko edinstvenih spojin z zelo različnimi biološkimi aktivnostmi. Iz morske spužve rodu *Ircinia* izoliran cikloteonamid E4, z IC₅₀ 5,1 nM, kaže močno inhibitorno aktivnost proti humani triptazi in ima velik potencial kot terapevtsko sredstvo pri zdravljenju alergijskih bolezni (Murakami in sod., 2002). Spongistatin 1, makrociklični lakton polieter iz morske

spužve *Hyrtios erecta*, je potencialni antimikotik ter lahko služi kot orodje za študije glivične morfogeneze in delitev jedra celice (Pettit in sod., 1998b). Diacetatne soli, bromopirolovi alkaloidi in skeptrin, izolirani iz karibske morske spužve *Agelas conifera* delujejo protivirusno in protibakterijsko (Keifer in sod., 1991). Spojine izolirane iz metanolnega ekstrakta spužve (družine *Aplysinellidae*) so pokazale zmerno inhibicijo asparaginske proteaze (BACE1), ki ima osrednjo vlogo pri nastanku Alzheimerjeve bolezni (Dai in sod., 2016).

Inhibitorji AChE izboljšujejo prenos živčnega signala preko nevrotansmitorjev v holineričnih sinapsah. Inhibicija encima, ki odcepi in razgradi nevrotansmitor iz postsinaptične membrane, vpliva pozitivno na okvare holinerične nevrotansmisije značilne za Alzheimerjevo bolezen. S preliminarnimi testi inhibicije AChE in BChE smo preverili prisotnost aktivnih spojin v 21 vzorcih avstralskih spužev in 45 vzorcih karibskih spužev. Močno inhibicijo AChE (več kot 70%) je povzročilo 9 vzorcev karibskih spužev (**Slika 4**), 7 vzorcev vrste *Agelas clathrodes* ter 2 neidentificirana vzorca. Najboljše rezultate so dosegli ekstrakti vrste *Agelas clathrodes*. Aktivnost AChE je ob dodatku ekstrakta omenjene vrste (koncentracija s. s. 95 µg/ml) padla za 97% (vzorec #27) – 80% (vzorec #24). Polovična inhibitorna koncentracija ekstraktov *A. clathrodes* se giblje med 2,4 µg/ml (vzorec #18) in 9,7 µg/ml (vzorec #62). Visoko stopnjo inhibicije AChE so zaznali tudi v vodnih ekstraktih (Dolinšek, 2007), acetonskih in metanolnih ekstraktih (Likar 2007; Sepčić in sod. 2010) vrste *Agelas clathrodes*. V preliminarnem testu inhibicije AChE avstralskih spužev so bili aktivni le ekstrakti vrste *Thorectandra sp.* in ekstrakt vrste *Xestospongia pacifica*, vendar nobeden od njih ni presegel 50% inhibicije (**Slika 6**). Pri ponovnem testu so ekstrakti vrste *Thorectandra sp.* dosegli IC₅₀ pri koncentracijah 9,3 µg/ml (vzorec #LI-18H), 33 µg/ml (vzorec #LI-41) in 32,1 µg/ml (vzorec #LI-32) (**Slika 7**).

Močno inhibicijo BChE smo zaznali pri 9 vzorcih karibskih in le 1 vzorcu avstralskih spužev. Enako kot pri inhibiciji AChE so tudi BChE najboljše inhibirali vzorci vrste *Agelas clathrodes*. Aktivnost BChE je ob dodatku ekstrakta omenjene vrste (koncentracija s. s. 95 µg/ml) padla za 100% (vzorci #27, #52, #80) – 97,25% (vzorec #62) (**Slika 8**). Polovična inhibitorna koncentracija (za BChE) ekstraktov *A. clathrodes* se giblje med 0,7 µg/ml (vzorec #26) in 4,1 µg/ml (vzorec #80). Med njimi bi bilo potrebno izpostaviti vzorec #27, saj je njegov ekstrakt dosegel 100% inhibicijo ter IC₅₀ pri 0,7 µg/ml. Visoke stopnje inhibicije smo zaznali tudi pri dveh nedeterminiranih vrstah, #30 in #90 oba z 99% inhibicijo (IC₅₀ 4,1 µg/ml oziroma 1,7 µg/ml). Med avstralskimi vzorci je bil močno aktiven le ekstrakt #LI-2H vrste *Xestospongia pacifica* (86% inhibicija BChE, IC₅₀ 2,6 µg/ml) (**Slika 10**). V literaturi je malo podatkov o toksinih iz morskih spužev, ki bi inhibirali BChE. Neeman s sod. (1975) opisuje organske ekstrakte iz spužve *Latrunculia magnifica* kot aktivne inhibitorje BChE (Nèeman in sod., 1975).

Inhibitorji GST so obetavna terapevtska sredstva za zmanjševanje razvoja odpornosti, ki se razvije ob kombinaciji različnih anti-tumorskih zdravil. Uporabljajo se tudi v diagnostični medicini ter v razvoju antiparazitskih zdravil (Mathew in sod., 2006; Sau in sod., 2010). Več kot 50% inhibicijo GST so povzročili vzorci iz dveh vrst karibskih (*Pseudoceratina crassa*, *Ircinia felix*) in dveh avstralskih spužev (*Phakiella stipitata*, *Spongia sp.*). Najbolj aktivne ekstrakte ponovno najdemo med karibskimi spužvami. Ekstrakti vrste *Pseudoceratina crassa* so pri koncentraciji s.s. 77 µg/ml dosegli med 61% (vzorec #31) in 85% (vzorec #1) padec aktivnosti GST (**Slika 12**). Polovična inhibitorno koncentracijo (za GST) smo preračunali za ekstrakte vrste *Pseudoceratina crassa* in manj aktivne ekstrakte vrste *Ircinia felix*. Presenetljivo, povsem različni krivulji inhibicije imata podobne IC₅₀ (**Slika 13**). Kar 16 od 45 etanolnih ekstraktov karibskih spužev je povzročilo aktivacijo aktivnosti GST. Med njimi so vzorci vrst *Agelas clathrodes*, *Agelas conifera*, *Aplysina archei*, *Myrmekioderma styx*, *Spheciospongia vesparium* ter neidentificirani vzorci #90, #30 in #29. Pri slednjem smo zaznali najmočnejšo aktivacijo (158%). Ekstrakti avstralskih spužev so se izkazali za slabše inhibitorje GST. Čeprav so morske spužve vir zelo raznolikih spojin, ni podatka, da bi bila katerakoli med njimi aktivni inhibitor GST. Naši rezultati nakazujejo na potencial sekundarnih metabolitov morskih spužev kot aktivnih inhibitorjev GST. Vse naše ugotovitve o inhibiciji GST z etanolnimi ekstrakti morskih spužev so novost in niso bile do sedaj še nikoli opisane v literaturi. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno ugotoviti, katera snov povzroča inhibicijo GST.

Antioksidativna zdravila so se izkazala za učinkovita v mišjih modelih Alzheimerjeve bolezni, manj uspešna pa v humanih poskusih. Potrebne so nadaljnje raziskave, ki bi dale odgovor ali antioksidanti zmanjšajo tveganje oziroma upočasnijo napredovanje Alzheimerjeve bolezni (Feng in Wang, 2012). V diplomskem delu smo antioksidativno aktivnost opazili le pri vzorcih karibskih spužev. Inhibicijo prostega DPPH radikala, smo zaznali pri 20 od 45 ekstraktov. Med njimi je le neidentificiran vzorec #90 presejal 50% inhibicijo. Kljub koncentriranju vzorcev do 15 mg/ml, niti en vzorec avstralskih spužev ni bil antioksidativno aktiven.

Močno hemolitično aktivnost pri koncentraciji s.s. 100 µg/ml smo zabeležili le pri vrsti *Agelas clathrodes* (#24, #26, #27, #52, #62, #80) in vzorcu #30 nedeterminirane vrste (**preglednica 8**). Vsi našti vzorci pripadajo karibski skupini. Najmočnejšo aktivnost smo zabeležili pri vzorcu #27, kjer je hemoliza potekla v manj kot minuti (45 sekund). Šibko hemolitično aktivnost je izrazil karibski vzorec #29 nedeterminirane vrste. Sedem vzorcev karibskih spužev (*Agelas clathrodes* #18, *Ircinia felix* #82* / #116 / #123, *Ircinia strobillina* #17, *Spheciospongia vesparium* #69 in vzorec #90 nedeterminirane vrste) in 5 vzorcev avstralskih spužev (*Spongia sp.* #LI-13H / #LI-29H, *Thorectandra sp.* #LI-41H, *Ircinia sp.* #LI-45H ter *Phakiella stipitata* #LI-14H) je bilo zelo šibko hemolitičnih, polovični čas hemolize je bil med 15 in 30 minutami. Močno hemolitične vzorce smo redčili z etanolom

in jih ponovno testirali. Pri ponovnem testiranju z razredčinami ekstrakta med 100 µg/ml in 0 µg/ml je z zmanjšanjem koncentracije vzorca pričakovano padla tudi hemolitična aktivnost. Hemolizo smo lahko zasledovali le pri razredčitvah 25, 50 in 100 mg/ml. Ponovno smo testirali tudi ekstrakt #LI-14H avstralske spužve *Phakiella stipitata*. Najmanjši padec hemolitične aktivnosti smo opazili pri ekstraktih vrste *Phakiella stipitata* (#LI-14H) in neidentificiranega vzorca (#29). Edino pri slednjih smo hemolizo zaznali tudi pri koncentraciji 25 µg/ml (**Slika 16**).

