

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Petra CESAREC

**IZOLACIJA VODOTOPNIH BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI IZ
TROPSKIH MORSKIH SPUŽEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION OF AQUEOUS SOLUBLE BIOLOGICALLY ACTIVE
COMPOUNDS
FROM TROPICAL MARINE SPONGES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti, Oddelek za biologijo, Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor Anderluh

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tom Turk

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Kristina Sepčič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 24.9.2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Petra Cesarec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 577.15:593.4(043.2)=163.6
- KG spužve / vodni ekstrakti / biološko aktivne snovi / biološki testi
- KK
- AV CESAREC, Petra
- SA TURK, Tom (mentor)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2009
- IN IZOLACIJA VODOTOPNIH BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI IZ
TROPSKIH MORSKIH SPUŽEV
- TD Diplomaska naloga
- OP XI, 55 str., 16 preglednic, 2 sliki, 1 pril., 116 vir.
- IJ sl
- JI sl/ en
- AI Testirali smo biološko aktivnost vodnih ekstraktov 30 vrst morskih spužev s petimi biološkimi testi. Proučevali smo hemolitično, protibakterijsko, hemaglutinacijsko delovanje ter inhibitorno delovanje vodnih ekstraktov na encima acetilholinesterazo in proteinsko fosfatazo 1. Morske spužve smo ekstrahirali z deionizirano vodo. Od ekstrakta vsake vrste smo naredili »sveži« in »kuhani« vzorec. »Sveži« so vsebovali proteine, »kuhani« pa ne, ker smo jih odstranili oz. uničili. Dobili smo 30 »svežih« in 30 »kuhanih« vzorcev. Hemolitično so delovali 3 vzorci iz spužev *Panadaros acanthifolium* in *Pseudoceratina crassa*, in iz neidentificirane spužve 4. Protibakterijsko aktivnost so imeli vzorci iz vrst *Aplysina archeri*, *Ircinia felix* (59, 93s) in *Verongula rigida*. Vsi so imeli zmerno aktivnost, razen vzorca 59s, ki je bil aktiven tudi po 10x redčenju. Hemaglutinacijsko aktivnost je imelo 7 vzorcev iz 7 vrst. Vsi vzorci so bili »sveži«, aktivnost je bila zmerna, po 100x redčenju je več ni bilo. Encim acetilholinesterazo je inhibiralo 10 vzorcev, vendar je bila po redčenju njihova aktivnost zanemarljiva. Encim proteinsko fosfatazo 1 so nekateri vzorci aktivirali, nekateri pa inhibirali. Redčenj nismo opravljali, zaradi pomanjkanja encima. Za nadaljnje raziskave so zanimivi vzorci vrst *Aplysina archeri* in *Ircinia felix* (59), zaradi večkratne in močne biološke aktivnosti v opravljenih testih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 577.15:593.4(043.2)=163.6
- CX sponges / aqueous extracts / biologically active compounds / biological assays
- CC
- AU CESAREC, Petra
- AA TURK, Tom (supervisor)
- PP SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University in Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of biology
- PY 2009
- TI ISOLATION OF AQUEOUS SOLUBLE BIOLOGICALLY ACTIVE
COMPOUNDS FROM TROPICAL MARINE SPONGES
- DT Graduation thesis
- NO XI, 55 p., 16 tab., 2 fig., 1 ann., 116 ref.
- LA sl
- AL sl / en
- AB We tested biological activity of aqueous extracts of 30 marine sponge species using five biological assays. We looked for hemolytic, hemagglutinating and antibacterial activities and for inhibition/activation of enzymes AchE and PP1. We extracted all 30 marine sponge species with deionized water. Then we divided each extract in »fresh« (s) and »cooked« (k) part. »Fresh« samples contained proteins, while »cooked« did not, we removed or destroyed the contained proteins. We worked with 30 »fresh« and 30 »cooked« extracts from 30 sponges. 3 extracts, from species *Panadaros acanthifolium*, *Pseudoceratina crassa* and from unidentified sponge #4 showed hemolytic activity. Antibacterial activity was found in the extracts from *Aplysina archeri*, *Ircinia felix* (59, 93s) and *Verongula rigida*. Moderate hemagglutinating activity was found in 7 extracts from 7 species. All extracts were »fresh«. Enzyme AchE was inhibited by 10 extracts but further analysis with diluted samples gave results which possess negligible activity. Enzyme PP1 was inhibited by some extracts and activated by others. The species *Aplysina archeri* and *Ircinia felix* (59) are worth of further investigation because of their strong and multiple biological activity in the assays used in this study.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV	3
2.2 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI SPUŽEV	3
3 MATERIAL IN METODE	5
3.1 MATERIAL	5
3.1.1 Vzorci spužev	5
3.1.1.1 Sortiranje materiala	5
3.1.1.2 Tehtanje vzorcev	9
3.1.2 Priprava vodnih ekstraktov	10
3.1.3 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih	10
3.1.4 Kvantifikacija proteinov	11
3.2 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI	12
3.2.1 Hemolitični test	12
3.2.2 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju	12
3.2.3 Hemaglutinacijski test	14
3.2.4 Test inhibicije acetilholinesteraze	14
3.2.5 Test inhibicije proteinske fosfataze 1	15

4	REZULTATI	16
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI IN KOLIČINE PROTEINOV V EKSTRAKTIH	16
4.2	HEMOLITIČNA AKTIVNOST	18
4.3	PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	20
4.4	HEMAGLUTINACIJSKA AKTIVNOST	23
4.5	ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST	26
4.6	INHIBICIJA PROTEINSKE FOSFATAZE 1	29
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	34
5.1	RAZPRAVA	34
5.2	SKLEPI	38
6	POVZETEK	40
7	VIRI	41
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Otok Curacao.	5
Slika 2: Otok Lizard.	8

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1:	Pregled objav. priloga A
Preglednica 2:	Vrste in oznake spužev, nabranih na južnem morskem grebenu otoka Curacao, Karibsko morje. 6
Preglednica 3:	Vrste in oznake spužev nabranih na morskem grebenu otoka Lizard, ob obali avstralskega Queenslanda. 8
Preglednica 4:	Mase in porazdelitve testnih vzorcev spužev. 9
Preglednica 5:	Koncentracije proteinskih standardov (BSA) in njihove absorpcije pri 562 nm. 11
Preglednica 6:	Količina suhe snovi in proteinov v svežih in kuhanih vodnih ekstraktih spužev. 16
Preglednica 7:	Rezultati hemolitične aktivnosti vseh testnih vzorcev. 18
Preglednica 8:	Rezultati protibakterijske aktivnosti vodnih ekstraktov testiranih spužev. 21
Preglednica 9:	Rezultati protibakterijske aktivnosti po redčenju šestih aktivnih vzorcev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000. 23
Preglednica 10:	Rezultati hemaglutinacijske aktivnosti testnih vzorcev spužev. 24
Preglednica 11:	Rezultati hemaglutinacijske aktivnosti po redčenju sedmih aktivnih vzorcev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000. 26
Preglednica 12:	Rezultati delovanja vzorcev testiranih spužev na encim acetilholinesterazo. 27
Preglednica 13:	Rezultati encimskega testa z acetilholinesterazo (AChE) po redčenju desetih vzorcev spužev v razmerju 1:10. 29

Preglednica 14:	Rezultati inhibitornega delovanja vzorcev testnih spužev na proteinsko fosfatazo 1.	29
Preglednica 15:	Rezultati delovanja vzorcev testnih spužev na proteinsko fosfatazo 1. Prikazana je aktivacija delovanja PP1.	30
Preglednica 16:	Rezultati delovanja vzorcev testnih spužev na proteinsko fosfatazo 1. Prikazana je majhna aktivacija...	32

KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica 1: pregled objav

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AchE	acetilholinesteraza
BSA	goveji serumski albumin
EE	encimska enota
k	vzorec »kuhane« serije
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
OVER	koncentracija proteinov v vzorcu je prevelika, da bi jo spektrofotometrično lahko odčitali
PP1	proteinska fosfataza 1
s	vzorec »sveže« serije

1 UVOD

Morski ekosistemi so naša zadnja genska zakladnica in biotehnološki izziv. Človeštvo raziskuje in izkorišča kopno že več kot 3000 let in v bodočnosti bo podobno raziskovanje oceanov ob uporabi modernih kemijskih genskih tehnologij odkrilo celo vrsto novih kemijskih spojin uporabnih v medicini, kozmetiki, prehrani in (okolju prijazni) industriji.

Skozi zgodovino so ljudje redko iskali zdravila v morjih. Na južnem Kitajskem so se ohranili zapisi o morski etnomedicini, drugje jih ne najdemo. Kljub raziskovanju oceanov v 18. in 19. stoletju povezave med medicino in biodiverzitetjo v oceanih ni bilo. Še pred nekaj desetletji farmacevtska industrija ni vlagala veliko v raziskovanje življenja v oceanih. To je razumljivo, ker so bili oceani zaradi težavnosti raziskovanja in nevarnosti slabo raziskani pa tudi zaradi tega, ker je bilo na razpolago dovolj zdravnih snovi iz kopenskih rastlin in mikroorganizmov. Večje raziskovanje oceanov se je začelo v šestdesetih letih prejšnjega stoletja. Znanstveniki iz Združenih držav Amerike, Evrope in Japonske so zbirali in ekstrahirali morske organizme ter raziskovali raznolikost življenja v morju. Proučevali so spužve, mahovnjake, morske alge in druge sesilne morske organizme ter odkrili popolnoma nove molekule, ki so bile do tedaj neznane.

Razlog, da sesilni organizmi vsebujejo toliko različnih kemijskih spojin je v tem, da je njihov edini odgovor na stresne dejavnike v okolju (borba za prostor, obramba pred plenilci, patogeni) kemična obramba. Zato proizvajajo številne biološko aktivne sekundarne metabolite (Sepčić, 2008).

V sedemdesetih letih so raziskave nadaljevali, med drugim so odkrili, da halogeni elementi niso samo substituenti v kompleksnih molekulah, ampak so lahko tudi reaktanti v halociklizaciji. Izolirali in določili so karbonimidne dikloride in molekule kot je brevetoksin-B. Tako so začeli spoznavati, da bi lahko spojine uporabili v praktične namene. Največ so se s tem ukvarjali v ZDA. Eden prvih uporabnih proizvodov iz morskih organizmov je bil psevdopterosin (pri kozmetiki Estée Lauder), ki zmanjšuje alergijske reakcije na kozmetične proizvode in vnetja kože. Prvo zdravilo iz morja je bil Vidarabin. To je nenavaden nukleozid, ki se danes pridobiva s kemijsko sintezo. Leta 1951 so ga osamili iz tropske morske spužve *Cryptotethya crypta*. Vidarabin je učinkovito sredstvo za zatiranje infekcije z virusom *Herpes simplex*, zavira pa tudi delovanje virusa HIV.

V zadnjih desetih letih so v morskih organizmih odkrili nove spojine, ki bi bile lahko uporabne v biomedicini. Pri tem prednjačijo spužve, v katerih so sekundarni metaboliti posebno pogosti. Od približno 18000 odkritih biološko aktivnih spojin, jih 37% izvira iz spužev (Sepčić, 2008). Ara-A (Vidarabin) in Ara -C sta protivirusno ter protirakavo zdravilo iz spužve *Cryptotethia crypta*. Sekundarni metaboliti spužev delujejo še protivnetno (inhibicija sproščanja arahidonične kisline), protitumorsko (inhibicija proteinske kinaze), so kardiovaskularna sredstva za zdravljenje tromboze, nekatera bi bila morda uporabna pri zdravljenju bolezni kot so ateroskleroza, diabetes, nekatere vplivajo na delovanje živčevja (pri čemer pride do sproščanja gladkih mišic), druge delujejo antivirusno (HIV virus), antimalarijsko, antibiotično in protiglivno (Sipkema in sod., 2005).

Glede na to koliko različnih biološko aktivnih snovi s širokim spektrom delovanja so odkrili v spužvah, smo se odločili, da bomo raziskali nekaj vrst morskih spužev, ki so nam jih poslali z Univerze v Frankfurtu (Nemčija). Prepostavili smo, da bi lahko v njih odkrili kakšne nove biološko aktivne snovi.

V naši diplomski nalogi smo raziskovali 30 vzorcev spužev, večina jih je bila iz otoka Curacao (Nizozemski Antili), nekaj pa iz otoka Lizard (Queensland, Avstralija). Uporabili smo vodne ekstrakte spužev. Vzorce smo testirali na hemolitično, protibakterijsko in hemaglutinacijsko aktivnost, za inhibicijo acetilholinesteraze ter inhibicijo proteinske fosfataze-1.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV

Preglednica objavljenih raziskav je podana v **prilogi A (preglednica 1)** in predstavlja iz literature zbrane podatke o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v vodnih in organskih ekstraktih iz spužev, katere smo vključili v naše raziskave. Zanimalo nas je namreč, če so aktivnosti, ki smo jih zasledili v naših testih, že bile opisane ali smo odkrili kakšno novo bioaktivno učinkovino. Prazno polje v tabeli nakazuje, da v viru ta informacija ni bila navedena.

2.2 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI SPUŽEV

Spužve (Porifera) so najpreprostejši mnogoceličarji, ki še nimajo razvitih pravih tkiv (razen krovnih) in organov. Njihove celice niso strogo specializirane kakor pri pravih mnogoceličarjih in so zato funkcionalno prilagodljive, prehajajo iz enega tipa celice v drugi, ter so med sabo le rahlo povezane (omejena tkivna organizacija), zato lahko govorimo o njihovem telesu kot o koloniji praživali (vsaka celica ima visoko stopnjo samostojnosti). Spužve so vezane na vodna bivališča. Razen sladkovodne družine Spongilidae, so vse ostale morske živali. Morske vrste živijo od plitvega infralitorala do največjih globin, pogoste so tudi v poltemnih in temnih podvodnih votlinah (Turk, 1996).

Spužve so slepa razvojna veja in zoologi jih uvrščajo v skupino imenovano Parazoa.

So sesilne živali, pritrjene na podlago, npr. v morju so to skale, v sladkih vodah pa potopljene veje. Spužve so kroglastih, cevastih, drevesastih oblik, ponavadi asimetrične. Največkrat so sive, rjave ali oranžne barve, vendar tudi druge barve niso redke. Njihova velikost meri od nekaj milimetrov do dveh metrov. Razmnoževanje je lahko spolno ali nespolno z gemulami (notranji brsti) in brsti.

Telo spužev je iz treh plasti: zunanje plasti (pinakoderm), osrednje plasti iz zdrizaste medceličnine (mezohil) in notranje plasti (hoanoderm). V vseh treh plasteh najdemo tudi nediferencirane celice. Površina spužev je polna odprtih. Skozi te odprtine spužve filtrirajo vodo s hranilnimi delci, dobivajo kisik ter sproščajo spolne celice. Številnejše in manjše so dotekalke skozi katere voda priteka v telo spužve, manj številne in večje so odtekalke, skozi katere voda izteka. Dotekalke se nadaljujejo v cevke, te pa vodijo v kamrice, katerih stene tvorijo celice ovratničarke (hoanocite). Plast hoanocit je hoanoderm. Te celice so podobne bičkarjem ovratničarjem in z utripanjem bičkov povzročajo usmerjeno pretakanje vode skozi spužvo. Glede na oblikovanje notranje votline spužev in namestitev ovratničark ločimo 3 gradbene tipe spužev: askon, sikon in levkon. Spužve tipa askon imajo centralni prostor (spongocel) obdan z ovratničarkami, voda doteka vanj skozi dotekalke in izhaja skozi iztekalko na vrhu. Pri tipu sikon se centralni prostor razdeli na kamrice, ki jih obdajajo ovratničarke. Pri tipu levkon pa se pojavi še večja razvejanost kot pri tipu sikon, drobne kamrice so povezane z dovodnimi in odvodnimi kanali, ovratničarke so v stenah kamric. S tem se povečuje notranja površina za sprejem hrane in izmenjavo plinov. Zunanja telesna površina spužev je iz pinakoderma, ki ga tvorijo pinakocite. Te vsebujejo filamente, ki omogočajo kontrakcijo. Med njimi so lahko posebne celice porocite z obsežnim intracelularnim prostorom, ki tvori poro. Hrana se prebavlja v amebocitah, ki vsebujejo številne lizosome. Spužve imajo ogrodje iz organske snovi, spongina, v katerega so lahko vključene kremenaste ali apnenčaste spikule, ki so različnih oblik (tri-žarkaste, šest-žarkaste, s kaveljčki). Spikule nastajajo v mezohilu v spikuloblastih ali skleroblastih, spongina pa v spongocitah.

Spikule so glavni taksonomski znak za določanje spužev. Delijo se na megasklere in mikrosklere. Megasklere gradijo mrežast skelet in so pri nekaterih vrstah medsebojno povezane s sponginom. Mikrosklere so najpogostejše v zunanjem sloju in so v glavnem razpršene ter redko povezane.

Mnoge spužve vsebujejo strupene snovi s katerimi odvrčajo plenilce in preprečujejo, da bi se na njih naselili drugi organizmi. V notranjosti telesa spužev pa najdejo zavetje pred sovražniki mnoge živali.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

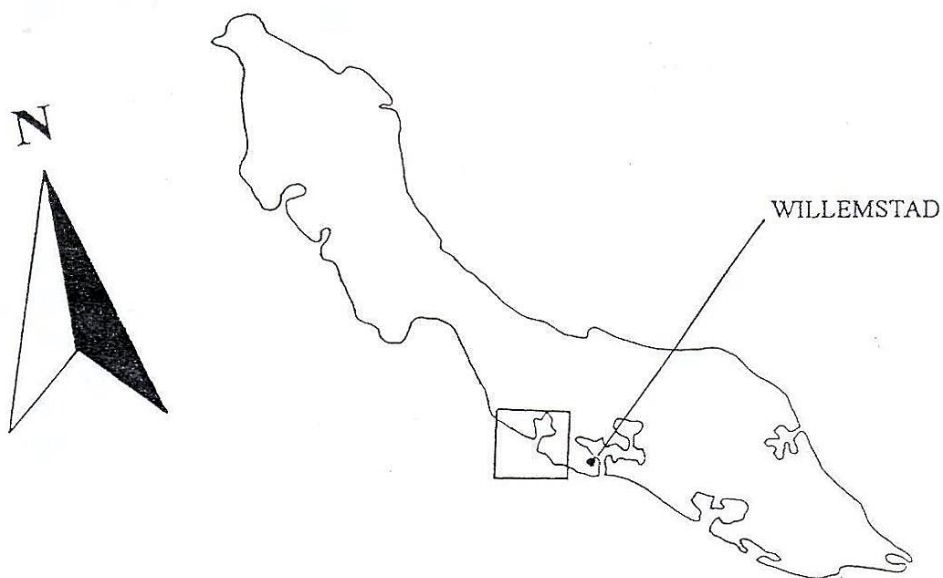
3.1.1 Vzorci spužev

3.1.1.1 Sortiranje materiala

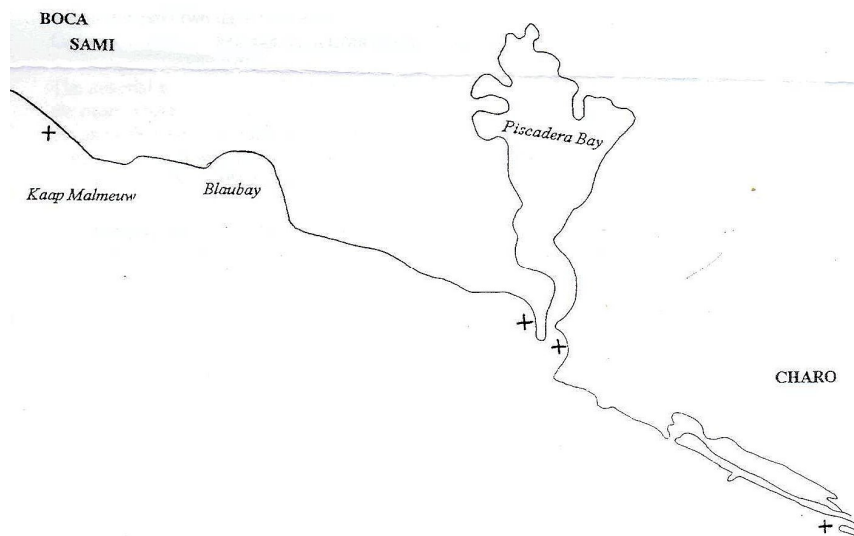
Od tridesetih vzorcev spužev jih je bilo 28 bilo nabranih na otoku Curacao (Nizozemski Antili), **slika 1**, preostala 2 pa izvirata iz otoka Lizard, **slika 2**, ki je del velikega koralnega grebena ob obali avstralskega Queenslanda.

Vzorci so nabrali potapljači na globinah med 5 in 45 metri, jih globoko zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in v takem stanju transportirali v Evropo. Tu so jih večino podrobneje določili (najmanj do rodu), liofilizirali in shranili.

A



B



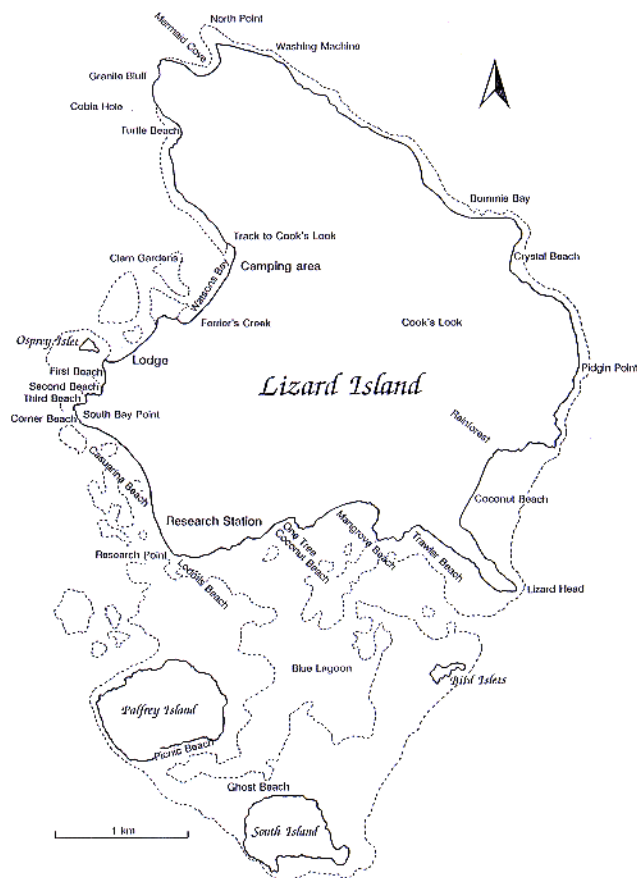
Slika 1: Otok Curacao; A: Zemljevid otoka Curacao v Karibskem morju, kjer so nabrali večji del spužev za testiranje. B: Izrez iz A (1:30000 povečava). S + so označena mesta vzorčenja.

V **preglednici 2** so navedene vrste spužev in oznake vzorcev z lokacij na morskem grebenu Curacao, Karibsko morje.

Preglednica 2: Vrste in oznake spužev nabranih na južnem morskem grebenu otoka Curacao, Karibsko morje.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca
<i>Agelas conifera</i>	97
<i>Agelas dispar</i>	88
<i>Aplysina archeri</i>	40
<i>Aplysina lacunosa</i>	112
<i>Callyspongia plicifera</i>	9
<i>Callyspongia plicifera</i>	67
<i>Callyspongia plicifera</i>	103
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66
<i>Holopsamma helwigi</i>	5
<i>Ircinia campana</i>	70

<i>Ircinia felix</i>	59
<i>Ircinia felix</i>	93
<i>Ircinia strobilina</i>	56
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110
Neidentificirana 1	21
Neidentificirana 2	32
Neidentificirana 3	96
Neidentificirana 4	117
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94
<i>Panadaros acanthifolium</i>	76
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	45
<i>Tridideum misolidum</i>	79
<i>Verongula gigantea</i>	44
<i>Verongula rigida</i>	38
<i>Xestospongia muta</i>	95



Slika 2: Otok Lizard. Zemljevid otoka Lizard, ki je del velikega koralnega grebena ob obali avstralskega Queenslanda.

V **preglednici 3** sta navedeni vrsti spužev in oznake vzorcev iz lokacije otoka Lizard, Avstralija.

Preglednica 3: Vrste in oznake spužev nabranih na morskem grebenu otoka Lizard, ob obali avstralskega Queenslanda.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca
<i>Ircinia sp.</i>	107
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132

3.1.1.2 Tehtanje vzorcev

Določili smo maso vzorcev spužev iz obeh lokacij in jo razdelili na 2 dela. 1/6 mase smo shranili, 1/3 pa strli v terilnici in jo uporabili kot testno maso, ki smo jo naknadno razdelili na 2 enaka dela (kot je opisano v poglavju 3.1.2.). Preostalo maso (1/2) je Bojan Martinšek porabil za pripravo organskih ekstraktov, katere je analiziral v svoji diplomski nalogi.

Preglednica 4 prikazuje mase vzorcev in njihove porazdelitve.

Preglednica 4: Mase in porazdelitve testnih vzorcev spužev.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Masa vzorca [g]	1/6 mase vzorca [g]	1/3 mase vzorca [g]
<i>Agelas conifera</i>	97	6.8	1.13	2.26
<i>Agelas dispar</i>	88	3.3	0.55	1.1
<i>Aplysina archeri</i>	40	2.0	0.33	0.66
<i>Aplysina lacunosa</i>	112	5.2	0.86	1.72
<i>Callyspongia plicifera</i>	9	0.8	0.13	0.26
<i>Callyspongia plicifera</i>	67	1.3	0.22	0.44
<i>Callyspongia plicifera</i>	103	2.2	0.37	0.74
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48	1.1	0.18	0.36
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66	1.7	0.28	0.56
<i>Holopsamma helwigi</i>	5	2.1	0.35	0.7
<i>Ircinia campana</i>	70	3.2	0.53	1.06
<i>Ircinia felix</i>	59	4.1	0.68	1.36
<i>Ircinia felix</i>	93	2.7	0.45	0.90
<i>Ircinia strobilina</i>	56	2.3	0.38	0.76
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110	5.5	0.92	1.84
Neidentificirana 1	21	2.4	0.4	0.8
Neidentificirana 2	32	2.95	0.49	0.98
Neidentificirana 3	96	2.6	0.43	0.86
Neidentificirana 4	117	5.3	0.88	1.76
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83	1.7	0.28	0.56
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94	7.3	1.22	2.44
<i>Panadaros acanthifolium</i>	76	1.9	0.32	0.64
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2	5.5	0.92	1.84
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	45	2.44	0.41	0.82

<i>Tridideum misolidum</i>	79	8.9	1.48	2.96
<i>Verongula gigantea</i>	44	3.4	0.57	1.14
<i>Verongula rigida</i>	38	1.4	0.23	0.46
<i>Xestospongia muta</i>	95	6.5	1.1	2.2
<i>Ircinia sp.</i>	107	3.8	0.63	1.26
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132	3.9	0.65	1.3

3.1.2 Priprava vodnih ekstraktov

Homogenizirano testno maso spužev smo ekstrahirali s približno 10 ml deionizirane vode. Ekstrakcija je potekala 12 ur na stresalniku pri 400 obratih/minuto in pri 4 °C.

Naslednji dan smo ekstrakte 30 min centrifugirali pri 15000 obratih/minuto in 4 °C. Supernatant smo previdno odpipetirali v čašo, mu določili volumen in ga razdelili na polovico.

Eno polovico volumna smo takoj razdelili v epice po 1.0 ml ter shranili na -20 °C. Te epice smo označili kot "svežo serijo" in vzorce označili z dodano črko »s«.

Drugo polovico volumna smo prenesli v epruveto, jo zamašili s kovinskim zamaškom in jo 15 min segrevali na vodni kopeli pri 100 °C. Epruvete smo ohladili, tekočino porazdelili v epice po 1.0 ml ter ponovno centrifugirali 15 min pri 13000 obratih/minuto. Supernatant smo odpipetirali v epice (po 1.0 ml) ter shranili na -20 °C. Te epice smo označili kot "kuhana serijo" in vzorce označili z dodano črko »k«.

3.1.3 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih

Suho težo smo ugotavljali s sušenjem 500 µl vzorca na stehtanem in označenem urnem stekelcu. Sušenje je potekalo v sterilizatorju 30 min pri 120 °C. Po sušenju smo stekelca ponovno stekali in preračunali suhe teže v mg/ml. Slednje prikazuje **preglednica 6**.