Z izjemo vrste *Agelas clathrodes*, lahko zaključimo, da testirane vrste spužev ne izražajo konsistentne hemolitične aktivnosti, kar je verjetno posledica filtratorskega načina prehranjevanja, ki ne zahteva specializiranega strupnega aparata (Sepčić in sod., 1997). Močno hemolitično aktivnost vrste *Agelas clathrodes* so zaznali tudi v acetonskih, butanolnih in metanolnih ekstraktih (Sepčić in sod. 2010; Likar 2007). Likar in sod. (2007) so ugotovili, da se znotraj rodu *Agelas*, hemoliza pojavlja le pri vrsti *Agelas clathrodes*. Tudi v naši raziskavi nismo zaznali hemolize pri vrstah *Agelas conifera* in *Agelas dispar*. Zanimivo je, da etanolni ekstrakti vrst *Aplysina fulva*, *Ircinia felix*, *Ircinia strobilina*, *Pseudoceratina crassa* in *Pericharax heteroraphis* niso hemolitični, medtem ko metanolni in acetonski ekstrakti istih vrst izražajo močno hemolitično aktivnost (Marinšek 2010; Likar 2007; Sepčić in sod. 2010).

Med karibskimi vrstami izrazito izstopa vrsta *Agelas clathrodes*. Poleg močne hemolitične aktivnosti in zmerne antioksidativne sposobnosti, je vseh 7 vzorcev te vrste inhibiralo tako AChE kot BChE. Med njimi še posebej izstopa vzorec #27 s 97% inhibicijo AChE, 100% inhibicijo BChE in močno hemolitično aktivnost ($t_{50} = 45s$). Močno anti-AChE in hemolitično aktivnost so zabeležili tudi pri acetolnih, butanolnih in metanolnih ekstraktih vrste *Agelas clathrodes* (Likar 2007; Sepčić in sod. 2010). Naši rezultati se ujemajo s podatki iz literature, saj so iz spužve *Agelas clathrodes* že izolirali številne sekundarne metabolite z zanimivimi biološkimi učinki kot je protibakterijsko, protiglivno, antispazmično, antihistaminsko in antiholinergično delovanje (**priloga A**). Najpogostejša vrsta sekundarnih metabolitov so bromopirolni alkaloidi. Cafieri s sod. (1997) je iz metanolnega ekstrakta spužve *A. clathrodes* izoliral in opisal naslednje alkaloide: skeptrin, oroidin, algelongin, klatramide, dispakamide A-C in dispakamide B-D. Dispakamid A izkazuje močno reverzibilno nekompetitivno antagonistično delovanje na histaminske receptorje tipa H1 (zaviranje vnetja). Oroidin in skeptrin kažeta inhibitorno delovanje na napetostno odvisne kalcijeve kanalčke ter delujeta kot antagonista na holinergetičnih in serotoninskih receptorjih. Skeptrin je med drugim tudi najmočnejši zaviralec somatostatina (inhibitor ACh v hipotalamusu) in je posledično potencialna zdravilna učinkovina proti Alzheimerjevi bolezni (Vassas in sod., 1996).

Najmočnejšo inhibicijo GST smo zabeležili pri vrsti *Pseudoceratina crassa*. Med petimi vzorci sta najmočnejše inhibirala GST #1 in #118 in sta hkrati edina vzorca te vrste brez

antioksidativne aktivnosti. Drugi trije vzorci so izrazili močno antioksidativno aktivnost, inhibicija GST pa je bila komaj zaznana ali odsotna. Constantino s sod. (1993) opisuje dva glikolipidna analoga iz spužve *Pseudoceratina crassa*, ciantivigin AC in ciantivigin AD. V literaturi nismo našli podatka o inhibiciji ali aktivaciji GST s sekundarnimi metaboliti iz morskih spužev.

Antioksidativno aktivnost smo zaznali pri vrstah *Agelas clathrodes*, *Agelas conifera*, *Aplysina archei*, *Aplysina fulva*, *Aplysina lacunosa*, *Ircinia felix* in *Pseudoceratina crassa*. Naštete vrste so povzročile zelo nizko inhibicijo prostega DPPH· radikala. Niti en vzorec avstralskih spužev ni kazal antioksidativne aktivnosti. Avstralske spužve so se izkazale za manj aktivne v vseh opravljenih testih. Kaže da so spužve iz avstralskega morja pod manjšim okoljskim pritiskom kot karibske. Izjema je rod *Xestospongia*. *Xestospongia muta* iz skupine karibskih spužev, je bila povsem neaktivna pri vseh opravljenih testih, med tem pa je avstralska vrsta *Xestospongia pacifica* močno inhibirala BChE. V literaturi ni podatkov o inhibiciji BChE z organskimi ekstrakti omenjene vrste. Poleg inhibicije BChE je *Xestospongia pacifica* izražala tudi nizko inhibicijo AChE. Zanimivo je, da so v vodnih (surovih in kuhanih) in organskih (acetolnih, butanolnih, metanolnih) ekstraktih te vrste zaznali močno inhibicijo AChE (Likar 2007; Dolinšek 2007; Sepčić in sod. 2010).

Med 24-imi pregledanimi vrstami bi na koncu izpostavili vrste *Agelas clathrodes*, *Pseudoceratina crassa*, ter *Xestospongia pacifica*. Spužva *Agelas clathrodes* je izmed vseh pregledanih vrst najprimernejši kandidat za nadaljnje raziskave. Iz etanolnih ekstraktov bi bilo potrebno izolirati in opisati aktivne snovi, saj do sedaj še ni bilo opisane učinkovine, ki bi imela inhibitorno funkcijo tako za AChE kot za BChE ter bila hkrati antioksidativna oziroma hemolitična. V nadaljnjih raziskavah bi bilo zanimivo ugotoviti tudi kateri metabolit vrste *Pseudoceratina crassa* inhibira GST. V literaturi nismo našli podatka o podobni aktivnosti te vrste. Prav tako ni podatka o izoliranih učinkovinah iz vrste *Xestospongia pacifica*, za katero smo ugotovili, da močno inhibira BChE ter ima tudi šibko anti-AChE aktivnost. Posledično bi tudi to vrsto uvrstili med potencialno zanimive vrste za nadaljnje raziskave.

5.2 SKLEPI

V diplomski nalogi smo raziskali vpliv etanolnih ekstraktov karibskih in avstralskih morskih spužev na aktivnost AChE, BChE in GST. Vzoredno smo opravili tudi teste antioksidativne in hemolitične aktivnosti. V naslednjih točkah so povzete glavne ugotovitve opravljenih testov:

Močno inhibicijo AChE je povzročilo 9 vzorcev karibskih spužev, 7 vzorcev vrste *Agelas clathrodes* ter 2 neidentificirana vzorca. Najboljše rezultate so dosegli vzorci vrste *Agelas clathrodes*, z inhibicijo AChE med 97% in 80% (IC_{50} 2,4 – 9,7 $\mu\text{g/ml}$). V preliminarnem testu inhibicije AChE avstralskih spužev so bili aktivni le štirje vzorci, vendar nobeden od njih ni presegel 50% inhibicije encimske aktivnosti;

Močno inhibicijo BChE smo zaznali pri 9 vzorcih karibskih in 1 vzorcu avstralskih spužev. Enako kot pri inhibiciji AChE so tudi BChE najboljše inhibirali vzorci vrste *Agelas clathrodes*, z inhibicijo BChE med 100% in 97% (IC_{50} 0,7 – 4,1 $\mu\text{g/ml}$). Med avstralskimi vrstami je bila močno inhibitoren le ekstrakt vrste *Xestospongia pacifica* (IC_{50} 2,6 $\mu\text{g/ml}$);

Najmočnejšo inhibicijo GST smo zabeležili pri vrsti *Pseudoceratina crassa*, katere vzorci so edini presegli 80% padec aktivnosti. Karibski vzorci boljše inhibirajo encim GST;

Močno hemolitično aktivnost smo zabeležili le pri vrsti *Agelas clathrodes* in neidentificiranem vzorcu #30. Najmočnejšo aktivnost smo zaznali pri ekstraktu #27 vrste *Agelas clathrodes*, kjer je hemoliza potekla v manj kot minuti (45 sekund);

Antioksidativno aktivnost smo zaznali pri vrstah *Agelas clathrodes*, *Agelas conifera*, *Aplysina archei*, *Aplysina fulva*, *Aplysina lacunosa*, *Ircinia felix* in *Pseudoceratina crassa*. Naštete vrste so izrazile zelo nizke inhibicije prostega DPPH· radikala. Le neidentificiran vzorec #90 je presegel 50% inhibicijo ter bil posledično najmočnejši antioksidant. Ekstrakti iz skupine avstralskih spužev niso antioksidativno aktivni;

Med 24-imi pregledanimi vrstami nismo našli vrste, ki bi bila aktivna v vseh petih testih. Najboljše rezultate smo dobili pri vrsti *Agelas clathrodes*, saj je bila močno aktivni inhibitor tako AChE kot BChE ter hkrati antioksidativno in hemolitično aktivna. Med številnimi izoliranimi biološkimi učinkovinami te vrste nismo našli take, ki bi bila inhibitor holinesteraz ter hkrati antioksidant;

Vrsta *Pseudoceratina crassa* se je izkazala kot učinkoviti inhibitor GST. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smotno ugotoviti katera učinkovina ima to funkcijo;

Avstralske spužev so se izkazale za manj aktivne v vseh opravljenih testih. Antioksidativne aktivnosti nismo zaznali. Hemolitična aktivnost petih aktivnih vzorcev je bila zelo šibka. Noben vzorec avstralskih spužev ni presegel 50% inhibicije AChE in GST. Izjema je le vrsta *Xestospongia pacifica* s močno inhibicijo BChE. Kaže, da so spužve iz avstralskega morja pod manjšim okoljskim pritiskom kakor karibske.

6 POVZETEK

Morske spužve (Porifera) so zaradi sesilnega načina življenja razvile številne biološko aktivne sekundarne metabolite, s katerimi preprečujejo obraščanje ter se branijo pred plenilci in kompetitorji. Iz spužev izolirane snovi predstavljajo skoraj polovico vseh farmakološko aktivnih učinkovin morskega izvora. Mnoge med njimi so potencialne učinkovine za boj proti raku in Alzheimerjevi bolezni. Slednja je postala ena glavnih skrbi javnega zdravstva, saj je skupno število oseb z demenco v letu 2010 ocenjeno na 35,6 milijona ljudi. Rak velja za enega glavnih vzrokov smrti. V letu 2012 je za posledicami rakavih obolenj umrlo 8,2 milijona ljudi. Odkrivanje novih aktivnih učinkovin je ključnega pomena pri razvoju zdravil. Znanost se je v zadnjih letih lotila raziskav zdravil z novo strategijo delovanja. Tako imenovana 'multi target' zdravila delujejo na več celičnih mehanizmov hkrati. Posledično smo na izbranih vzorcih spužev vzporedno opravili 5 različnih testov.

Etanolne ekstrakte 45 vzorcev spužev, nabranih na morskem grebenu otoka Curacao v Karibskem morju in 21 vzorcev nabranih okrog otoka Lizard v Avstraliji, smo testirali na aktivnost AChE, BChE in GST. Dodatno smo opravili tudi teste antioksidativne in hemolitične aktivnosti.

Rezultati so pokazali, da so avstralske spužve manj aktivne kakor karibske. Med slednjimi se je vrsta *Agelas clathrodes* izkazala za najbolj učinkovito. To potrjujejo tudi podatki iz literature, saj so iz te vrste v preteklosti izolirali že številne biološke učinkovine. Med njimi ni take, ki bi bila hkrati inhibitor holinesteraz in antioksidant. Posledično priporočamo nadaljnje raziskave te vrste. Vrsta *Pseudoceratina crassa* pa se je izkazala kot učinkovit inhibitor GST. Ker ta aktivnost v ekstraktih morskih spužev še ni bila opisana, bi bilo v nadaljnjih raziskavah smotno ugotoviti katera učinkovina ima to funkcijo.

7 VIRI

- Acosta A.L., Rodriguez AD. 1992. 11-Oxoaoerthionin: A cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *Journal of Natural Products*, 55: 1007–1012
- Albrizio S., Fattorusso E., Magno S., Mangoni A., Pansini M. 1992. Linear diterpenes from the Caribbean sponge *Myrmekioderma styx*. *Journal of Natural Products*, 55: 1287–1293
- Alvarez A., Opazo C., Alarcón R., Garrido J., Inestrosa NC. 1997. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 272: 348–361
- Anand P., Singh, B. 2013. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 36: 375–399
- Aoki S., Fudetani R., Akiyama S., Kobayashi M. 1999. Reversal of Multidrug Resistance in Human Carcinoma Cell Line by Agosterols, Marine Spongean Sterols. *Tetrahedron*, 55: 13965–13972
- Aoki S., Ye Y., Higuchi K., Takashima A., Tanaka Y., Kitagawa I., Kobayashi M. 2001. Novel neuronal nitric oxide synthase (nNOS) selective inhibitors, aplysinopsin-type indole alkaloids, from marine sponge *Hyrtios erecta*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49: 1372–1374
- Assmann M., Lichte E., Pawlik J.R., Kick, M. 2000. Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. *Marine Ecology Progress Series Journal*, 207: 255–262
- Balansa W., Islam R., Fontaine F., Piggott A.M., Zhang H., Webb T.I., Gilbert D.F., Lynch J.W., Capon R.J. 2010. Ircinialactams: Subunit-selective glycine receptor modulators from Australian sponges of the family Irciniidae. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18: 2912–2919
- Bescansa P. 1986. Sesterterpenes from a common marine sponge *Hyrtus erecta*. *Journal of Natural Products*, 49: 1041–1052
- Bickmeyer U. 2005. Bromoageliferin and dibromoageliferin, secondary metabolites from the marine sponge *Agelas conifera*, inhibit voltage-operated, but not store-operated calcium entry in PC12 cells. *Toxicon*, 45: 627–632
- Board P.G., Menon D. 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830: 3267–3288

- Borisovskaya A., Pascualy M., Borson S. 2014. Cognitive and Neuropsychiatric Impairments in Alzheimer's Disease: Current Treatment Strategies. *Current Psychiatry Reports*, 16, 9: 6-7
- Bourguet-Kondracki M.L., Martin M.T., Debitus C. 1994. 12-epi-Heteronemin: New Sesterterpene From The Marine Sponge *Hyrtus erecta*. *Tetrahedron Letters*, 35: 109–110
- Bourguet-Kondracki M.L., Martin M.T., Guyot M. 1996. A new β -carboline alkaloid isolated from the marine sponge *Hyrtios erecta*. *Tetrahedron Letters*, 37: 3457–3460
- Bracco L., Gallato R., Grigoletto F., Lippi A., Bino G., Lazzaro M.P., Carella F., Piccolo T., Giometto B., Amaducci L. 1984. Factors affecting course and Survival in Alzheimer's disease. *Archives of neurology*, 51: 1213-1219
- Buchanan M.S., Edser A., King G., Whitmore J., Quinn R.J. 2001. Cheilanthane sesterterpenes, protein kinase inhibitors, from a marine sponge of the genus *Ircinia*. *Journal of Natural Products*, 64: 300–303
- Cafieri F., Carnuccio R., Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O., Vallefuoco T. 1997. Anti-histaminic activity of bromopyrrole alkaloids isolated from Caribbean *Agelas* sponges. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, 7: 2283–2288
- Cafieri F., Fattorusso E., Mangoni A., Tagliatela-Scafati O. 1996a. Clathramides, unique bromopyrrole alkaloids from the Caribbean sponge *Agelas clathrodes*. *Tetrahedron*, 52: 13713–13720
- Cafieri F., Fattorusso E., Mangoni A., Tagliatela-Scafati O. 1996b. Dispacamides, anti-histamine alkaloids from Caribbean *Agelas* sponges. *Tetrahedron Letters*, 37: 3587–3590
- Cafieri F., Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O. 1998. Novel bromopyrrole alkaloids from the Sponge *agelas dispar*. *Journal of Natural Products*, 61: 122–125
- Cao S., Foster C., Lazo J.S., Kingston D.G.I. 2005. Sesterterpenoids and an alkaloid from a *Thorectandra* sp. as inhibitors of the phosphatase Cdc25B. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, 13: 5094–5098
- Cao S., Gao Z., Thomas S.J., Hecht S.M., Lazo J.S. 2004. Marine Sesquiterpenoids that Inhibit the Lyase Activity of DNA Polymerase β . *Journal of Natural Products*, 61: 1716–1718
- Carballeira N.M., Reyes E.D., Shalabi F. 1993. Identification of Novel iso Anteiso Nonacosadienoic Acids from the Phospholipids of the Sponges *Chondrosia remiformis* and *Myrmekioderma styx*. *Journal of Natural Products*, 56: 1850–1855
- Carballeira, NM, Vazquez, A, Silva, C. 1987. 4(-Methyl-24-Ethyl-5 -Cholest-8(9)-en-3 -ol, a New Sterol from the Marine Sponge *Agelas Dispar*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 4: 421–424