3.1.4 Kvantifikacija proteinov

Količino proteinov smo merili samo pri "sveži seriji" vzorcev in sicer na podlagi primerjave izmerjene absorpcije z umeritveno krivuljo za znane koncentracije govejega serumskega albumina (BSA). Vzorce smo redčili v razmerju 1:20, tako da smo k 2.5 µl vzorca dodali 47.5 µl deionizirane vode. V nadaljevanju smo dodali še 950 µl mešanice reagentov BCA protein reagent A (Pierce, 23223) in BCA protein reagent B (Pierce, 23224) v razmerju 50:1. Poleg vzorcev smo pripravili tudi slepo probo, v kateri je bilo le 50 µl vode in 950 µl mešanice reagentov A in B. Po 200 µl pripravljenih raztopin smo razdelili v jamice mikrotitrne plošče. S čitalcem mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA) smo po 30 minutah razvijanja reakcije v topli sobi (37 °C) določili absorpcijo proteinov pri valovni dolžini 562 nm.

Preglednica 5 prikazuje koncentracije proteinov ter njihove absorpcije, na podlagi katerih smo naredili umeritveno krivuljo.

Preglednica 5: Koncentracije proteinskih standardov (BSA) in njihove absorpcije pri 562 nm.
OVER = koncentracija proteinov v vzorcu je prevelika, da bi jo spektrofotometrično lahko odčitali.

Standardi	Absorbciija pri 562 nm [A _{562nm}]	Koncentracija proteinov [mg/ml]
1	OVER	10
2	2.579	5
3	0.552	1
4	0.281	0.5
5	0.055	0.1

3.2 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

3.2.1 Hemolitični test

Eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže goveje krvi, ki smo ji pri odvzemu dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino in uporabili za biološke teste ali pa spravili v Alseverjevem konzervansu v hladilnik. Tako pripravljene eritrocite lahko uporabljamo dokler se supernatant ne pobarva rdeče, kar nakazuje, da je prišlo do hemolize. Pred uporabo smo konzervirane eritrocite vedno dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Za testiranje smo jih resuspendirali v pufru za eritrocite (raztopina 0.13 M NaCl in 0.02 M TRIS.HCl), pH 7.4. Pripravili smo suspenzijo eritrocitov, ki je pri 650 nm imela navidezno absorpcijo 1.0 ± 0.01 .

Hemolitično aktivnost smo zasledovali s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA), ki nam omogoča istočasno zasledovanje 96 časovnih potekov. Na mikrotitrni plošči smo napolnili 72 vdolbinic s po 100 μ l eritrocitnega pufru in 20 μ l vzorca (svežega ali kuhanega ekstrakta posameznih spužev). Po končanem pipetiranju smo v vsako vdolbinico dodali še 100 μ l eritrocitov ter pričeli z meritvijo. Hemolizo smo opazovali kot padec absorpcije pri 650 nm. Kot kontrolo smo uporabili 100 μ l eritrocitnega pufru, 20 μ l deionizirane vode in 100 μ l eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 20 minut pri 25 °C.

Pri hemolitično aktivnih vzorcih smo naredili razredčitve in odčitali polovični čas hemolize (t_{50}), oz. čas, pri katerem absorpcija pade na polovico svoje začetne vrednosti. Redčili smo v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000.

3.2.2 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju

Protibakterijsko aktivnost vzorcev smo testirali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Kot testne seve smo uporabili en po Gramu pozitiven (*Bacillus subtilis*) in en po Gramu

negativen (*Escherichia coli*) bakterijski sev. Oba seva sta v zbirki Katedre za biologijo mikroorganizmov Oddelka za Biologijo na Biotehniški Fakulteti Univerze v Ljubljani.

Zgoraj naštete bakterije smo sterilno nacepili v 100 ml erlenmajerice, ki so vsebovale po 10 ml avtoklaviranega tekočega gojišča (Luria Broth). Gojišče smo predhodno pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 2.5 g Luria Broth (Sigma, ZDA) in raztopino razdelili v erlenmajerice. Le-te smo z nacepljenim gojiščem preko noči stresali pri 250 obratih/minuto in pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo določili število bakterij tako, da smo 1 ml gojišča sterilno prenesli v plastično kiveto in na dvožarkovnem spektrofotometru (Shimadzu, Japonska) izmerili optično gostoto pri 600 nm. Kot slepi poskus smo uporabili sterilno tekoče gojišče Luria Broth. Število bakterij smo določili iz optične gostote raztopine s pomočjo standardiziranih umeritvenih krivulj za ustrezna bakterijska seva.

Sledila je priprava agarja, ki smo ga naredili z raztapljanjem 25 g gojišča Luria Broth in 15 g agarja v 1 l deionizirane vode v vsako od dveh sterilnih 2 l erlenmajeric, ki smo jih nato pokrili z aluminijasto folijo in jih avtoklavirali. Vroč medij smo pustili, da se je ohladil na primerno temperaturo (~ 42 °C). Medtem smo izračunali volumen tekoče bakterijske kulture, tako da je bila končna koncentracija enaka 5×10^5 bakterijskih kolonij na 1 l gojišča. Ker je bila izmerjena količina prekonočne bakterijske kulture 2×10^8 , je to pomenilo, da moramo dodati 2.5 ml inokulata na 1 l avtoklaviranega gojiščnega medija. Preračunane volumne smo sterilno prenesli v ohlajeni medij ter dobro premešali. Sledilo je razlivanje, pri čemer smo po 20 ml agarja z vcepljeno bakterijsko kulturo razlili na vsako od šestintridesetih Petrijevih plošč. Na ta način smo pripravili 36 plošč z bakterijskim sevom *Bacillus subtilis* in 36 plošč z bakterijskim sevom *Escherichia coli*. Le te smo do uporabe hranili pri 4 °C.

Pred uporabo smo s pomočjo steriliziranega plutovrta v vsaki plošči zvrtili 4 luknje premera 1 cm. V vsako od njih smo za test dodali po 100 µl vzorca (svežega ali kuhanega ekstrakta posameznih spužev). Po 12-urni inkubaciji pri 37 °C smo odčitali polmere inhibicijskih con, ki so bile vidne okoli lukenj.

Tiste vzorce, ki so kazali protibakterijsko aktivnost smo redčili do koncentracije, ko inhibicijska cona ni bila več vidna. Te redčitve so bile za posamezne vzorce 1:10, 1:100 in 1:1000.

3.2.3 Hemaglutinacijski test

Goveje eritrocite smo trikrat sprali z 0.9% raztopino NaCl in dvakrat s pufrum, ki je vseboval 140 mM NaCl ter 13 mM TRIS/HCl, pH 7.4. V istem pufru smo pripravili 2% suspenzijo spranih eritrocitov.

Za test smo mikrotitrno ploščo, ki ima jamice z zaobljenim dnom, napolnili s po 100 μ l suspenzije eritrocitov ter s po 25 μ l vzorca. Po 45-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo rezultate odčitali vizualno.

Pri vzorcih, ki so kazali pozitivne rezultate, smo naredili še serijo redčenj v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000. S tem smo določili koncentracijo, pri kateri hemaglutinacija ni več potekla.

3.2.4 Test inhibicije acetilholinesteraze

Aktivnost acetilholinesteraze (AChE) in njeno inhibicijo s testnimi vzorci smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Kot encim smo uporabili AChE iz električne jegulje (Sigma, ZDA), ki smo jo raztopili v 100 mM fosfatnem pufru, pH 7.3 v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/ml. Pred začetkom testa smo encim 100 krat redčili v istem pufru. Mikrotitrno ploščo smo napolnili s po 140 μ l 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) ter za kontrolo uporabili 10 μ l acetilholina (substrat) s končno koncentracijo 1 mM, 20 μ l vode in tik pred začetkom meritve še 50 μ l AChE (encima).

Za testiranje vpliva vzorcev smo uporabili 140 μ l Ellmanovega reagenta in 10 μ l acetilholina s končno koncentracijo 1 mM. Nato smo v posamezno vdolbinico dodali po 20 μ l vsakega testnega vzorca (svežega ali kuhanega ekstrakta spužve) ter 50 μ l AChE. S tem smo ugotovili, kateri vzorci ne inhibirajo delovanja encima. Vse ostale smo še enkrat testirali in

uporabili le 2 μ l vzorca, tako da je bila koncentracija desetkrat manjša kakor v prvem poskusu. Vse vzorce, pri katerih smo ugotovili pozitiven rezultat, smo v nadaljevanju redčili v razmerjih 1: 10. Vse meritve smo izvajali 12 min pri 412 nm in 25 °C.

3.2.5 Test inhibicije proteinske fosfataze 1

Aktivnost proteinske fosfataze 1 (PP1) in njeno inhibicijo s testnimi vzorci smo zasledovali s kolorimetrično metodo (Tubaro in sod., 1996) s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Uporabljen encim PP1 je kunčja rekombinantna α -izooblika izražena v *E. coli* (Sigma, ZDA). Mikrotitrno ploščo smo napolnili s 150 μ l pufra (raztopina 40 mM TRIS.HCl, 34 mM MgCl₂ · 6H₂O, 4 mM EDTA in 4 mM DL-DTT, pH 8.4) ter za kontrolo dodali 2 μ l deionizirane vode, v test pa po 2 μ l svežega ali kuhanega ekstrakta posameznih spužev. Po končanem pipetiranju smo povsod dodali po 50 μ l substrata (141 mM *p*-nitrofenil fosfata). Tik pred začetkom meritve smo na ploščo dodali še 50 μ l encima PP1.

Vse meritve smo opazovali 12 minut pri 405 nm in 25 °C.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI IN KOLIČINE PROTEINOV V EKSTRAKTIH

Preglednica 6 prikazuje koncentracije suhe snovi in koncentracije proteinov v vseh testiranih ekstraktih spužev, ki smo jih uporabili pri preračunavanju količine snovi in proteinov v bioloških testih.

Preglednica 6: Količina suhe snovi in proteinov v svežih in kuhanih vodnih ekstraktih spužev.

s = sveži ekstrakti

k = kuhani ekstrakti

- = "kuhana serija" vzorcev ni vsebovala proteinov zato nismo opravljali meritev absorpcije teh ekstraktov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Suha teža [g]	Suha teža [mg/ml]	A 562nm	Koncentracija proteinov [mg/ml]
<i>Agelas conifera</i>	97s	0.00525	26.25	0.302	5.44
	97k	0.00501	25.05	-	-
<i>Agelas dispar</i>	88s	0.00524	26.20	0.169	3.03
	88k	0.00604	30.20	-	-
<i>Aplysina archeri</i>	40s	0.00610	30.50	0.571	10.32
	40k	0.00599	29.95	-	-
<i>Aplysina lacunosa</i>	112s	0.00876	43.80	0.776	14.03
	112k	0.00722	36.10	-	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	9s	0.00117	5.85	0.027	0.46
	9k	0.00096	4.80	-	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	67s	0.00350	17.50	0.145	2.60
	67k	0.00366	18.30	-	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	103s	0.00694	34.70	0.154	2.76
	103k	0.00612	30.60	-	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48s	0.00205	10.25	0.066	1.17
	48k	0.00212	10.60	-	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66s	0.00291	14.55	0.141	2.52
	66k	0.00257	12.85	-	-
<i>Holopsamma helwigi</i>	5s	0.00566	28.30	0.346	6.24

	5k	0.00514	25.70	-	-
<i>Ircinia campana</i>	70s	0.00574	28.70	0.274	4.93
	70k	0.00539	26.95	-	-
<i>Ircinia felix</i>	59s	0.00572	28.60	0.436	7.87
	59k	0.00551	27.55	-	-
<i>Ircinia felix</i>	93s	0.00493	24.65	0.385	6.95
	93k	0.00403	20.15	-	-
<i>Ircinia strobilina</i>	56s	0.00388	19.40	0.310	5.59
	56k	0.00358	17.90	-	-
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110s	0.00759	37.95	0.450	8.12
	110k	0.00615	30.75	-	-
<i>Neidentificirana 1</i>	21s	0.00474	23.70	0.203	3.65
	21k	0.00378	18.90	-	-
<i>Neidentificirana 2</i>	32s	0.00723	36.15	0.544	9.83
	32k	0.00578	28.90	-	-
<i>Neidentificirana 3</i>	96s	0.00335	16.75	0.153	2.74
	96k	0.00319	15.95	-	-
<i>Neidentificirana 4</i>	117s	0.01022	51.10	0.607	10.97
	117k	0.00807	40.35	-	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83s	0.00497	24.85	0.341	6.15
	83k	0.00516	25.80	-	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94s	0.00562	28.10	0.266	4.79
	94k	0.00499	24.95	-	-
<i>Panadaros acanthifolium</i>	76s	0.00666	33.30	0.315	5.68
	76k	0.00692	34.60	-	-
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2s	0.01352	67.60	0.572	10.33
	2k	0.00966	48.30	-	-
<i>Spheciospongia vesparium</i>	45s	0.00427	21.35	0.470	8.49
	45k	0.00426	21.30	-	-
<i>Tridideum misolidum</i>	79s	0.00820	41.00	0.388	7.00
	79k	0.00687	34.35	-	-
<i>Verongula gigantea</i>	44s	0.00784	39.20	0.772	13.96
	44k	0.00645	32.25	-	-
<i>Verongula rigida</i>	38s	0.00331	16.55	0.302	5.44
	38k	0.00262	13.10	-	-
<i>Xestospongia muta</i>	95s	0.00578	28.90	0.285	5.13
	95k	0.00666	33.30	-	-

<i>Ircina sp.</i>	107s	0.00289	14.45	0.083	1.47
	107k	0.00254	12.70	-	-
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132s	0.00699	34.95	0.229	4.12
	132k	0.00458	22.90	-	-

4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

Preglednica 7 prikazuje rezultate hemolitične aktivnosti za vse testne vzorce. Sveži ekstrakt spužve *Panadaros acanthifolium* (76s) je bil močno hemolitičen. Zmerno hemolitično aktivnost je imel vzorec iz spužve Neidentificirana 4 (117s), rahlo hemolitično aktivnost pa je imel ekstrakt spužve *Pseudoceratina crassa* (2s). Ostali vzorci niso bili hemolitično aktivni.

Vzorci 2s, 76s in 117s smo dodatno redčili 10x, 100x in 1000x. Pri nobeni dodatni redčitvi ni bilo opaziti hemolitične aktivnosti.

Preglednica 7: Rezultati hemolitične aktivnosti vseh testnih vzorcev.

- = ni aktivnosti
- + = rahla aktivnost (hemoliza poteče v času med 10 in 15 minutami)
- ++ = zmerna aktivnost (hemoliza poteče v času med 5 in 10 minutami)
- +++ = močna aktivnost (hemoliza poteče v času, krajšem od 5 minut)
- s = sveži ekstrakti
- k = kuhani ekstrakti
- / = »kuhana serija« ekstraktov ni vsebovala proteinov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Količina snovi v testu [mg/ml]	Količina proteinov v testu [mg/ml]	Hemoliza (+, ++, +++, -,)
<i>Agelas conifera</i>	97s	2.386	0.50	-
	97k	2.277	/	-
<i>Agelas dispar</i>	88s	2.382	0.28	-
	88k	2.745	/	-
<i>Aplysina archeri</i>	40s	2.773	0.94	-
	40k	2.723	/	-
<i>Aplysina lacunosa</i>	112s	3.982	1.28	-
	112k	3.282	/	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	9s	0.532	0.04	-
	9k	0.436	/	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	67s	1.591	0.24	-

	67k	1.664	/	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	103s	3.155	0.25	-
	103k	2.782	/	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48s	0.932	0.12	-
	48k	0.964	/	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66s	1.323	0.23	-
	66k	1.168	/	-
<i>Holopsamma helwigi</i>	5s	2.573	0.57	-
	5k	2.336	/	-
<i>Ircinia campana</i>	70s	2.609	0.45	-
	70k	2.450	/	-
<i>Ircinia felix</i>	59s	2.600	0.72	-
	59k	2.505	/	-
<i>Ircinia felix</i>	93s	2.241	0.63	-
	93k	1.832	/	-
<i>Ircinia strobilina</i>	56s	1.764	0.52	-
	56k	1.627	/	-
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110s	3.450	0.74	-
	110k	2.795	/	-
<i>Neidentificirana 1</i>	21s	2.155	0.33	-
	21k	1.718	/	-
<i>Neidentificirana 2</i>	32s	3.286	0.89	-
	32k	2.627	/	-
<i>Neidentificirana 3</i>	96s	1.523	0.25	-
	96k	1.450	/	-
<i>Neidentificirana 4</i>	117s	4.645	0.98	++
	117k	3.668	/	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83s	2.259	0.56	-
	83k	2.345	/	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94s	2.555	0.44	-
	94k	2.268	/	-
<i>Panadaros acanthifolium</i>	76s	3.027	0.52	+++
	76k	3.145	/	-
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2s	6.145	0.94	+
	2k	4.391	/	-
<i>Spheciospongia vesparium</i>	45s	1.941	0.77	-
	45k	1.936	/	-

<i>Tridideum misolidum</i>	79s	3.727	0.64	-
	79k	3.123	/	-
<i>Verongula gigantea</i>	44s	3.564	1.27	-
	44k	2.932	/	-
<i>Verongula rigida</i>	38s	1.505	0.49	-
	38k	1.191	/	-
<i>Xestospongia muta</i>	95s	2.627	0.47	-
	95k	3.027	/	-
<i>Ircina sp.</i>	107s	1.314	0.13	-
	107k	1.155	/	-
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132s	3.177	0.37	-
	132k	2.082	/	-

4.3 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Preglednica 8 prikazuje protibakterijsko aktivnost vodnih ekstraktov spužev. Vzorci 59s in 59k vrste *Ircinia felix* ter 38s in 38k vrste *Verongula rigida* so imeli najizrazitejšo inhibicijsko cono proti po Gramu pozitivnemu sevu *Bacillus subtilis*. Aktivnost proti sevu *B. subtilis* so pokazali še vzorci 97s, 97k, 40s, 59s, 59k, 93s, 93k, 38s, 38k in 2s. Noben vzorec ni pokazal aktivnosti proti po Gramu negativnemu sevu *Escherichia coli*.

Vzorci z inhibicijsko cono označeno z (-) niso imeli protibakterijske aktivnosti.

Dodatna redčenja smo opravili za vzorce, kjer je bila cona inhibicije večja ali enaka 3mm (38s, 38k, 40s, 59s, 59k ter 93s, razen za vzorec 2s, katerega inhibicijska cona je merila 3mm, vendar ni bila zelo izrazita). Redčili smo v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000. Rezultate aktivnosti prikazuje **preglednica 9**. Vzorec 59s (*Ircinia felix*) je imel po desetkratnem redčenju še prisotno protibakterijsko aktivnost. Pri ostalih vzorcih je bil rezultat testa negativen.

Preglednica 8: Rezultati protibakterijske aktivnosti vodnih ekstraktov testiranih spužev.

- = ni aktivnosti

s = sveži ekstrakti

k = kuhani ekstrakti

/ = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov

Vzorci z inhibicijsko cono označeno z (-) niso imeli protibakterijske aktivnosti.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Količina dodane snovi v testu [mg/ml]	Količina proteinov v testu [mg/ml]	Širina inhibicijske cone (r) [mm] (<i>B. subtilis</i>)	Širina inhibicijske cone (r) [mm] (<i>E. coli</i>)
<i>Agelas conifera</i>	97s	2.625	0.544	1	-
	97k	2.505	/	2	-
<i>Agelas dispar</i>	88s	2.620	0.303	-	-
	88k	3.020	/	-	-
<i>Aplysina archeri</i>	40s	3.050	1.032	3.5	-
	40k	2.995	/	-	-
<i>Aplysina lacunosa</i>	112s	4.380	1.403	-	-
	112k	3.610	/	-	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	9s	0.585	0.046	-	-
	9k	0.480	/	-	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	67s	1.750	0.260	-	-
	67k	1.830	/	-	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	103s	3.470	0.276	-	-
	103k	3.060	/	-	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48s	1.025	0.117	-	-
	48k	1.060	/	-	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66s	1.455	0.252	-	-
	66k	1.285	/	-	-
<i>Holopsamma helwigi</i>	5s	2.830	0.624	-	-
	5k	2.570	/	-	-
<i>Ircinia campana</i>	70s	2.870	0.493	-	-
	70k	2.695	/	-	-
<i>Ircinia felix</i>	59s	2.860	0.787	5	-
	59k	2.755	/	5, 3	-
<i>Ircinia felix</i>	93s	2.465	0.695	3	-
	93k	2.015	/	2, 1	-
<i>Ircinia strobilina</i>	56s	1.940	0.559	-	-
	56k	1.790	/	-	-

<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110s	3.795	0.812	-	-
	110k	3.075	/	-	-
<i>Neidentificirana 1</i>	21s	2.370	0.365	-	-
	21k	1.890	/	-	-
<i>Neidentificirana 2</i>	32s	3.615	0.983	-	-
	32k	2.890	/	-	-
<i>Neidentificirana 3</i>	96s	1.675	0.274	-	-
	96k	1.595	/	-	-
<i>Neidentificirana 4</i>	117s	5.110	1.097	-	-
	117k	4.035	/	-	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83s	2.485	0.615	-	-
	83k	2.580	/	-	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94s	2.810	0.479	-	-
	94k	2.495	/	-	-
<i>Panadaros acanthifolium</i>	76s	3.330	0.568	-	-
	76k	3.460	/	-	-
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2s	6.760	1.033	3	-
	2k	4.830	/	-	-
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	45s	2.135	0.849	-	-
	45k	2.130	/	-	-
<i>Tridideum misolidum</i>	79s	4.100	0.700	-	-
	79k	3.435	/	-	-
<i>Verongula gigantea</i>	44s	3.920	1.396	-	-
	44k	3.225	/	-	-
<i>Verongula rigida</i>	38s	1.655	0.544	5	-
	38k	1.310	/	5, 2	-
<i>Xestospongia muta</i>	95s	2.890	0.513	-	-
	95k	3.330	/	-	-
<i>Ircina sp.</i>	107s	1.445	0.147	-	-
	107k	1.270	/	-	-
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132s	3.495	0.412	-	-
	132k	2.290	/	-	-

Preglednica 9: Rezultati protibakterijske aktivnosti po redčenju šestih aktivnih vzorcev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000.

s = sveži ekstrakti

k = kuhani ekstrakti

/ = »kuhana serija« ekstraktov ne vsebuje proteinov

MIK = minimalna inhibitorna koncentracija dodane snovi.

Vzorci z inhibicijsko cono označeno z (-) niso imeli protibakterijske aktivnosti.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Redčenje	Količina dodane snovi v testu [mg/ml]	Količina proteinov v testu [mg/ml]	Širina inhibicijske cone (r) [mm] (<i>B. subtilis</i>)	MIK [mg/ml]
<i>Aplysina archeri</i>	40s	1:10	0.3050	0.1032	-	3.050
		1:100	0.03050	0.01032	-	
		1:1000	0.003050	0.001032	-	
<i>Ircinia felix</i>	59s	1:10	0.2860	0.0787	3	0.0787
		1:100	0.02860	0.00787	-	
		1:1000	0.002860	0.000787	-	
	59k	1:10	0.2755	/	-	2.755
		1:100	0.02755	/	-	
		1:1000	0.002755	/	-	
<i>Ircinia felix</i>	93s	1:10	0.2465	0.0695	-	2.465
		1:100	0.02465	0.00695	-	
		1:1000	0.002465	0.000695	-	
<i>Verongula rigida</i>	38s	1:10	0.1655	0.0544	-	1.655
		1:100	0.01655	0.00544	-	
		1:1000	0.001655	0.000544	-	
	38k	1:10	0.1310	/	-	1.310
		1:100	0.01310	/	-	
		1:1000	0.001310	/	-	

4.4 HEMAGLUTINACIJSKA AKTIVNOST

Preglednica 10 prikazuje rezultate hemaglutinacijske aktivnosti ekstraktov iz različnih spužev. Vzorci 40s, 112s, 66s, 5s, 110s, 117s in 2s so pokazali pozitiven rezultat za test hemaglutinacije, zato smo opravili še test redčitev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000.

Preglednica 11 prikazuje rezultate po redčenju omenjenih vzorcev. Po desetkratnem redčenju

je imel vzorec iz spužve Neidentificirana 4 še hemaglutinacijsko aktivnost. Ostali vzorci so jo po redčenju izgubili.

Preglednica 10: Rezultati hemaglutinacijske aktivnosti testnih vzorcev spužev.

- = ni aktivnosti
- + = vzorec povzroča hemaglutinacijo
- s = sveži ekstrakti
- k = kuhani ekstrakti
- / = »kuhana serija« ekstraktov ne vsebuje proteinov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Količina suhe snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Hemaglutinacija (+/-)
<i>Agelas conifera</i>	97s	5.25	1.088	-
	97k	5.01	/	-
<i>Agelas dispar</i>	88s	5.24	0.606	-
	88k	6.04	/	-
<i>Aplysina archeri</i>	40s	6.10	2.064	+
	40k	5.99	/	-
<i>Aplysina lacunosa</i>	112s	8.76	2.806	+
	112k	7.22	/	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	9s	1.17	0.092	-
	9k	0.96	/	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	67s	3.50	0.520	-
	67k	3.66	/	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	103s	6.94	0.552	-
	103k	6.12	/	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48s	2.05	0.234	-
	48k	2.12	/	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66s	2.91	0.504	+
	66k	2.57	/	-
<i>Holopsamma helwigi</i>	5s	5.66	1.248	+
	5k	5.14	/	-
<i>Ircinia campana</i>	70s	5.74	0.986	-
	70k	5.39	/	-
<i>Ircinia felix</i>	59s	5.72	1.574	-
	59k	5.51	/	-
<i>Ircinia felix</i>	93s	4.93	1.390	-
	93k	4.03	/	-

<i>Ircina strobilina</i>	56s	3.88	1.118	-
	56k	3.58	/	-
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110s	7.59	1.624	+
	110k	6.15	/	-
<i>Neidentificirana 1</i>	21s	4.74	0.730	-
	21k	3.78	/	-
<i>Neidentificirana 2</i>	32s	7.23	1.966	-
	32k	5.78	/	-
<i>Neidentificirana 3</i>	96s	3.35	0.548	-
	96k	3.19	/	-
<i>Neidentificirana 4</i>	117s	10.22	2.194	+
	117k	8.07	/	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83s	4.97	1.230	-
	83k	5.16	/	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94s	5.62	0.958	-
	94k	4.99	/	-
<i>Panadaros acanthifouum</i>	76s	6.66	1.136	-
	76k	6.92	/	-
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2s	13.52	2.066	+
	2k	9.66	/	-
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	45s	4.27	1.698	-
	45k	4.26	/	-
<i>Tridideum misolidum</i>	79s	8.20	1.400	-
	79k	6.87	/	-
<i>Verongula gigantea</i>	44s	7.84	2.792	-
	44k	6.45	/	-
<i>Verongula rigida</i>	38s	3.31	1.088	-
	38k	2.62	/	-
<i>Xestospongia muta</i>	95s	5.78	1.026	-
	95k	6.66	/	-
<i>Ircina sp.</i>	107s	2.89	0.294	-
	107k	2.54	/	-
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132s	6.99	0.824	-
	132k	4.58	/	-

Preglednica 11: Rezultati hemaglutinacijske aktivnosti po redčenju sedmih aktivnih vzorcev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000.

- = ni aktivnosti
- + = vzorec povzroča hemaglutinacijo
- s = sveži ekstrakti
- k = kuhani ekstrakti
- / = »kuhana serija« ekstraktov ne vsebuje proteinov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Redčenje	Količina suhe snovi v testu [mg/ml]	Količina proteinov v testu [mg/ml]	Hemaglutinacija (+/-)
<i>Aplysina archeri</i>	40s	1:10	0.610	0.2064	-
		1:100	0.0610	0.02064	-
		1:1000	0.00610	0.002064	-
<i>Aplysina lacunosa</i>	112s	1:10	0.876	0.2806	-
		1:100	0.0876	0.02806	-
		1:1000	0.00876	0.002806	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66s	1:10	0.291	0.0504	-
		1:100	0.0291	0.00504	-
		1:1000	0.00291	0.000504	-
<i>Holopsamma helwigi</i>	5s	1:10	0.566	0.1248	-
		1:100	0.0566	0.01248	-
		1:1000	0.00566	0.001248	-
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110s	1:10	0.759	0.1624	-
		1:100	0.0759	0.01624	-
		1:1000	0.00759	0.001624	-
<i>Neidentificirana 4</i>	117s	1:10	1.022	0.2194	+
		1:100	0.1022	0.02194	-
		1:1000	0.01022	0.002194	-
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2s	1:10	1.352	0.2066	-
		1:100	0.1352	0.02066	-
		1:1000	0.01352	0.002.066	-

4.5 ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST

Nekateri vzorci spužev so delovali na encim acetilholinesterazo inhibitorno, nekateri pa ne. Stopnja inhibicije je prikazana v **preglednici 12**. Kontrolna vrednost je bila 14 mOD/min, vrednost popolne inhibicije je bila 0-1 mOD/min. Zaradi močne inhibicije encima

acetilholinesteraze smo opravili nadaljnja redčenje vzorcev 97s, 97k, 40s, 40k, 112s, 112k, 32s, 32k, 44s, ter 44k. Redčili smo v razmerju 1:10. Te rezultate prikazuje **preglednica 13**. Rezultati redčitev niso več signifikantni, ker so vse stopnje inhibicije minimalne oz. inhibicije sploh ni.