- Charan R.D., McKee T.C., Boyd M.R. 2001. Thorectandrols A and B, new cytotoxic sesterterpenes from the marine sponge Thorectandra species. *Journal of Natural Products*, 64: 661–663
- Charan R.D., McKee T.C., Boyd M.R. 2002a. Thorectandrols C, D, and E, new sesterterpenes from the marine sponge Thorectandra sp. *Journal of Natural Products*, 65: 492–495
- Charan R.D., McKee T.C., Gustafson K.R., Pannell L.K., Boyd M.R. 2002b. Thorectandramine, a novel β -carboline alkaloid from the marine sponge Thorectandra sp. *Tetrahedron Letters*, 43: 5201–5204
- Ciminiello P. 1999. Chemistry of Verongida sponges. 9. Secondary metabolite composition of the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *Journal of Natural Products*, 62: 590–593
- Costantino V., Fattorusso E., Imperatore C., Mangoni A. 2004. Glycolipids from Sponges. 13. Clarhamnoside, the First Rhamnosylated β -Galactosylceramide from *Agelas clathrodes*. Improving Spectral Strategies for Glycoconjugate Structure Determination. *Journal of Organic Chemistry*, 69: 1174–1179
- Costantino V., Fattorusso E., Imperatore C., Mangoni A. 2006. Glycolipids from sponges. Part 17.1 Clathrosides and isoclathrosides, unique glycolipids from the Caribbean sponge *Agelas clathrodes*. *Journal of Natural Products*, 69: 73–78
- Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A. 1993. Isolation of Five-Membered Cyclitol Glycolipids, Crasserides: Unique Glycerides from the Sponge *Pseudoceratina crassa*. *Journal of Organic Chemistry*, 58: 186–191
- Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Di Rosa M., Ianaro A., Maffia P. 1996. Glycolipids from sponges. IV.1 immunomodulating glycosyl ceramides from the marine sponge *Agelas dispar*. *Tetrahedron*, 52: 1573–1578
- Csermely P., Ágoston V., Pongor S. 2005. The efficiency of multi-target drugs the network approach might help drug design. *Trends in Pharmacological Sciences*, 182: 178–182
- Cullen E., Devlin J.P. 1975. Agelasine: A Novel Quaternary PMethyladenine from the Sponge *Agelas dispar*. *Canadian Journal of Chemistry*, 53: 6–7
- Dai J., Parrish S.M., Yoshida W.Y., Yip M.L.R., Turkson J., Kelly M., Williams P. 2016. Bromotyrosine-derived metabolites from an Indonesian marine sponge in the family *Aplysinellidae* (Order Verongiida). *Bioorganic Medical Chemistry Letter*, 26: 499–504
- Day B.J. 2004. Catalytic antioxidants: A radical approach to new therapeutics. *Drug Discovery Today*, 9: 557–566
- Deponte M. 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 3217–3266

- Descarries L. 1998. The hypothesis of an ambient level of acetylcholine in the central nervous system. *Journal of Physiology*, 92: 215–220
- Dolinšek T. 2007. Biološko aktivne snovi v vodnih ekstraktih nekaterih morskih spužev (Porifera). Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 15 str.
- Duthey B. 2013. Alzheimer Disease and other Dementias. WHO, Update on 2004 Background Paper: 4-50
- Elhady S., El-Halawany A. 2016. A New Bioactive Metabolite Isolated from the Red Sea Marine Sponge *Hirtios erectus*. *Molecules*, 3: 1–9
- Emura C., Higuchi R., Miyamoto T. 2006. Irciniasulfonic acid B, a novel taurine conjugated fatty acid derivative from a Japanese marine sponge, *Ircinia* sp. *Tetrahedron*, 62: 5682–5685
- Epifanio R.D., Gabriel R., Martins D.L., Muricy G. 1999. The sesterterpene variabilin as a fish-predation deterrent in the western Atlantic sponge *Ircinia strobilina*. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 2247–2254
- Feng Y., Carroll A.R., Pass D.M., Archbold J.K., Avery V.M., Quinn R.J. 2008. Polydiscamides B-D from a marine sponge *Ircinia* sp. as potent human sensory neuron-specific G protein coupled receptor agonists. *Journal of Natural Products*, 71: 8–11
- Feng Y., Wang X. 2012. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi: 10.1155/2012/472932: 17 str.
- Förstl H., Kurz A. 1999. Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archive of Psychiatry Vlinical Neuroscience*, 249: 288–290
- Giacobini E. 2004. Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*, 50: 433–440
- Globocan 2012. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. World Health Organization, International agency for research on cancer http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (maj 2016)
- Grassia A., Bruno I., Debitus C., Marzocco S., Pinto A., Gomez-Paloma L., Riccio R. 2001. Spongidepsin, a new cytotoxic macrolide from *Spongia* sp. *Tetrahedron*, 57: 6257–6260
- Guan Z., Zeng L. 2010. A new ceramide from a new species of spongia sponge. *Chemistry of Natural Compounds*, 46: 287–288
- Gunasekera S.P., Cross S.S. 1992. Fistularin 3 and 11-ketofistularin 3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*. *Journal of Natural Products*, 55: 509–512

- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. 1974. Glutathione S-Transferases The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of biological chemistry*, 249: 7130–7139
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144: 646–674
- Hartzell C.H., Kuffler S.W., Yoshikami D. 1975. Post-synaptic potentiation: interaction between quanta of acetylcholine at the skeletal neuromuscular synapse. *Journal of Physiology*, 251: 427–463
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. 2004. Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 51–88
- Hu G-P., Yuan J., Sun L., She Z-G., Wu J-H., Lan X-J., Zhu X., Lin Y-C., Chen. S-P. 2011. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, 9: 514–525
- Inestrosa, NC, Roberts, WL, Marshall, TL, Rosenberry, TL. 1987. Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 4441–4444
- Isbrucker R.A., Cummins J., Pomponi S.A., Longley R.E., Wright A.E. 2003. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochemical Pharmacology*, 66: 75–82
- Ishikawa T., Li Z.S., Lu Y.P., Rea P.A. 1997. The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: Structure, function, and gene expression. *Bioscience Reports*, 17: 189–207
- Iwasaki T., Yoneda M., Nakajima A., Terauchi Y. 2007. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Internal medicine*, 46: 1633–1639
- Keifer P., Schwartz R.E., Koker M.E.S., Hughes R.G., Rittschof D., Rinehart K.L. 1991. Bioactive bromopyrrole metabolites from the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *Journal of Organic Chemistry*, 56: 2965–2975
- Kelly S.R., Jensen P.R., Henkel T.P., Fenical W., Pawlik J.R. 2003. Effects of Caribbean sponge extracts on bacterial attachment. *Aquatic Microbial Ecology*, 31: 175–182
- Kirsch G., Köng G.M., Wright A.D., Kaminsky R. 2000. A new bioactive sesterterpene and antiplasmodial alkaloids from the marine sponge *Hyrtios cf. erecta*. *Journal of Natural Products*, 63: 825–829
- Kuroda, H. 1992. Absolute configuration of C-4 of the Manoalide Family, Biologically active sesterterpenes from the Marine sponge *Hyrtus erecta*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42: 265–270

- Laborde E. 2010. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell death and differentiation*, 17: 1373–1380
- Lane R.M., Kivipelto M., Greig N.H. 2004. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clinical Neuropharmacology*, 27: 141–149
- Leal M.C., Puga J., Sergdio J., Gomes N.C.M., Calado R. 2012. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades - where and what are we bioprospecting?. *PLoS One*, 7, 1: e30580, doi:10.1371/journal.pone.0030580: 8 str.
- Li B., Stribley J.A., Ticu A., Xie W., Schopfer L.M., Hammond P., Brimijoin S., Hinrichs S.H., Lockridge O. 2000. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry*, 75: 1320–1331
- Likar A. 2007. Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih morskisih spužev (Porifera). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 5-15 str.
- Magno S., Demospongiae A., Carter A. 2001. Archerine, a Novel Anti-Histaminic Bromotyrosine-Derived Compound from the Caribbean Marine Sponge *Aplysina archeri*. *European journal of organic chemistry*, 2001: 55-60
- Mannervik B., Board P.G., Hayes J.D., Listowsky I., Pearson W.R. 2005. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401: 1–8
- Marinšek B. 2010. Biološka aktivnost v organskih ekstraktih nekaterih tropskih morskih spužev (*Porifera*, *Demospongia*). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 15-30 str.
- Martínez A., Duque C., Fujimoto Y. 1997. Novel fatty acid esters of (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilin from the marine sponge *Ircinia felix*. *Lipids*, 32: 565–569
- Mathew N., Kalyanasundaram M., Balaraman K. 2006. Glutathione S -transferase (GST) inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16: 431–444
- Mebs D., Weiler I., Heinke H.F. 1985. Bioactive proteins from marine sponges: Screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. *Toxicon*, 23: 955–962
- Miarons P.B., Fresno M. 2000. Lectins from tropical sponges. Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 29283–29289
- Minale L., Vitty-agortville R., Cedex, S. 1995. Bioactive prenylhydroquinone sulfates and a novel C31 furanoterpene alcohol sulfate from marine sponge *Ircinia sp.* *Journal of Natural Products*, 58: 1444–1449