Preglednica 12: Rezultati delovanja vzorcev testiranih spužev na encim acetilholinesterazo. Prikazane so stopnje inhibicije acetilholinesterazne aktivnosti glede na kontrolo (14 mOD/min).

s = sveži ekstrakti

k = kuhani ekstrakti

/ = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Količina suhe snovi v testu [mg/ml]	Količina proteinov v testu [mg/ml]	Inhibicija AChE (%)
<i>Agelas conifera</i>	97s	2.386	0.50	50
	97k	2.277	/	57.14
<i>Agelas dispar</i>	88s	2.382	0.28	7.14
	88k	2.745	/	21.43
<i>Aplysina archeri</i>	40s	2.773	0.94	92.86
	40k	2.723	/	85.72
<i>Aplysina lacunosa</i>	112s	3.982	1.28	92.86
	112k	3.282	/	78.58
<i>Callyspongia plicifera</i>	9s	0.532	0.04	0
	9k	0.436	/	0
<i>Callyspongia plicifera</i>	67s	1.591	0.24	0
	67k	1.664	/	0
<i>Callyspongia plicifera</i>	103s	3.155	0.25	0
	103k	2.782	/	0
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48s	0.932	0.12	0
	48k	0.964	/	0
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66s	1.323	0.23	0
	66k	1.168	/	0
<i>Holopsamma helwigi</i>	5s	2.573	0.57	0
	5k	2.336	/	0
<i>Ircinia campana</i>	70s	2.609	0.45	0
	70k	2.450	/	0
<i>Ircinia felix</i>	59s	2.600	0.72	0
	59k	2.505	/	21.43
<i>Ircinia felix</i>	93s	2.241	0.63	28.57

	93k	1.832	/	14.29
<i>Ircina strobilina</i>	56s	1.764	0.52	0
	56k	1.627	/	0
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110s	3.450	0.74	7.14
	110k	2.795	/	7.14
<i>Neidenti. spužva 1</i>	21s	2.155	0.33	28.57
	21k	1.718	/	28.57
<i>Neidenti. spužva 2</i>	32s	3.286	0.89	71.43
	32k	2.627	/	64.29
<i>Neidenti. spužva 3</i>	96s	1.523	0.25	0
	96k	1.450	/	0
<i>Neidenti. spužva 4</i>	117s	4.645	0.98	21.43
	117k	3.668	/	21.43
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83s	2.259	0.56	0
	83k	2.345	/	0
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94s	2.555	0.44	35.71
	94k	2.268	/	0
<i>Panadaros acanthifolium</i>	76s	3.027	0.52	0
	76k	3.145	/	0
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2s	6.145	0.94	21.43
	2k	4.391	/	14.29
<i>Spheciospongia vesparium</i>	45s	1.941	0.77	0
	45k	1.936	/	14.29
<i>Tridideum misolidum</i>	79s	3.727	0.64	0
	79k	3.123	/	0
<i>Verongula gigantea</i>	44s	3.564	1.27	64.29
	44k	2.932	/	35.71
<i>Verongula rigida</i>	38s	1.505	0.49	7.14
	38k	1.191	/	0
<i>Xestospongia muta</i>	95s	2.627	0.47	0
	95k	3.027	/	0
<i>Ircina sp.</i>	107s	1.314	0.13	0
	107k	1.155	/	0
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132s	3.177	0.37	0
	132k	2.082	/	0

Preglednica 13: Rezultati encimskega testa z acetilholinesterazo (AChE) po redčenju desetih vzorcev spužev v razmerju 1:10. Stopnja inhibicije AChE aktivnosti je prikazana glede na kontrolo.

s = sveži ekstrakti

k = kuhani ekstrakti

/ = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Redčenje	Količina suhe snovi v testu (mg/ml)	Količina proteinov v testu (mg/ml)	Inhibicija AChE (%)
<i>Agelas conifera</i>	97s	1:10	0.2386	0.0500	0
	97k	1:10	0.2277	/	0
<i>Aplysina archeri</i>	40s	1:10	0.2773	0.094	21.43
	40k	1:10	0.2723	/	28.57
<i>Aplysina lacunosa</i>	112s	1:10	0.3982	0.128	14.29
	112k	1:10	0.3282	/	42.32
<i>Neidentificirana 2</i>	32s	1:10	0.3286	0.089	28.57
	32k	1:10	0.2627	/	0
<i>Verongula gigantea</i>	44s	1:10	0.3564	0.127	14.29
	44k	1:10	0.2932	/	7.14

4.6 INHIBICIJA PROTEINSKE FOSFATAZE 1

Opravili smo samo en poskus. Vzorci v **preglednici 14** so proteinsko fosfatazo 1 inhibirali, vzorci v **preglednici 15** pa so jo aktivirali. Poleg rezultatov v številkah smo na inhibicijo oz. aktivacijo sklepali tudi iz barve vzorca po opravljenem poskusu. V **preglednici 16** so navedeni vzorci, ki so glede na rezultate v številkah delovali nekoliko aktivacijsko na proteinsko fosfatazo 1, vendar so bili po poskusu tako obarvani (lahko, da je to bila lastna barva vzorca), da po barvi ni bilo mogoče sklepati ali je res šlo za aktivacijo ali za inhibicijo. Nadaljnih redčenj nismo opravljali.

Preglednica 14: Rezultati inhibitornega delovanja vzorcev testnih spužev na proteinsko fosfatazo 1. Stopnja inhibicije PP1 aktivnosti je prikazana glede na kontrolo.

s = sveži ekstrakti

k = kuhani ekstrakti

/ = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Količina suhe snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Inhibicija PP1 (%)
<i>Agelas conifera</i>	97k	0.248	/	29.55
<i>Agelas dispar</i>	88k	0.299	/	13.64
<i>Callyspongia plicifera</i>	9s	0.058	0.005	22.73
	9k	0.048	/	43.94
<i>Callyspongia plicifera</i>	67k	0.181	/	32.58
<i>Callyspongia plicifera</i>	103k	0.303	/	2.28
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48k	0.105	/	34.85
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66k	0.127	/	20.46
<i>Neidentificirana 1</i>	21k	0.187	/	32.58
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94k	0.247	/	10.61
<i>Xestospongia muta</i>	95k	0.330	/	12.88
<i>Ircina sp.</i>	107k	0.126	/	18.19

Preglednica 15: Rezultati delovanja vzorcev testnih spužev na proteinsko fosfatazo 1. Prikazana je aktivacija delovanja PP1. Stopnja povečanja PP1 aktivnosti je prikazana glede na kontrolo.

s = sveži ekstrakti

k = kuhani ekstrakti

/ = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Količina suhe snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Aktivacija PP1 (x-krat)
<i>Agelas conifera</i>	97s	0.260	0.054	4.90

<i>Agelas dispar</i>	88s	0.259	0.030	3.47
<i>Aplysina archeri</i>	40s	0.302	0.102	6.29
<i>Aplysina lacunosa</i>	112s	0.434	0.139	2.57
<i>Callyspongia plicifera</i>	67s	0.173	0.026	2.44
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48s	0.101	0.012	1.39
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66s	0.144	0.025	2.83
<i>Holopsamma helwigi</i>	5s	0.280	0.062	19.03
<i>Ircinia campana</i>	70s	0.284	0.049	5.33
	70k	0.267	/	1.32
<i>Ircinia felix</i>	59s	0.283	0.078	25.26
	59k	0.273	/	2.19
<i>Ircinia felix</i>	93s	0.244	0.070	12.59
	93k	0.200	/	1.54
<i>Ircinia strobilina</i>	56s	0.192	0.055	15.69
	56k	0.177	/	1.39
<i>Neidentificirana 1</i>	21s	0.235	0.036	5.15
<i>Neidentificirana 2</i>	32s	0.358	0.097	3.97
<i>Neidentificirana 4</i>	117s	0.506	0.109	10.26
	117k	0.400	/	1.54
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83s	0.246	0.061	8.08
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94s	0.278	0.047	3.36

<i>Verongula gigantea</i>	44s	0.388	0.138	15.08
	44k	0.319	/	1.90
<i>Verongula rigida</i>	38s	0.164	0.054	12.70
	38k	0.130	/	1.87
<i>Xestospongia muta</i>	95s	0.286	0.051	2.93
<i>Ircina sp.</i>	107s	0.143	0.015	4.48
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132s	0.346	0.041	13.96
	132k	0.227	/	1.51

Preglednica 16: Rezultati delovanja vzorcev testnih spužev na proteinsko fosfatazo 1. Prikazana je majhna aktivacija delovanja PP1, vendar pri poskusu barva vzorca ni potrdila ne aktivacije ne inhibicije PP1. Stopnja aktivnosti je prikazana glede na kontrolo.

s = sveži ekstrakti

k = kuhani ekstrakti

/ = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Količina suhe snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Aktivacija PP1 (x-krat)
<i>Aplysina archeri</i>	40k	0.297	/	1.06
<i>Aplysina lacunosa</i>	112k	0.357	/	1.28
<i>Callyspongia plicifera</i>	103s	0.344	0.027	1.33
<i>Holopsamma helwigi</i>	5k	0.254	/	1.15
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110s	0.378	0.080	2.05
	110k	0.304	/	1.04
<i>Neidentificirana 2</i>	32k	0.286	/	1.43
<i>Neidentificirana 3</i>	96s	0.166	0.027	1.93
	96k	0.158	/	1.33

<i>Neofibularia nolitangere</i>	83k	0.255	/	1.02
<i>Panadaros acanthifolium</i>	76s	0.330	0.056	2.19
	76k	0.343	/	1.57
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2s	0.670	0.102	3.32
	2k	0.478	/	1.11
<i>Sphaciospongia vesparium</i>	45s	0.211	0.084	3.77
	45k	0.211	/	3.30
<i>Tridideum misolidum</i>	79s	0.406	0.069	1.33
	79k	0.340	/	1.11

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Morske spužve vsebujejo veliko edinstvenih spojin, ki so lahko zelo uporabne v medicini, farmacevtski industriji, kozmetični industriji, v ladjedelništvu in še kje. Te spojine so kemijsko raznolike in imajo vrsto bioloških aktivnosti kot so protimikrobno delovanje in citotoksičnost (npr. za rakave celice) terpenov (Fu in sod., 1998), protiglivna aktivnost bromopirolovih alkaloidov (Cafieri in sod., 1998b), protivirusno delovanje derivatov aminokislin (Gunasekera in sod., 1992), encimsko inhibitorna aktivnost terpenoidov (Nakao in sod., 2002, Gray in sod., 2006), hemaglutinacijska aktivnost lektinov (Miarons in Fresno, 2000) ter protivegetativna aktivnost piridinskih alkaloidov (Wang in sod., 1996).

Najbolj raziskujejo spojine, ki bi lahko bile uporabljene kot zdravila. Ni nujno, da bo spojina sama zdravilo, lahko so to njeni derivati ali pa sintetični produkti, podobni naravni spojini. Dandanes velika farmacevtska podjetja ne kažejo velikega zanimanja za odkrivanje in raziskovanje spojin iz morskih organizmov (prednost imajo spojine pridobljene s kombinatorno kemijo), s tem se predvsem ukvarjajo raziskovalci na fakultetah in v manjših laboratorijih. Pri pridobivanju novih zdravil iz morja sta pomembni dve stvari: prva je poznavanje zaporedja človeškega genoma, kar omogoča delovanje na nove tarče in diagnozo bolezni, druga stvar pa je odkrivanje zaporedja genomov morskih organizmov, kar bo odkrilo nove biokemijske metabolne poti, po katerih nastaja zelo raznolika in velika skupina do zdaj nepoznanih spojin. Gene morskih organizmov bodo klonirali, kombinirani pa bodo izražali nove lastnosti oz. bodo proizvajali nove molekule (Fenical, 2006). Lahko trdimo, da so naravne spojine dobljene iz npr. morskih spužev bolj učinkovite kakor spojine pridobljene s kombinatorno kemijo. Pri raziskovanju delovanja spojin iz morskih organizmov je največji izziv znanstvenikom določiti ter razjasniti na katere tarče delujejo te biološko aktivne in visoko selektivne spojine. Šele potem se lahko začnejo klinične raziskave, ki pogosto dajo uporabne rezultate (Müller in sod., 2004). Dobre rezultate v kliničnih testih kaže protitumorski metabolit diskodermolid iz morske spužve *Discodermia dissoluta*. Velike težave pa nastajajo pri pridobivanju zadostne količine določene zdravilne učinkovine iz morjih organizmov, ker gre za zelo kompleksne molekule, katerih organska sinteza je zahtevna ali pa celo nemogoča. Leta 2005 pa so ameriški in britanski znanstveniki našli

možno rešitev tega problema. Z rekombinantno DNA tehnologijo jim je uspelo pridobiti prvi »morski« metabolit, protitumorski ciklični peptid patelamid iz tropskega plaščarja *Lissoclinum patella*. Njihov postopek vključuje izolacijo DNA iz plaščarja in njegovih endosimbiontov, identifikacijo genov, udeleženih v biosintetski poti patelamida, njihovo kloniranje v bakterijo *Escherichia coli*, gojenje bakterij in izolacijo patelamida. Opisana tehnologija je lahko zamudna v pripravljalnih fazah, vendar nam rezultat – bakterijska celica z vključenimi geni za sintezo sekundarnega metabolita – omogoča njegovo trajno pridobivanje v neomejenih količinah (Sepčić, 2008).

Zaradi velike količine zanimivih spojin v morskih spužvah smo v tej nalogi naredili nekaj testov, da bi odkrili kakšne nove biološko aktivne snovi. Delali smo z vodnimi ekstrakti. Testi, ki smo jih naredili, so bili hemolitični, protibakterijski, hemaglutinacijski, test inhibicije encima acetilholinesteraze ter test inhibicije proteinske fosfataze 1.

Rezultati hemolitičnega testa, prikazani v **preglednici 7**, so pokazali, da imajo le trije vodni ekstrakti hemolitično aktivnost. Močno hemolitičen je bil vzorec spužve *Panadaros acanthifolium*, druga dva vzorca iz spužev Neidentificirana 4 ter *Pseudoceratina crassa* sta imela šibkejšo hemolitično aktivnost. Pri vseh treh vzorcih spužev so bili hemolitično aktivni le »sveži« ekstrakti, »kuhani« pa ne. Iz tega lahko sklepamo, da je hemolitično aktivna snov protein. Rezultati drugih avtorjev ne omenjajo hemolitično delovanje ekstraktov iz morskih spužev. O aktivnosti spužve *Panadaros acanthifolium* v literaturi ni nobenih podatkov, za vrsto *Pseudoceratina crassa* pa je navedena kemijska obramba pred plenilskimi ribami (Ciminiello in sod., 1995).

Pri protibakterijskem testu so imeli zmerno učinkovitost »sveži« in »kuhani« vodni vzorci spužev *Aplysina archeri* (samo »sveži« vzorec), *Ircinia felix* (59, 93s) in *Verongula rigida*. Protibakterijsko so delovali le proti po Gramu pozitivnemu sevu *Bacillus subtilis*. Po redčenju 1:10 je zmerno protibakterijsko aktivnost ohranil le »svež« vzorec *Ircinia felix* (59), ki pa je po redčenju 1:100 izginila. Noben vzorec ni deloval proti po Gramu negativnemu sevu *Escherichia coli*. Rezultati so prikazani v **preglednicah 8** in **9**. V literaturi je večkrat omenjeno protimikrobno delovanje vrste *Ircinia felix*; aktivne snovi so tiobismetan, metil izocijanid, metil izotiocijanat (Duque in sod., 2001, Pawlik in sod., 2002), furanosesterterpeni

strobilin, feliksinin, variabilin (Martinez in sod., 1997a, Martinez in sod., 1997b). Pri vseh omenjenih vrstah so aktivne snovi bile prisotne v metanolnih ekstraktih. Tudi pri drugih predstavnikih rodu *Ircinia* je veliko primerov protimikrobnega delovanja in tudi tu gre za organske ekstrakte. Izolirali so hidrokinone, ki so delovali proti po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam ter citotoksično (Mihopoulos in sod., 1999) ter že našteje aktivne spojine iz spužve *Ircinia felix*. O aktivnosti ekstraktov vrste *Verongula rigida* zaenkrat ni objavljenih poročil.

Iz literature je razvidno je, da protimikrobne snovi bolj pogosto vsebujejo organski ekstrakti (Rao in sod., 2004, Keifer in sod., 1991, Cafieri in sod., 1998b, Newbold in sod., 1999, D'Ambrosio in sod., 1984, Betancourt-Lozano in sod., 1998, Ely in sod., 2004, Mckee in sod., 1987). Te snovi so različni alkaloidi, bromopirolovi metaboliti, derivati bromotirozina, ki spužvam rabijo za obrambo pred škodljivimi mikrobi.

Hemaglutinacijsko aktivnost je imelo 7 vodnih vzorcev (**preglednica 10**) iz spužev *Aplysina archeri*, *Aplysina lacunosa*, *Callyspongia vaginalis*, *Holopsamma helwigi*, *Lissodendrorhynchus colombiensis*, Neidentificirana 4 in *Pseudoceratina crassa*. Vsi so bili »sveži« vzorci. Po redčenju 1:10 so vsi vzorci, razen vzorca Neidentificirana 4, izgubili aktivnost. Po redčenju 1:100 pa nobeden od vzorcev ne ostane aktiven. Redčenja prikazuje **preglednica 11**. V literaturi je omenjena hemaglutinacijska aktivnost lektinov v vodnem vzorcu vrst *Aplysina archeri*, *Aplysina lawnosa* ter *Aplysina cauliformis* (Miarons in Fresno, 2000). Kaže, da ta vrsta spužve pogosto vsebuje vodotopne snovi, ki povzročajo hemaglutinacijo. Aglutinacija bi bila lahko posledica glikoproteinov lektinov. Pri ostalih vrstah, ki smo jim določili hemaglutinacijsko aktivnost, se ta v literaturi ne omenja. Omenjajo se druge aktivnosti. Pri *Callyspongia vaginalis* organski ekstrakt deluje citotoksično na človeške rakave celice, inhibira encim α -glukozidazo, inhibira obraščanje spužve ter oploditev pri morskih zvezdah (Layne in Tinto, 2006). Za vrsti *Holopsamma helwigi* in *Lissodendrorhynchus colombiensis* ni podatkov v literaturi. Pri vrsti *Pseudoceratina crassa* pa je omenjena kemijska obramba pred plenilskimi ribami.

V prvem encimskem testu so močno inhibicijo encima acetilholinesteraza (AChE) povzročili tako »sveži« kakor »kuhani« vodni vzorci spužev *Agelas conifera*, *Aplysina archeri*, *Aplysina lacunosa*, Neidentificirana 2 in *Verongula gigantea*. Predvsem »sveži« vzorci spužev iz rodu

Aplysina so inhibirali encim AChE več kot 90% . Ti rezultati so prikazani v **preglednici 12**. Po desetkratnem redčenju teh najbolj inhibitornih vzorcev se je inhibicija zmanjšala oz. je izginila. Redčenja so prikazana v **preglednici 13**. V literaturi ni zaslediti podatka o inhibiciji encima AChE z ekstrakti testiranih spužev, imajo pa ekstrakti druge aktivnosti.

Agelas conifera ima veliko bioloških aktivnosti kot so obramba pred plenilskimi ribami, vpliv na vedenje korale *Madracis mirabilis*, protimikrobna, protivirusna ter protiglivična aktivnost (Richelle-Maurer in sod., 2003, Keifer in sod., 1991), zmanjšanje napetostno odvisnega vdora Ca²⁺ v PC12 celice (Bickmeyer, 2005).

Aplysina archeri deluje proti glivi *Cryptococcus neoformans* (Ciminiello in sod., 1996), inhibira rast virusa mačje levkemije (Gunasekera in sod., 1992), povzroča hemaglutinacijo (Miarons in Fresno, 2000) in deluje antihistaminsko na ileumu morskega prašička (Ciminiello in sod., 2001).

Verongula gigantea, njen organski ekstrakt deluje kot antagonist histamina-H3 (Mierzwa in sod., 1994).

Encim AChE hidrolizira nevrotransmitter acetilholin v sinaptičnih špranjah. Če pride do inhibicije delovanja tega encima, pa se acetilholin ne razgradi, ampak ostane vezan na receptorje na postsinaptični membrani in to povzroči konstantno proženje postsinaptičnih potencialov. Snovi, ki inhibirajo delovanje encima AChE, so nevrotoksini.

V drugem encimskem testu nas je zanimalo delovanje vodnih vzorcev spužev na encim proteinsko fosfatazo 1 (PP1). Fosfataze so encimi, ki odcepljajo fosfatno skupino z drugih molekul (encimov) in jih s tem aktivirajo ali pa inhibirajo. Nasprotno delovanje imajo kinaze, ki vežejo fosfatno skupino na druge molekule.

Naši vzorci so encim PP1 inhibirali in aktivirali. V **preglednici 14** so prikazani vzorci, ki so encim PP1 inhibirali, vendar inhibicija ni bila zelo močna. V **preglednici 15** so prikazani vzorci, ki so encim aktivirali; »sveži« vzorci vrst *Holopsamma helwigi*, *Ircinia felix*, *Ircinia strobilina* in *Verongula gigantea* so povzročili vsaj 15-kratno aktivacijo. V **preglednici 16** so vzorci in njihove aktivnosti, za katere pa zaradi drugačne obarvanosti nismo mogli potrditi ali je res šlo za majhno aktivacijo ali pa za inhibicijo. Redčenj nismo opravljali zaradi pomanjkanja encima.

V literaturi je navedena spužva *Ircinia fasciculata*, ki je inhibirala in aktivirala kinaze ter aktivirala fosfolipaze C, D (Zhang in sod., 2005), vendar je šlo za organski ekstrakt.

Večkratno aktivnost so imeli vodni vzorci *Aplysina archeri* (protibakterijsko delovanje, hemaglutinacija, inhibicija encima AChE, inhibicija encima PP1), več vzorcev je bilo aktivnih v 2-3 testih (*Aplysina lacunosa*, *Holopsamma helwigi*, *Ircinia felix* (59), Neidentificirana 4, *Pseudoceratina crassa*, *Verongula gigantea*). Pri hemaglutinacijskem testu in pri prvem encimskem testu sta pozitivne rezultate dali 2 vrsti rodu *Aplysina*. Pri protimikrobnem testu sta protimikrobno delovali 2 vrsti rodu *Ircinia*. To kaže, da evolucijsko sorodne spužve večkrat kažejo enake biološke aktivnosti in verjetno vsebujejo enake biološko aktivne snovi. Vodni ekstrakti testiranih tropskih spužev vsebujejo različne biološko aktivne snovi, vendar manj kot organski vzorci. Spužve, ki so sesilni organizmi, potrebujejo te snovi za obrambo pred patogenimi mikrobi, virusi, različnimi plenilci ter proti obraščanju njihove površine.

5.2 SKLEPI

V našem diplomskem delu smo testirali biološko aktivnost vodnih vzorcev 30 tropskih spužev. Uporabili smo pet testov. Hemolitično so delovali 3 vzorci iz spužev *Panadaros acanthifolium*, Neidentificirana 4 ter *Pseudoceratina crassa*. Protibakterijsko so delovali vzorci iz 4 spužev: *Aplysina archeri*, *Ircinia felix* (59, 93s) in *Verongula rigida*. Aktivnost je bila zmerna. Po 100-kratnem redčenju ni noben ekstrakt več bil aktiven. Hemaglutinacijsko aktivnost je pokazalo 7 vzorcev, vendar po 100-kratnem redčenju le-te več ni bilo. Encim acetilholinesterazo so inhibirali vzorci iz 5 spužev, po 10-kratnem redčenju se je inhibicija bistveno zmanjšala. Test inhibicije proteinske fosfataze 1 je pokazal, da so nekateri vzorci encim nekoliko inhibirali, dosti močnejše delovanje pa je bilo pri aktivaciji encima PP1, ki je bila 25-kratna pri svežem vzorcu spužve *Ircinia felix* (59). Tukaj redčenja nismo naredili.

Najmanj pogosta je hemolitična aktivnost. V literaturi nismo zasledili podatkov o hemolitični aktivnosti, zato je predvsem za vrsto *Panadaros acanthifolium*, ki je imela najmočnejšo aktivnost, to novost. Pri protibakterijskem testu je novost protimikrobna aktivnosti vrst *Aplysina archeri* ter *Verongula rigida*. Hemaglutinacijsko je delovalo 7 vzorcev različnih spužev. Za 5 vzorcev je ta aktivnost novost, za 2 vzorca iz rodu *Aplysina* (*A. archeri*, *A. lacunosa*) pa ne. V literaturi nismo zasledili podatkov o delovanju ekstraktov iz testiranih morskih spužev na encim acetilholinesterazo, zato je opažena inhibicija tega encima novost. Pri drugem encimskem testu (kislja fosfataza PP1) se je pojavila tako inhibicija kot aktivacija.

V literaturi je omenjeno aktivacijsko delovanje organskega ekstrakta spužve *Ircinia fasciculata* na fosfataze. Tudi naš vzorec z najizrazitejšim aktivacijskim delovanjem je bil iz tega rodu, *Ircinia felix* (59).

Zaradi večjih pozitivnih in izrazitih rezultatov so za nadaljnje raziskave zanimivi vzorci vrst *Aplysina archeri* in *Ircinia felix* (59).

6 POVZETEK

Iskali smo biološko aktivne snovi v vodnih vzorcih 30 tropskih spužev. 28 spužev je bilo iz otoka Curacao v Nizozemskih Antilih v Karibskem morju, 2 spužvi pa sta bili nabrani na otoku Lizard, ki je del koralnega grebena ob obali Queenslanda v Avstraliji. Opravili smo pet testov: hemolitični, protibakterijski, hemaglutinacijski ter dva encimska testa: inhibicijo acetilholinesteraze in proteinske fosfataze 1. Uporabili smo nekuhane in kuhane vzorce. Rezultati so pokazali, da so vodni vzorci nekaterih spužev vsebovali biološko aktivne snovi, večkrat po več le-teh. Glede na literaturo smo naleteli na nekaj novosti. Je pa res, da vodni vzorci vsebujejo manj biološko aktivnih snovi kot organski. Spužve vsebujejo biološko aktivne snovi, da jim služijo predvsem kot obramba pred mikroorganizmi in plenilci, saj so sesilne živali in to je ena od prilagoditev na takšno življenje.