- Montaser R., Luesch H. 2012. Marine natural products: A new wave of drugs?. *Future Medicinal Chemistry*, 3: 1475–1489
- Morales J., Rodriguez A.D. 1992. (-)-agelasidine C and (-)-agelasidine D, two new hypotaurocyamine diterpenoids from the Caribbean sea sponge *Agelas clathrodes*. *Journal of Natural Products*, 55: 389–394
- Morales J., Rodriguez A.D. 1991. The structure of clathrocin, a novel alkaloid isolated from the Caribbean sea sponge *Agelas clathrodes*. *Journal of Natural Products*, 54: 629–631
- Mori D., Kimura Y., Kitamura S., Sakagami Y., Yoshioka Y., Shintani T., Okamoto T., Ojika M. 2007. Spongolactams, farnesyl transferase inhibitors from a marine sponge: Isolation through an LC/MS-guided assay, structures, and semisyntheses. *Journal of Organic Chemistry*, 72: 7190–7198
- Murakami Y., Takei M., Shindo K., Kitazume C., Tanaka J., Higa T., Fukamachi H. 2002. Cyclotheonamide E4 and E5, new potent tryptase inhibitors from an *Ircinia* species of sponge. *Journal of Natural Products*, 65: 259–261
- Nèeman I., Fishelson L., Kashman Y. 1975. Isolation of a new toxin from the sponge *Latrunculia magnifica* in the Gulf of Aquaba (Red Sea). *Marine Biology*, 30: 293–296
- Nunez C.V., De Almeida E.V.R., Granato A.C., Marques S.O., Santos K.O., Pereira F.R., Macedo M.L., Ferreira A.G., Hajdu E., Pinheiro U.S., Muricy G., Peixinho S., Freeman C.J., Gleason D.F., Berlinck R. 2008. Chemical variability within the marine sponge *Aplysina fulva*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 283–296
- Orhan I.E. 2013. Nature: a substantial source of auspicious substances with acetylcholinesterase inhibitory action. *Current neuropharmacology*, 11: 379–87
- Ovechkina Y.Y., Pettit R.K., Cichacz Z.A., Pettit G.R., Oakley B.R. 1999. Unusual antimicrotubule activity of the antifungal agent spongistatin 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 1993–1999
- Parrish S.M., Yoshida W.Y., Kondratyuk T.P., Park E.J., Pezzuto J.M., Kelly M, Williams P.G. 2014. Spongiapyridine and related spongians isolated from an Indonesian *Spongia* sp. *Journal of Natural Products*, 77: 1644–1649
- Peng J., Avery M.A., Hamann M.T. 2003. Cyanthiwigin AC and AD, Two Novel Diterpene Skeletons from the Jamaican Sponge *Myrmekioderma styx*. *Organic Letters*, 5: 4575–4578
- Peng J., Franzblau S.G., Zhang F., Hamann M.T. 2002a. Novel sesquiterpenes and a lactone from the Jamaican sponge *Myrmekioderma styx*. *Tetrahedron Letters*, 43: 9699–9702

- Peng J., Kasanah N., Stanley C.E., Chadwick J., Fronczek F.R., Hamann M.T. 2006. Microbial metabolism studies of cyanthiwigin B and synergetic antibiotic effects. *Journal of Natural Products*, 69: 727–730
- Peng J., Walsh K., Weedman V., Bergthold J.D., Lynch J., Lieu K.L., Braude I.A., Kelly M., Hamann M.T. 2002b. The new bioactive diterpenes cyanthiwiggins E-AA from the Jamaican sponge *Myrmekioderma styx*. *Tetrahedron*, 58: 7809–7819
- Perdih A., Pečar S. 2006. Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo, *Farmacevtski Vestnik*, 57: 24–29.
- Perl D.P. 2010. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai Journal of Medicine*. 77(1): 32–42
- Pettit G.R., Chicacz Z.A., Gao F., Herald C.L., Boyd M.R., Schmidt J.M., Hooper J.N.A. 1993. Antineoplastic agents. 257. Isolation and structure of spongistatin 1. *Journal of organic chemistry*, 58: 1302–1304
- Pettit G.R., Tan R., Cichacz Z.A. 2011. The Isolation and Structure of Sesterstatin 6 from the Indian Ocean Sponge *Hyrtios erecta*. *Journal of Natural Products*, 4: 1253–1255
- Pettit G.R., Tan R., Melody N., Cichacz Z.A., Herald D.L., Michael S., Pettit R.K., Chapuis J. 1998a. Antineoplastic agents 397: isolation and structure of sesterstatins 4 and 5 from *Hyrtios erecta*. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 8: 2093–2098
- Pettit R.K., McAllister S.C., Pettit G.R., Herald C.L., Johnson J.M., Cichacz Z.A. 1998b. A broad-spectrum antifungal from the marine sponge *Hyrtios erecta*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9: 147–152
- Pham A.T., Carney J.R., Yoshida W.Y., Scheuer P.J. 1992. Haumanamide, a nitrogenous spongian derivative from a *Spongia sp.* *Tetrahedron Letters*, 33: 1147–1148
- Pohanka M. 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Paper*, 155: 219–230
- Prado M.P., Torres Y.R., Berlinck R.G.S., Desider C., Sanchez M.A., Craveiro M.V., Hajdu E., Da Rocha R.M., Machado-Santelli G.M. 2004. Effects of marine organisms extracts on microtubule integrity and cell cycle progression in cultured cells. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313: 125–137
- Proksch P. 1994. Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon*, 32: 639–655
- Qian P.Y., Dobretsov 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

- Quinn D.M. 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87: 955–979
- Richelle-Maurera E., De Kluijver M.J., Feio S., Gaudêncio S., Gaspar H., Gomez R., Tavares R., Van De Vyver G., Van Soest R. 2003. Localization and ecological significance of oroidin and sceptrin in the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 1073–1091
- Rodríguez D., Piña I.C. 1993. The structures of aplysinamisines I, II, and III; new bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *Journal of Natural Products*, 56: 907–914
- Rogers E.W., Molinski T.F. 2008. Highly Polar Spiro-Isoxazolines from the Sponge *Aplysina fulva*. *Journal of Natural Products*, 148: 825–832
- Rogers S.D., Paul V.J. 1991. Chemical defenses of three Glossodoris nudibranchs and their dietary *Hyrtios sponges*. *Marine Ecology Progress Series*, 77: 221–232
- Rosa De S., Giulio D., Crispino A., Iodice C., Tommonaro G. 1997. Palinurin and Fasciculatin Sulfates from Two Thyrreanean Sponges of the Genus *Ircinia*. *Natural Products Letters*, 10: 7–12
- Rothberg I., Shubiak P. 1975. The structure of some antibiotics from the sponge *Ircinia strobilina*. *Tetrahedron Letters*, 16: 769–772
- Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S. 1997. Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 433–441
- Sau A., Pellizzari Tregno F., Valentino F., Federici G., Caccuri A.M. 2010. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500: 116–122
- Schmitz F.I., Gopichand Y. 1978. (7e, 135, 152)-14,16-dibromo-7,13,15-hexadecatien-5-ynoic acid. A novel dibromo acetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia muta*. *Tetrahedron*, 39: 3637–3640
- Segraves N.L., Crews P. 2005. Investigation of brominated tryptophan alkaloids from two thorectidae sponges: *Thorectandra* and *Smenospongia*. *Journal of Natural Products*, 68: 1484–1488
- Sennett S.H., Pomponi S.A., Wright A.E. 1992. Diterpene metabolites from two chemotypes of the marine sponge *Myrmekioderma styx*. *Journal of Natural Products*, 55: 1421–1429
- Sepečić K., Kauferstein S., Mebs D., Turk T. 2010. Biological activities of aqueous and organic extracts from tropical marine sponges. *Marine Drugs*, 8: 1550–1566