7 VIRI

Anand T. P., Bhat A. W., Shouche Y. S., Roy U., Siddharth J., Sarma S. P. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*, 161: 252-262

Arreguin R., Arreguin B., Soriano-García M., Hernández-Arana A., Rodríguez-Romero A. 1993. Isolation and characterization of a protease from the marine sponge *Sphaciospongia vesparia*. *FEBS Letters*, 320, 3: 235-238

Assmann M., Lychte E., Pawlik J. R., Köck M. 2000. Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. *Marine Ecology Progress Series*, 207: 255–262

Assmann M., Köck M. 2002. Monobromoisophakellin, a New Bromopyrrole Alkaloid from the Caribbean Sponge *Agelas* sp. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c: 153-156

Ausió J., Van Veghel M. L. J., Gomez R., Barreda D. 1997. The Sperm Nuclear Basic Proteins (SNBPs) of the Sponge *Neofibularia nolitangere*: Implications for the Molecular Evolution of SNBPs. *Journal of Molecular Evolution*, 45: 91-96

Aydoğmuş Z., Ersoy N., Imre S. 1999. Chemical Investigation of the Sponge *Verongia aerophoba*. *Turkish Journal of Chemistry*, 23: 339-344

Bakkestuen A. K., Gundersen L.-L., Petersen D., Utenova B. T., Vik A. 2005. Synthesis and antimycobacterial activity of agelasine E and analogs. *The Royal Society of Chemistry. Org. Biomol. Chem.*, 3: 1025-1033

Betancourt-Lozano M., Gonzáles-Farías F., Gonzáles-Acosta B., Garcia-Gasca A., Bastida-Zavala J. R. 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 223: 1-18

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

Bickmeyer U., Assmann M., Köck M., Schütt C. 2005. A secondary metabolite, 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid, from marine sponges of the genus *Agelas* alters cellular calcium signals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 423-427

Brauers G., Ebel R., Edrada R., Wray V., Berg A., Gräfe U., Proksch P. 2001. Hortein, a New Natural Product from the Fungus *Hortaea werneckii* Associated with the Sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Natural Products*, 64, 5: 651-652

Cafieri F., Fattorusso E., Mangoni A., Tagliatela-Scafati O. 1996b. Dispacamides, Anti-Histamine Alkaloids from Caribbean *Agelas* Sponges. *Tetrahedron Letters*, 37, 20: 3587-3590

Cafieri F., Carnuccio R., Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O., Vallefouco T. 1997. Anti-Histaminic Activity of Bromopyrrole Alkaloids Isolated from Caribbean *Agelas* Sponges. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7, 17: 2283-2288

Cafieri F., Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O. 1998a. Novel Betaines from the Marine Sponge *Agelas dispar*. *Journal of Natural Products*, 61, 9: 1171-1173

Cafieri F., Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O. 1998b. Novel Bromopyrrole Alkaloids from the Sponge *Agelas dispar*. *Journal of Natural Products*, 61, 1: 122 – 125

Campos M., Mothes B., Eckert R., van Soest R. W. M. 2005. *Haplosclerida* (Porifera: Demospongiae) from the coast of Maranhão State, Brazil, Southwestern Atlantic. *Zootaxa*, 963: 1-22

Cao S., Foster C., Brisson M., Lazo J. S., Kingston D. G. I. 2005. Halenaquinone and xestoquinone derivatives, inhibitors of Cdc25B phosphatase from a Xestospongia sp. *Science direct*, 13: 999-1003

Capon R. J., Ford J., Lacey E., Gill J. H., Heiland K., Friedel T. 2002. Phoriospongins A and B: Two New Nematocidal Depsipeptides from the Australian Marine Sponges *Phoriospongia* sp. and *Callyspongia bilamellata*. *Journal of Natural Products*, 65, 3: 358-363

Chanas B., Pawlik J. R., Lindelb T., Fenicalb W. 1996. Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208: 185-196

Chellosi E., Milanese M., Milano A., Pronzato R., Riccardi G. 2004. Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 309: 21-33

Chevallier C., Bugni T. S., Feng X., Harper M. K., Orendt A. M., Ireland C. M. 2006. Tedanolide C: A Potent New 18-Membered-Ring Cytotoxic Macrolide Isolated from the Papua New Guinea Marine Sponge *Ircinia* sp. *Journal of Organic Chemistry*, 71: 2510-2513

Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S. 1997. Chemistry of Verongida Sponges VIII. - Bromocompounds from the Mediterranean Sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Tetrahedron*, 53, 18: 6565-6572

Ciminiello P., Fattorusso E., Magno S. 1994. Chemistry of *Verongida* sponges, III. Constituents of a Caribbean *Verongula* sp. *Journal of Natural Products*, 57, 11: 1564-1569

Ciminiello P., Fattorusso E., Magno S. 1995. Chemistry of *Verongida* sponges, IV. Comparison of the secondary metabolite composition of several specimens of *Pseudoceratina crassa*. *Journal of Natural Products*, 58, 5: 689-696

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Magno S. 1996. Chemistry of *Verongida* Sponges. VII- Bromocompounds from the Caribbean Sponge *Aplysina archeri*. *Tetrahedron*, 52, 29: 9863-9868

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Magno S., Pansini M. 1999. Chemistry of *Verongida* Sponges. 9.1 Secondary Metabolite Composition of the Caribbean Sponge *Aplysina cauliformis*. *Journal of Natural Products*, 62, 4: 590 – 593

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Magno S., Pansini M. 2000. Chemistry of *Verongida* Sponges. 10.1 Secondary Metabolite Composition of the Caribbean Sponge *Verongula gigantea*. *Journal of Natural Products*, 63, 2: 263-266

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Magno S. 2001. Archerine, a Novel Anti-Histaminic Bromotyrosine-Derived Compound from the Caribbean Marine Sponge *Aplysina archeri*. *European Journal of Organic Chemistry*, 55-60

Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A. 1994. The stereochemistry of crasserides. *Journal of Natural Products*, 57, 12: 1726-1730

Costantino V., Fattorusso E., Imperatore C., Mangoni A. 2005. Vesparioside from the Marine Sponge *Sphaciospongia vesparia*, the First Diglycosylceramide with a Pentose Sugar Residue. *European Journal of Organic Chemistry*, 368-373

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, 1: 73-78

D'Ambrosio M., Guerriero A., Pietra F. 1984. 168. Novel, Racemic or Nearly-Racemic Antibacterial Bromo- and Chloroquinols and γ -Lactams of the Verongiaquinol and the Cavernicolin Type from the Marine Sponge *Aplysina* (= *Verongia*) *cavernicola*. *Helvetica Chimica Acta*, 67: 1484- 1492

Duque C., Bonilaa A., Bautista E., Zea S. 2001. Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 459-467

Ely R., Supriya T., Nail C. G. 2004. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 309: 121-127

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

Encarnación-Dimayuga R., Ramirez M. R., Luna-Herrera J. 2003. Aerothionin, a Bromotyrosine Derivative with Antimycobacterial Activity from the Marine Sponge *Aplysina gerardogreeni* (Demospongia). *Pharmaceutical Biology*, 41, 5: 384-387

Epifanio R. de A., Gabriel R., Martins D. L., Muricy G. 1999. The sesterterpen variabilin as a fish-predation deterrent in the Western Atlantic sponge *Ircinia Strobilina*. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 10: 2247-2254

Evan T., Rudi A., Ilan M., Kashman Y. 2001. Aplyzanzine A, a New Dibromotyrosine Derivative from a *Verongida* Sponge. *Journal of Natural Products*, 64, 2: 226-227

Fattorusso E., Minale L., Sodano G. 1970. Aeroplysinin-I, a New Bromo-compound from *Aplysina aerophoba*. *Chemical Communications*, 664: 751-752

Fenical W. 2006. Marine Pharmaceuticals, Past, Present, and Future. *Oceanography*, 19, 2: 110-119

Fromont J., Kerr S., Kerr R., Riddle M., Murphy P. 1994. Chemotaxonomic Relationships Within, and Comparisons Between, the Orders Haplosclerida and Petrosida (Porifera: Demospongiae) using Sterol Complements. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22, 7: 735-752

Fu X., Schmitz F. J., Taneer R. S., Kelly-Borges M. 1998. Agelasines H and I, 9-Methyladenine-Containing Diterpenoids from an *Agelas* Sponge. *Journal of Natural Products*, 61, 4: 548-550

Gray C. A., de Lira S. P., Silva M., Pimenta E. F., Thiemann O. H., Oliva G., Hajdu E., Andersen R. J., Berlinck R. G. S. 2006. Sulfated Meroterpenoids from the Brazilian Sponge *Callyspongia* sp. Are Inhibitors of the Antileishmaniasis Target Adenosine Phosphoribosyl Transferase. *Journal of organic chemistry*, 71, 23: 8685-8690

Gunasekera M., Gunasekera S. P. 1989. Dihydroxyaerolithonin and aerolithonin 1. Two brominated tyrosine metabolites from the deep water marine sponge *Verongula rigida*. . *Journal of Natural Products*, 52, 4: 753-756

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, 4: 509-512

Gunasekera S. P., Sennett S. H., Kelly-Borges M. 1994. Ophirapstanol trisulfate, a new biologically active steroid sulfate from the deep water marine sponge *Topsentia ophiraphidites*. *Journal of Natural Products*, 57, 12: 1751-1754

Ishibashi M., Zeng C.-M., Kobayashi J. 1993. Keruffaride: structure revision and isolation from plural genera of Okinawan marine sponges. *Journal of Natural Products*, 56, 10: 1856-1860

Issa H. H., Tanaka J., Higa T. 2003. New Cytotoxic Furanosesterterpenes from an Okinawan Marine Sponge, *Ircinia* sp. *Journal of Natural Products*, 66, 2: 251-254

Kakimi K., Guidotti L. G., Koezuka Y., Chisari F. V. 2000. Natural Killer T Cell Activation Inhibits Hepatitis B Virus Replication In Vivo. *Journal of Experimental medicine*, 192, 7: 921-930

Kaye H. R., Reiswig H. M. 1985. Histocompatibility responses in *Verongia* species (*Demospongiae*): implications of immunological studies. *The Biological Bulletin*, 168: 183-188

Keifer P. A., Schwartz R. E., Koker M. E. S., Hughes R. G. Jr., Rittschof D., Rinehart K. L. 1991. Bioactive Bromopyrrole Metabolites from the Caribbean Sponge *Agelas conifera*. *Journal of Organic Chemistry*, 56, 9: 2965-2975

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

Kijjoa A., Bessa J., Wattanadilok R., Sawangwong P., Nascimento A. S. J., Pedro M., Silva A. M. S., Eaton G., van Soest R., Herz W. 2005. Dibromotyrosine Derivatives, a Maleimide, Aplysamine-2 and Other Constituents of the Marine Sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 60b: 904-908

Kobayashi M., Kitagawa I. 1999. Marine spongean cytotoxins. *Journal of Natural Toxins*, 8, 2: 249-258

Kokke W. C. M. C., Tarchini C., Stierle D. B., Djerassi C. 1979. Isolation, Structure Elucidation, and Partial Synthesis of Xestosterol, a Biosynthetically Significant Sterol from the Sponge *Xestospongia muta*. *Journal of Organic Chemistry*, 44, 19: 3385- 3388

Kondo K., Shigemori H., Kikuchi Y., Ishibashi K., Sasaki T., Kobayashi J. 1992. Ircinals A and B from the Okinawan Marine Sponge *Ircinia* sp.: Plausible Biogenetic Precursors of Manzamine Alkaloids. *Journal of Organic Chemistry*, 57, 8: 2480-2483

Kondo K., Nishi J., Ishibashi M., Kobayashi J. 1994. Two new tryptophan-derived alkaloids from the Okinawan marine sponge *Aplysina* sp. *Journal of Natural Products*, 57, 7: 1008-1011

Koulman A., Proksch P., Ebel R., Beekman A., van Uden W., Konings A. W. T., Pedersen J. A., Pras N., Woerdenbag H. J. 1996. Cytotoxicity and Mode of Action of Aeroplysinin-1 and a Related Dienone from the Sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Natural Products*, 59, 6: 591-594

Langlois N. 2001. Diastereospecific formal synthesis of (2*R*,3*S*)-2-amino-tetradeca-5,7-dien-3-ol isolated from *Xestospongia* sp. *Tetrahedron Letters*, 42: 5709-5711

Layne T. H., Tinto W. F. 2006. A butenolide from the marine sponge *Callyspongia vaginalis*. *Heterocycles*, 68, 10: 2161-2164

Litaudon M., Hickford S. J. H., Lill R. E., Lake R. J., Blunt J. W., Munro M. H. G. 1997. Antitumor Polyether Macrolides: New and Hemisynthetic Halichondrins from the New Zealand Deep-Water Sponge *Lissodendoryx* sp. *Journal of Organic Chemistry*, 62, 6: 1868-1871

Lopez S., Fernandez-Trillo F., Midon P., Castedo L., Saa C. 2005. First Stereoselective Syntheses of (-)-Siphonodiol and (-)-Tetrahydrosiphonodiol, Bioactive Polyacetylenes from Marine Sponges. . *Journal of Organic Chemistry*, 70, 16: 6346-6352

Loya S., Rudi A., Tal R., Kashman Y., Loya Y., Hizi A. 1994. 3,5,8-Trihydroxy-4-quinolone, a Novel Natural Inhibitor of the Reverse Transcriptases of Human Immunodeficiency Viruses Type 1 and Type 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 309, 2: 315-322

Martinez A., Duque C., Sato N., Fujimoto Y. 1997. (8*Z*,13*Z*,20*Z*)-Strobilin and (7*Z*,13*Z*,20*Z*)-Felixinin: New Furanosesterterpene Tetrone Acids from Marine Sponges of the Genus *Ircinia*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45, 1: 181-184

McKee T. C., Ireland C. M. 1987. Cytotoxic and antimicrobial alkaloids from the Fijian sponge *Xestospongia caycedoi*. *Journal of Natural Products*, 50, 4: 754-756

Mebs D., Benesch S., König B., Yamakawa Y., Omori-Satoh T. 1997. A protease from the marine sponge *Callyspongia schulzi*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 42, 4: 789-797

Miarons P. B., Fresno M. 2000. Lectins from Tropical Sponges. Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 38: 29283–29289

Mierzwa R., King A., Conover M. A., Tozzi S., Puar M. S., Patel M., Coval S. J. 1994. Verongamine, a novel bromotyrosine-derived histamine H₃-antagonist from the marine sponge *Verongula gigantea*. *Journal of Natural Products*, 57, 1: 175-177

Mihopoulos N., Vagias C., Chinou I., Roussakis C., Scoullou M., Harvala C., Roussis V. 1999. Antibacterial and Cytotoxic Natural and Synthesized Hydroquinones from Sponge *Ircinia spinosula*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54c: 417-423

Mitome H., Shinohara M., Miyaoka H., Yamada Y. 2003. Synthesis and Anti-tumor Activity of New Steroidal Nuclear Analogues of Aragusterol A. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51, 6: 640-645

Montalvo N. F., Mohamed N. M., Enticknap J. J., Hill R. T. 2005. Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 29-36

Murakami N., Sugimoto M., Kobayashi M. 2001. Participation of the β -Hydroxyketone Part for Potent Cytotoxicity of Callystatin A, a Spongean Polyketide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9: 57-67

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, 3: 259-261

Nakao Y., Uehara T., Matunaga S., Fusetani N., van Soest R. W. M. 2002. Callyspongynic Acid, a Polyacetylenic Acid Which Inhibits α -Glucosidase, from the Marine Sponge *Callyspongia truncata*. *Journal of Natural Products*, 65, 6: 922-924