- Shen X., Perry T.L., Dunbar C.D., Kelly-Borges M., Hamann M.T. 1998. Debromosceptrin, an alkaloid from the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *Journal of Natural Products*, 61: 1302–1303
- Singh M., Kaur M., Kukreja H., Chugh R., Silakari O., Singh D. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70: 165–188
- Singh S. 2015. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75: 1–15
- Skropeta D., Pastro N., Zivanovic A. 2011. Kinase inhibitors from marine sponges. *Marine Drugs*, 9: 2131–2154
- Su J.H., Tseng S.W., Lu M.C., Liu L.L., Chou Y., Sung P.J. 2011. Cytotoxic C 21 and C 22 terpenoid-derived metabolites from the sponge *Ircinia sp.* *Journal of Natural Products*, 74: 2005–2009
- Sussman J.L., Harel M., Frolov F., Oefner C., Goldmant A., Tokar L., Silman I. 1991. Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science*, 253: 872–879
- Stojan R., Stojan Ž., Stojan J. 2008. Holin-esteraze: struktura, delovanje ter inhibicija z naravnimi in sintetičnimi strupi. *Ljubljana, Medicinski razgledi*. 47: 293–307
- Takahashi Y., Kubota T., Fromont J., Kobayashi J. 2007. Metachromins L-Q, new sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from sponge *Spongia sp.* *Tetrahedron*, 63: 8770–8773
- Takahashi Y., Kubota T., Kobayashi J. 2009. Nakijiquinones E and F, new dimeric sesquiterpenoid quinones from marine sponge. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 2185–2188
- Taylor P., Reiner E., Kovarik Z., Radić Z. 2007. Application of recombinant DNA methods for production of cholinesterases as organophosphate antidotes and detectors. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 58: 339–45
- Tew K.D., Townsend D.M. 2012. Glutathione-S-Transferases As Determinants of Cell Survival and Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17: 1728–1737
- Townsend D.M., Tew K.D. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22: 7369–7375
- Trampuž M. 2014. Alkaloidi iz spužev rodu *Agelas*. *Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Spatula*, 36: 4–7

- Tripathi A., Srivastava U.C. 2010. Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences*, 15: 106–111
- Tsuchiya N., Sato A., Hata T., Sato N., Sasagawa K., Kobayashi T. 1998. Cytotoxic scalarane sesterterpenes from a sponge, *Hyrtios erecta*. *Journal of Natural Products*, 61: 468–473
- Vassas A., Bourdy G., Paillard J.J., Lavayre J., Pais M., Quirion J.C., Debitus C. 1996. Naturally occurring somatostatin and vasoactive intestinal peptide inhibitors - Isolation of alkaloids from 2 marine sponges. *Planta medicina*, 62: 28–30
- Youssef D.T.A., Shaala L.A., Emara S. 2005. Antimycobacterial scalarane-based sesterterpenes from the Red Sea sponge *Hyrtios erecta*. *Journal of Natural Products*, 68: 1782–1784
- Yu Z.G., Bi K.S., Guo Y.W. 2005. Hyrtiosins A-E, five new scalarane sesterterpenes from the South China Sea sponge *Hyrtios erecta*. *Helvetica Chimica Acta*, 88: 1004–1009
- Zimmermann G.R., Lehir J., Keith C.T. 2007. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discovery Today*, 12: 34–42

ZAHVALA

Mentorici **prof. dr. Kristini Sepčič**, somentorici **doc. dr. Andreji Ramšak** in recenzentu **prof. dr. Tomu Turku** se zahvaljujem za vse pripombe pri izdelavi, za temeljit ter hiter pregled diplomskega dela.

Hvala predsednici komisije za zagovor **prof. dr. Aniti Jemec**, ki si je na zame zelo pomemben dan utrgala čas.

Hvala **staršem, bratom in prijateljem** za zaupanje, da bom nekega dne le končala začeto delo.

Največja zahvala gre **Marku Pezdircu**, za vse nasvete in potrpežljivost. Brez tebe bi bilo vse veliko veliko težje.

PRILOGE

Priloga A: Pregled objav

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Agelas clathrodes</i>	Klatramid A Klatramid B	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol in kloroform	Protiglivna aktivnost	(Cafieri in sod., 1996a)
	klathrosidi A–C izoklathrosidi A–C	glikolipidi	Organska faza	metanol	-	(Costantino in sod., 2006)
	Clarhamnoside	glikosfingolipid	Organska faza	metanol	-	(Costantino in sod., 2004)
	Skeptrin Oroidin Algelongin Klatramidi Dispakamidi A-C Dispakamidi B-D	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Antihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	(Cafieri in sod., 1997)
	Klatroдин	Alkaloid	Organska faza	metanol	Blokira aktivnost holinerгіčnih receptorjev na izolirani skeletni mišici žabe	(Morales in Rodriguez, 1991)
	Dispakamid 1	Bromopirolovi alkaloid	Organska faza	metanol	Selektivna antihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	(Cafieri in sod., 1996b)
	(-)agelazidin D (-)agelazidin A (-)agelazidin C	Derivati diterpena	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost proti vrstam: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Echerichia coli</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	(Morales in Rodriguez, 1992)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Agelas conifer</i>	Skeptrin	Dimerni bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Kemijska obramba proti plenilcem	(Assmann in sod., 2000)
	Bromoskeptrin					
	Dibromoskeptrin					
	Ageliferin					
	Bromoageliferin					
	Dibromoageliferin					
	Bromoageliferin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza		Zmanjšan nivo napetostno odvisnega Ca ²⁺ v celičnih linijah P12	(Bickmeyer, 2005)
	Dibromoageliferin					
	Dispakamid 1	Bromopirolovi alkaloid	Organska faza	metanol	Selektivna antihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	(Cafieri in sod., 1996b)
	4,5-dibromopirrol-2-karboksilna kislina 4-bromopirrol-2-karboksilna kislina Pirrol-2-karboksilna kislina Himenidin Skeptrin Oroidin Dibromoskeptrin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	diklorometan/ metanol	Vpliva na homeostazo Ca ²⁺ v celici Obramba pred plenilskimi ribami	(Bickmeyer, 2005)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Agelas conifera</i>	Skeptrin Oroidin Algelongin Klatramidi Dispakamid A-C Dispakamidi B-D	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Antihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	(Cafieri in sod., 1997)
	Skeptrin diacetat Bromopiroli (1,3-8)	Bromopirolovi metaboliti	Organska faza	metanol / toluen	Protivirusna aktivnost Protimikrobna aktivnost	(Keifer in sod., 1991)
	Oroidin Skeptrin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Vpliv na vedenje korale <i>Madracis mirabilis</i> , zapiranje in vpotev polipov Obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Stegastis partitus</i> Protibakterijska aktivnost Protiglivna aktivnost	(Richelle-Maurera in sod., 2003)
	Dibromoskeptrin Monobromoskeptrin Skeptrin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	etanol	Inhibicija rasti bakterije <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Shen in sod., 1998)
	Aminozooanamonin Piridinbetain A Piridinbetain B	Betain alkaloidi	Organska faza	metanol	Zmerna protibakterijska aktivnost	(Cafieri in sod., 1998)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Agelas dispar</i>	Longamid B Klatramid C Klatramid D Keramadin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Protibakterijska aktivnost proti Gram + bakterijam (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>) Protiglivna aktivnost proti plesni <i>Aspergillus niger</i>	(Cafieri in sod., 1998)
	3-glikozilkeramid	Glikosfingolipid	Organska faza	metanol	Imunostimulatorna aktivnost za limfocite	(Costantino in sod., 1996)
	Agelazin	Derivat 9-metil-adenina	Organska faza	etanol	Širok spekter farmakoloških aktivnosti, ki se navezujejo na saponinom podobno strukturo	(Cullen in Devlin, 1975)
	Arherin	Derivat bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1)	Antihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	(Magno in sod., 2001)
<i>Aplysina archeri</i>	Fistularin 3 11-ketofistularin 3	Derivata bromotirozina	Organska faza	metanol/toluen (3:1)	Inhibicija rasti virusa mačje levkemije	(Gunasekera in Cross, 1992)
		Lektini	Vodna faza	0.9% NaCl _{aq} z dodanimi 1 mM CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂ in 0.02% NaN ₃	Hemaglutinacija	(Miarons in Fresno, 2000)
		Derivat bromotirozina	Organska faza	metanol /toluen	Citotoksičnost Vpliv na celične delitve Vpliv na sintezo beljakovin pri sesalcih	(Ciminiello, 1999)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Aplysina cauliformis</i>	Aplizinamizin	Derivat bromotirozina	Organska faza	metanol / kloroform	Citotoksičnost Protimikrobna aktivnost	(Rodríguez in Piña, 1993)
		Lektini	Vodna faza	0.9% NaCl _{aq} z dodanimi 1 mM CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂ in 0.02% NaN ₃	Hemaglutinacija	(Miarons in Fresno, 2000)
<i>Aplysina fulva</i>	Aeroplizinin-1 Dibromocikloheksdienon	Sekundarni metaboliti	Organska faza	metanol	Inhibicija bakterijske adhezije	(Kelly in sod., 2003)
	araplysillin N9-sulfamate N-[5S, 10R)-7,9-dibromo-10-hidroksi-8-methoksi-1-oxa-2-azaspiro[4.5]deka-2,6,8-trien-3-carboxy]-4-Aminobutanojaka kislina	brominirani spiroizoksazolini,	Organska faza	metanol	?	(Rogers in Molinski, 2008)
	Aplizinafulvin	Metabolit dibromotirozina	Organska faza	metanol / etanol		(Nunez in sod., 2008)
<i>Aplysina lacunosa</i>	11-oksoaerotionin	Derivat bromotirozina	Organska faza	metanol / kloroform (1:1)	Citotoksičnost Protitumorska aktivnost	(Acosta in Rodriguez, 1992)
<i>Callyspongia plicifera</i>			Organska faza	diklorometan	Inhibicija bakterijske rasti Toksičnost za ličinke mnogoščetinca vrste <i>Hydroides elegans</i> , raka vitičnjaka vrste <i>Balanus amphitrite</i> Protivegetativna aktivnost	(Qian in sod., 2006)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Hyrtios erecta</i>	Sesterstatin 7 16-epi-skalarolbutenoid 25-dehidroksi-12-epi-deacetyliskalarin 3-acetylsesterstatin 1 21-acetoksideoksiskalarin	Sesterterpeni	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost proti bakteriji <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Youssef in sod., 2005)
		Alkaloid	Organska faza	metanol	Imunosupresivna aktivnost v B limfocitni reakciji	(Bourguet-Kondracki in sod., 1996)
	Hirtomanzamin	Sesterterpeni	Organska faza	Me ₂ CO	Obramba pred plenilci Ihtiotoksičnost Protivnetna aktivnost Citotoksičnost Inhibicija trombocitne agregacije	(Yu in sod., 2005)
	Hirtiozinin A Hirtiozinin B Hirtiozinin C Hirtiozinin D Hirtiozinin E	Sesterterpeni in alkaloidi	Organska faza	diklorometan	<i>Protimikrobna aktivnost proti vrstam: Plasmodium falciparum, Tryptosoma brucei, virus Hepatitis A, Escherichia coli, Bacillus megaterium, Ustilago violaceae, Eurotium repens, Mycotipha microspora, virus HIV-1-RT</i>	(Kirsch in sod., 2000)
	Dva sesterterpenska laktona Izodehidrolufarielolid Homofaskaplizin A	Sesterterpen	Organska faza	metanol	Citotoksičnost proti rakastim celičnim linijam	(Pettit idr., 2011)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Hyrtios erecta</i>	Faskaplizin					
	Sesterstatin 1 – 3	Makrociklični laktoni	Organska faza	metanol	Citotoksičnost proti rakastim celičnim linijam	(Pettit in sod., 1998a)
	Sesterstatin 4 Sesterstatin 5	Sesterterpen	Organska faza	metanol	Citotoksičnost proti rakastim celičnim linijam	(Pettit idr., 2011)
	Sesterstatin 6	Sesterterpeni	Organska faza	metanol	Protitumorska aktivnost	(Tsuchiya in sod., 1998)
	Spojine 1 – 4	Sesterterpenski derivati	Organska faza	metanol	Citotoksičnost proti celični liniji mišje levkemije Citotoksičnost proti človeškim celičnim linijam pljučnega in črevesnega raka	Youssef in sod., 2002
	Salmahirtizol A 3-acetil sesterstatin 19-acetilsesterstatin Salmahirtizol B Hirtiozal Skalaroid Salmahirtizol C	Seskviterpen in steroid	Organska faza	metanol-diklorometan (1:1)	Protibakterijska aktivnost proti vrsti <i>Escherichia coli</i>	Youssef in sod., 2004
	Esterstatin 16-epi-skalarolbutenolid-25-dehidroksi-12-epi-deacetilsesterstatin	Sesterterpeni	Organska faza	diklorometan	Inhibicija delitve jajčne celice pri morskem ježku Protivnetno delovanje na mišjem ušesu	(Bescansa, 1986)
	Heteronemin Hertionemin acetat 12-epi-hertionemin acetat 12-deacetil-12-epi-skalaradial 12-epi-cis-24,25-dimetiksiskalaran 12-deacetil-trans-24,25-dimetoksiskalaran	Sesterterpeni	Organska faza	metanol	Inhibicija rasti mišjih rakastih celičnih linij	(Elhady in El-Halawany, 2016)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Hyrtios erecta</i>	Hirtial					
	12-O-deacetyl-19-deoksiskalarin	Sesterterpeni	Organska faza	aceton	Protitumorska aktivnost Inhibicija mišje DNA topoizomeraze I Inhibicija goveje timusne DNA topoizomeraze II Citotoksičnost	(Kuroda, 1992)
	Monoalid 25-acetali (1a,1b)	Sesterterpeni	Organska faza	aceton / metanol (1:1)	Obramba pred plenilci	(Rogers in Paul, 1991)
	Skalaradial Heteronemin Skalarin	Makrociklični lakton	Organska faza	metanol	Protiglivna aktivnost proti vrstam: <i>Candida albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	(Pettit in sod., 1998b)
	Spongistatin 1	Makrociklični lakton	Organska faza	metanol	Antimikrotubularna aktivnost pri sesalčjih celičnih linijah Antimikrotubularna aktivnost pri plesni <i>Aspergillus nidulans</i> Protiglivna aktivnost	(Ovechkina in sod., 1999)
	Spongistatin 1	Sesterterpeni	Organska faza	metanol	Inhibitor fosfolipaze A2	(Bourguet-Kondracki in sod., 1994)
	12-epi-heteronemin Heteronemin 2 12-epi-heteronemin acetat	Norsesterterpen	Organska faza	diklorometan	Protivnetna aktivnost	Crews in sod., 1985
	Monoalin	Proteini	Vodna faza	destilirana voda	Zmerna toksičnost za miši, katerim je bil vodni ekstrakt injiciran v telo	(Mebs in sod., 1985)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	Heteronemin					
	quinolone 7 6-bromo-29-demetilaplinopsin (Z), 5,6-dibromo-3-(2-metilaminoetil)indol 5,6-dibromo-3-(2-aminoetil)indol aplinopsin-tip 1 aplinopsin-type 2	Indolni alkaloidi	Organska faza	aceton	selektivni inhibitorji sintaze dušikovega oksida	(Aoki in sod., 2001)
	penta-, heksa-, in heptaprenilhidrokinon 4-sulfati Hidroksiliran 2-heptaprenilhidrokinon Kromenoli Ircinol sulfat	Heilantanski sesterterpenoidi	Organska faza	diklorometan	Inhibicija MSK1 kinaze Inhibicija MAPKAPK-2 kinaze	(Buchanan in sod., 2001)
<i>Ircinia sp.</i>	25-hidroksi-13(24),15,15-heilantatrien-19,25-olid 13,16-epoksi-25-hidroksi-17-heilanten-19,25-olid 25-hidroksi-13(24),17-heilantadien-16,19-olid	Sesterterpeni	Organska faza	Me ₂ CO	Letalnost za solinske rakce vrste <i>Artemia salina</i> Letalnost za ribe vrste <i>Gambusia affinis</i>	(De Rosa in sod., 1997)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	16,25-dihidroksi-13(24),17-heilantadien-19,25-olid					
	Palinurin Fascikulatin sulfati	Tioesterska spojina	Organska faza	metanol	Zmerna citotoksična aktivnost proti mišjim levkemičnim celičnim linijam	Kuramoto in sod., 2002
		Poliprenil hidrokinoni prenilirani benzopiran sulfati	Organska faza	kloroform	Inhibicija tirozinske proteinske kinaze in HIV integraznega encima	(Minale in sod.)
<i>Ircinia sp.</i>	cikloteonamid E4 cikloteonamid E5	Amin kisline	Organska faza	Metanol/kloroform	Triptazni inhibitorji cikloteonamid E4 je potencialno terapevtsko sredstvo pri zdravljenju alergijskih bolezni (vključno astme)	(Murakami in sod., 2002)
	Irciniasulfatna kislina B Irciniasulfatna kislina	Derivati maslobnih kislin	Organska faza	etanol / butanol	moduliranje MDR v rakavih celicah sesalcev	(Emura in sod., 2006)
	Tedanolid C	makrolid	Organska faza	metanol	močno citotoksičen	(Rogers in Molinski, 2008)
	Polidiskamid B Polidiskamid C Polidiskamid D	Membranski proteini vezani na G protein	Organska faza	Diklorometan in metanol	Močan agonist SNSR človeških nevrnskih receptorjev sklopljenih z G-proteinom, sodeluje pri uravnavanju bolečine	(Feng in sod., 2008)
	ircinialaktam A, 8-hidroksircinialaktam A 8- hidroksircinialaktam B, ircinialaktam C,	Sesterterpeni	Organska faza	etanol / metanol	Modulatorji GlyR kloridnih kanalčkov občutljivih na glicin Potencialna nevrnska farmakološka sredstva	(Balansa in sod., 2010)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	ent-ircinialaktam C ircinialaktam D					
	ircinolin A 15-acetylirciformonin B 10-acetylirciformonin B irciformonin B irciformonin F	Terpenoid	Organska faza	Etil acetat	Citotoksični proti K562, DLD-1 HepG2 in Hep3B tumorskim celičnim linijam	(Su in sod., 2011)
<i>Ircinia felix</i>	(8Z,13Z,20Z)-strobilin (7Z,13Z,20Z)-feliksinin	Furanosesterpen	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	(Martínez in sod., 1997)
<i>Ircinia strobilina</i>	(7E,12E,18R,20Z)-variabilin	Sesterterpen	Organska faza	metanol / diklorometan (3:2)	Obramba pred plenilci	(Epifanio in sod., 1999)
<i>Ircinia strobilina</i>	Variabilin	Sesterterpen	Organska faza	eter	Protimikrobna aktivnost proti bakterijam <i>Staphylococcus aureus</i> in <i>Bacillus subtilis</i>	(Rothberg in Shubiak, 1975)
	(8Z,13Z,20Z)-strobilin (7Z,13Z,20Z)-feliksinin	Proteini	Vodna faza	destilirana voda	Hemaglutinacija Zmerna toksičnost za miši, ki so jim injicirali vodni ekstrakt	(Mebs in sod., 1985)
<i>Myrmerioderma styx</i>	Vodni ekstrakt	Oksigenirani diterpeni	Organska faza	metanol / toluen (3:1)	Toksičnost za solinske rakce vrste <i>Artemia salina</i>	(Albrizio in sod., 1992)
	Spojine 1-4	Maščobne kisline	Organska faza	kloroform / metanol (1:1)	Vsebnost maščobnih kislin, ki so značilne za bakterije	(Carralleira in sod., 1993)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	27-metil-5,9-oktakozenojska kislina 26-metil-5,9-oktakozenojska kislina 15-metil-5,9-heksadekanojska kislina	Diterpeni	Organska faza	metanol	Protivirusna aktivnost Protimikrobna aktivnost Citotoksičnost proti rakastim celičnim linijam	(Peng in sod., 2002b)
	Ciantiviginini E-AA	Seskviterpeni	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	(Peng in sod., 2002a)
	Stikson A Stikson B	Seskviterpen	Organska faza	acetone	Protimikrobna aktivnost	(Peng in sod., 2006)
	Kurkufenol	Aciklični in ciklični diterpeni	Organska faza	etanol	Citotoksičnost proti celičnim linijam mišje levkemije Citotoksičnost proti celičnim linijam človeškega pljučnega raka	(Sennett in sod., 1992)
<i>Myrmerioderma styx</i>	Stiksenol Trije trikarbociklični diterpeni	Diterpeni	Organska faza	metanol	Aktivnost proti rakastim celičnim linijam Protituberkulotična aktivnost Aktivnost proti virusu HIV	(Peng in sod., 2003)
<i>Pseudoceratina crassa</i>	Ciantivigin AC Ciantivigin AD	Glikolipidni analogi	Organska faza	metanol / toluen (3:1) Kloroform	Obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Carassius auratus</i>	(Costantino in sod., 1993)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Pandaros acantifolium</i>		Ekstrakt	Organska faza	metanol	Citotoksičnost Vpliv na morfolgijo celic Zakasnitev napredovanja celičnega cikla	(Prado in sod., 2004)
<i>Pericharax heteroraphis</i>	Vodni ekstrakt	Proteini	Vodna faza	destilirana voda	Zmerna toksičnost za miši katerim je bil injiciran vodni ekstrakt	(Mebs in sod., 1985)
<i>Scopalina ruetzleri</i>	Vodni ekstrakt	Proteini	Vodna faza	destilirana voda	Nizka toksičnost za miši katerim je bil injiciran vodni ekstrakt	(Mebs in sod., 1985)
<i>Spongia sp.</i>	Agosterol	Sterol	Organska faza	aceton	Snov, ki reverzibilno deluje na MDR pri človeških rakastih celičnih linijah	(Aoki in sod., 1999)
	18-nor-3,17-dihidroksispongia-3,13(16),14-trien-2-on (1), 18-nor-3,5,17-trihidroksispongia-3,13(16),14-trien-2-on spongiapiridin 17-hidroksi-4-epi-spongiolakton A	diterpenoid	kloroform / metanol (1:1)	kloroform / metanol (1:1)	?	(Parrish in sod., 2014)
	metakromin L metakromin M metakromin N metakromin O metakromin P metakromin Q metakromin R metakromin S metakromin T	dušikovi meroterpenoidi	Organska faza	metanol	metakromin L in metakromin M izražata rahlo citotoksičnost	(Takahashi in sod., 2007)
<i>Spongia sp.</i>						

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	spongolaktam A spongolaktam B spongolaktam C	dušikovi diterpenoidi	Organska faza	Etilacetat	citotoksičnost inhibitorji fenistol transferaze	(Mori in sod., 2007)
	Nakijikinoni E Nakijikinoni F	seskviterpenoidni kinoni	Organska faza	metanol		(Takahashi in sod., 2009)
	<i>N</i> -palmitoil-heptakozan-1,3,5-triol	sfingolipid	Organska faza	etanol		(Guan in Zeng, 2010)
	Ilimakinon	Seskviterpenoid	Organska faza	metanol	Inhibitor liazne aktivnosti DNA polimeraze β Inhibitor CDC25B fosfataze Citotoksičnost za rakaste celične linije	(Cao in sod., 2004)
	Spongidepsin	Makrolid	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za rakaste celične linije	(Grassia in sod., 2001)
	Diktiostatin 1	Poliketid	Organska faza	etanol	Citotoksična aktivnost za mišje in človeške rakaste celične linije	(Isbrucker in sod., 2003)
	Spongistatin 1	Makrociklični lakton	Organska faza	metanol	Citotoksična aktivnost za človeške rakaste celične linije	(Pettit in sod., 1993)
	Haumanamid	Dušikov derivat	Organska faza	aceton	Zmerna aktivnost proti celični liniji KB	(Pham in sod., 1992)
	Torektandrol A Torektandrol B	Sesterterpeni	Organska faza	diklorometan / metanol (1:1)	Inhibicija rasti rakastih celičnih linij	(Charan in sod., 2001)
	16-oksolufarielolid 16-hidroksi-lufarielolid (2E,6E,10E)-3-formil-7,11-dimetil-13-(2,6,6-trimetilcikloheks-1-enil)trideka-2,6,10-trienoična kislina	Sesterterpenoidi in alkaloid	Organska faza	metanol	Inhibitorna aktivnost na CDC25B fosfatazo	(Cao in sod., 2005)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Thorectandra sp.</i>	Lufarielolid Dehidrolufarielolid diacid Faskaplizin					
	Tektandrol C Tektandrol D Tektandrol E Lufarin Lufarin V Palavolid	Sesterterpeni	Organska faza	metanol / diklorometan (1:1)	Citotoksičnost za rakaste celične linije	(Charan in sod., 2002a)
	Torektandramin	Alkaloid	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za rakaste celične linije	(Charan in sod., 2002b)
	1,8-Dihidroaploisinopsin 6-bromo-1,8-dihidroaploisinopsin (1H-indol-3-il) očetna kislina 6-bromo-1-hidroksi-1,8-dihidroaploisinopsin 6-bromo-1-metoksi-1,8-dihidroaploisinopsin 5-bromo-N,N-dimetiltriptofan 5-Bromohipoforin	Bromirani triptofanovi derivati	Organska faza	metanol / diklorometan (1:1)	Protimikrobna aktivnost proti <i>Staphylococcus epidermidis</i>	(Segraves in Crews, 2005)
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	14,16-dibromo-7,13,15-heksadekatrien-5-inoična kislina	Maščobna kislina	Organska faza	kloroform / metanol (1:1)	Citotoksična aktivnost	(Carballeira in sod., 1987)
<i>Xestospongia muta</i>	(7E,13ξ,15Z)-14,16-dibromo-7,13,15-heksadekatrien-5-inoična kislina	Maščobna kislina	Organska faza	izopropil alkohol	Inhibicija tumorske rasti Učinki na centralni živčni sistem	(Schmitz in Gopichand, 1978)