Neuweiler F., Burdige D. J. 2005. The modern calcifying sponge *Spherospongia vesparium* (Lamarck, 1815), Great Bahama Bank: Implications for ancient sponge mud-mounds. *Sedimentary Geology*, 175: 89-98

Newbold R. W., Jensen P. R., Fenical W., Pawlik J. R. 1999. Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquatic Microbial Ecology*, 19: 279-284

Pabel C. T., Vater J., Wilde C., Franke P., Hofemeister J., Adler B., Bringmann G., Hacker J., Hentschel U. 2003. Antimicrobial Activities and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Bacillus Isolates from the Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Biotechnology*, 5: 424-434

Patil A. D., Kokke W. C., Cochran S., Francis T. A., Tomszek T., Westley J. W. 1992. Brominated polyacetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia muta*: inhibitors of HIV protease. *Journal of Natural Products*, 55, 9: 1170-1177

Pawlik J. R., Chanas B., Toonen R. J., Fenical W. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Marine Ecology Progress Series*, 127: 183-194

Pawlik J. R., McFall G., Zea S. 2002. Does the odor from sponges of genus *Ircinia* protect them from fish predators? *Journal of Chemical Ecology*, 28, 6: 1103-1115

Pimentel-Elardo S., Wehrl M., Friedrich A. B., Jensen P. R., Hentschel U. 2003. Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. *Aquatic microbial ecology*, 33: 239-245

Pina I. C., White K. N., Cabrera G., Rivero E., Crews P. 2007. Bromopyrrole Carboxamide Biosynthetic Products from the Caribbean Sponge *Agelas dispar*. *Journal of Natural Products*, 70, 4: 613-617

Puyana M., Fenical W., Pawlik J. R. 2003. Are there activated chemical defenses in sponges of the genus *Aplysina* from the Caribbean? *Marine Ecology Progress Series*, 246: 127-135

Quirion J.-C., Sevenet T., Husson H.-P. 1992. Two new alkaloids from *Xestospongia* sp., a new Caledonian sponge. *Journal of Natural Products*, 55, 10: 1505-1508

Rao K. V., Kasanah N., Wahyuono S., Tekwani B. L., Schinazi R. F., Hamann M. T. 2004. Three New Manzamine Alkaloids from a Common Indonesian Sponge and Their Activity against Infectious and Tropical Parasitic Diseases. *Journal of Natural Products*, 67, 8: 1314-1318

Rao M. R., Venkatesham U., Sridevi K. V., Venkateswarlu Y. 2000. Chemical constituents and their biological activities of the sponge family *Aplysinellide*: A review. *Indian Journal of Chemistry*, 39B: 723-733

Rashid M. A., Gustafson K. R., Boyd M. R. 2001. New chondropsin macrolide lactams from marine sponges in the genus *Ircinia*. *Tetrahedron Letters*, 42: 1623-1626

Reddy N. S., Venkateswarlu Y. 2000. S-(+)-methyl ester of hanishin from the marine sponge *Agelas ceylonica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 1035-1037

Richelle-Maurer E., De Kluijver M. J., Feio S., Gaudencio S., Gaspar H., Gomez R., Tavares R., Van de Vyver G., Van Soest R. W. M. 2005. Localization and ecological significance of oroidin and sceptrin in the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 1073-1091

Rivera Rentas A. L., Rosa R., Rodriguez A. D., Escalona de Motta G. 1995. Effect of alkaloid toxins from tropical marine sponges on membrane sodium currents. *Toxicon*, 33, 4: 491-497

Saeki B. M., Granato A. C., Berlinck R. G. S., Magalhães A., Schefer A. B., Ferreira A. G., Pinheiro U. S., Hajdu E. 2002. Two Unprecedented Dibromotyrosine-Derived Alkaloids from the Brazilian Endemic Marine Sponge *Aplysina caissara*. *Journal of Natural Products*, 65, 5: 796-799

Saito N., Koizumi Y.-i., Tanaka C., Suwanborirux K., Amnuoypol S., Kubo A. 2003. Chemistry of antitumor isoquinolinequinone alkaloids: unexpected oxidative degradation of saframycin S to generate simple isoquinoline alkaloids, mimosamycin and mimocin. *Heterocycles*, 61, 79-86

Sandoval I. T., Davis R. A., Bugni T. S., Concepcion G. P., Harper M. K., Ireland C. M. 2004. Cytotoxic isoquinoline quinones from sponges of the genus *Petrosia*. *Natural Product Research*, 18, 1: 89-93

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

Schmitz F. J., Gopichand Y. 1978. (7E, 13E, 15Z)-14,16-dibromo-7,13,15-hexadecatrien-5-ynoic acid. A novel dibromo acetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia muta*. *Tetrahedron Letters*, 39: 3637-3640

Shen X., Perry T. L., Dunbar C. D., Kelly-Borges M., Hamann M. T. 1998. Debromosceptrin, an Alkaloid from the Caribbean Sponge *Agelas conifer*. *Journal of Natural Products*, 61, 10: 1302-1303

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

Sipkema D., Osinga R., Schatton W., Mendola D., Tramper J., Wijffels R. H. 2005. Large-Scale Production of Pharmaceuticals by Marine Sponges: Sea, Cell or Synthesis? *Biotechnology and Bioengineering*, 90, 2: 201- 222

Tabudravu J. N., Jaspars M. 2002. Puralidin S and Purpuramine J, Bromotyrosine Alkaloids from the Fijian Marine Sponge *Druinella* sp. *Journal of Natural Products*, 65, 12: 1798-1801

Tanaka J., Kuniyoshi M., Tanaka C., Issa H. H., Balansa W., Otsuka M., Githige W. P., Higa T. 2005. Diverse metabolites of coral reef organisms. *Pure and Applied Chemistry*, 77, 1: 83-89

Teeyapant R., Proksch P. 1993. Biotransformation of Brominated Compounds in the Marine Sponge *Verongia aerophoba*- Evidence for an Induced Chemical Defense? *Naturwissenschaften*, 80: 369-370

Thakur N. L., Anil A. C. 2000. Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*: importance of its surface-associated bacteria. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 1: 57-71

Thale Z., Johnson T., Tenney K., Wenzel P. J., Lobkovsky E., Clardy J., Media J., Pietraszkiwicz H., Valeriote F. A., Crews P. 2002. Structures and Cytotoxic Properties of Sponge-Derived Bisannulated Acridines. *Journal of Organic Chemistry*, 67, 26: 9384-9391

Toth S. I., Schmitz F. J. 1994. Two new cytotoxic peroxide-containing acids from a new Guinea sponge, *Callyspongia* sp. *Journal of Natural Products*, 57, 1: 123-127

Tsoukatou M., Hellio C., Vagias C., Harvala C., Roussis V. 2002. Chemical Defense and Antifouling Activity of Three Mediterranean Sponges of the Genus *Ircinia*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 57c: 161-171

Turk T. 1996. Živalski svet Jadranskega morja. Državna založba Slovenije: 53-55 str.

Uchimura A., Shimizu T., Nakajima M., Ueno H., Motoki K., Fukushima H., Natori T., Kozuka Y. 1997. Immunostimulatory Activities of Mono- or Diglycosylated α -Galactosylceramides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5, 7: 1447-1452

Vacelet J., Gallisian M.-F. 1978. Virus-Like Particles in Cells of the Sponge *Verongia cavernicola* (Demospongiae, Dictyoceratida) and Accompanying Tissues Changes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 31: 246-254

Waddell B., Pawlik J. R. 2000. Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. I. Assays with hermit crabs. *Marine Ecology Progress Series*, 195: 125-132

Walters K.D., Pawlik J. R. 2005. Is There a Trade-Off Between Wound-Healing and Chemical Defenses Among Caribbean Reef Sponges? *Integrative and Comparative Biology*, 45: 352-358

Wang G.-Y.-S., Kuramoto M., Uemura D. 1996. Three Novel Anti-microfouling Nitroalkyl Pyridine Alkaloids from the Okinawan Marine Sponge *Callyspongia* sp. *Tetrahedron Letters*, 37, 11: 1813-1816

Wright A. E., McCarthy P. J. 1989. Sulfircin: A New Sesterterpene Sulfate from a Deep-Water Sponge of the Genus *Ircinia*. *Journal of Organic Chemistry*, 54, 14: 3472-3474

Youssef D. T. A., van Soest R. W. M., Fusetani N. 2003. Callyspongamide A, a New Cytotoxic Polyacetylenic Amide from the Red Sea Sponge *Callyspongia fistularis*. *Journal of Natural Products*, 66, 6: 861-862

Youssef D. T. A., van Soest R. W. M., Fusetani N. 2003a. Callyspongenols A-C, New Cytotoxic C22-Polyacetylenic Alcohols from a Red Sea Sponge, *Callyspongia* Species. *Journal of Natural Products*, 66, 5: 679-681

Zhang G.-W., Ma X.-Q., Zhang C.-X., Su J.-Y., Ye W.-C., Zhang X.-Q., Yao X.-S., Zeng L.-M. 2005. Two New Ceramides from the Marine Sponge *Ircinia fasciculata*. *Helvetica Chimica Acta*, 88: 885-890

Zierer M. S., Mourão P. A. S. 2000. A wide diversity of sulfated polysaccharides are synthesized by different species of marine sponges. *Elsevier, Carbohydrate Research*, 328: 209-216

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Tom Turku za pomoč in razumevanje.

Prof. dr. Kristini Sepčič za ljubeznivost in prijaznost ter veliko pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Svojim staršem in prijateljem za vzpodbudo in razumevanje v času študija.

PRILOGE

Priloga A

Preglednica 1: Pregled objav

Ime spužve	Učinkovina	Vrsta molekule	Vodna/ org. faza	Organsko topilo	Aktivnost	Referenca
<i>Acantho-strongylophora</i> sp.	12,34-oksamanzamin E 8-hidroksimanzamin J 6-hidroksimanzamin E	β-karbolin alkaloidi	Organska faza	aceton	Protimalarična aktivnost Aktivnost proti bičkarju <i>Leishmania donovani</i> Protimikrobna aktivnost proti <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rao in sod., 2004
<i>Agelas ceylonica</i>	S-(+)-metil ester hanišin	Alkaloidi	Organska faza	diklorometan / metanol (1:1)	Zmerna protimikrobna aktivnost proti bakteriji <i>Bacillus subtilis</i>	Reddy in Venkateswarlu, 2000
<i>Agelas clathrodes</i>	Oroidin 4,5-dibromopirolo-2-karboksilna kislina	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	diklorometan / metanol	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami	Chanas in sod., 1996
	Klatrozid A-C Izoklatrozid A-C	Glikolipidi	Organska faza	metanol in kloroform	Nepomemben vpliv na imunski sistem sesalcev	Costantino in sod., 2006

<i>Agelas conifera</i>	Skeptrin Dibromoskeptrin Bromoageliferin Dibromoageliferin Ageliferin Bromoskeptrin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol / diklorometan	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami	Assmann in sod., 2000
	Bromoageliferin Dibromoageliferin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol / diklorometan	Zmanjšanje napetostno odvisnega vdora Ca ²⁺ v PC12 celice	Bickmeyer, 2005
	Skeptrin diacetat Bromopiroli (1,3-8)	Bromopirolovi metaboliti	Organska faza	metanol / toluen (3:1)	Protivirusna aktivnost Protibakterijska aktivnost	Keifer in sod., 1991
	Oroidin Skeptrin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Vpliv na vedenje korale <i>Madracis mirabilis</i> , zapiranje in vpoteg polipov Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Stegastis partitus</i> Protimikrobna aktivnost Protiglivna aktivnost	Richelle-Maurer in sod., 2003
	Debromoskeptrin Analogi pirola ?	(Bromo)pirolovi alkaloidi ?	Organska faza	etanol	Majhna protimikrobna aktivnost proti bakteriji <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Shen in sod., 1998

<i>Agelas dispar</i>	Aminozooanemonin Piridinbetain A Piridinbetain B	Betain alkaloidi	Organska faza	metanol	Zmerna antibakterijska aktivnost	Cafieri in sod., 1998
	Longamid B Klatramid C Klatramid D Keramadin Ekdisteron Ajuga steron C	Bromopirolovi alkaloidi Steroli	Organska faza	metanol	Protibakterijska aktivnost proti Gram+ bakterijam (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphilococcus aureus</i>) Protiglivna aktivnost proti plesni <i>Aspergillus niger</i>	Cafieri in sod., 1998b
	Dispirin dibromoagelaspongini metil eter	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	?	Pina in sod., 2007
<i>Agelas nakamurai</i>	(-)Agelazin E	Derivat diterpena	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost proti vrsti <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Citotoksičnost Inhibicija Na ⁺ /K ⁺ -ATP-aze	Bakkestuen in sod., 2005

<i>Agelas sp.</i>	4,5-dibromopirolo-2-karboksilna kislina	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Zmanjšanje napetostno odvisnega vdora Ca ²⁺ v PC12 celice	Bickmeyer, 2005
	Dispakamid Monobromovi derivati	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Antihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	Cafieri in sod., 1996
	Dispakamid C Dispakamid D	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Antihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	Cafieri in sod., 1997
	Agelazin H Agelazin I	Diterpeni	Organska faza	metanol / diklorometan	Citotoksičnost Protimikrobna aktivnost Inhibicija Na ⁺ /K ⁺ -ATP-aze	Fu in sod., 1998
	Dibromoskeptrin Klatrodin	Alkaloidi	? faza	?	Nevrotoksična aktivnost	Rivera Rentas in sod., 1994
	Monobromoizofakelin Dibromoizofakelin Monobromofakelin Dibromofakelin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	diklorometan / metanol (1:1)	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Thalassoma bifasciatum</i>	Assmann in Köck, 2002

<i>Agelas wiedenmayeri</i>	4,5-dibromopirolo-2-karboksilna kislina Oroidin Bromoageliferin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol / diklorometan	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami	Assmann in sod., 2000
<i>Amphimedon cornpressa</i>	Halitoksin Amfitoksin	Sekundarni metaboliti	Organska faza	metanol / diklorometan (1:1)	Protimikrobna aktivnost proti vrstam: <i>Bacillus sp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Deleya marina</i> , <i>Axinella corrugata</i>	Newbold in sod., 1999
<i>Amphimedon erina</i>	Halitoksin Amfitoksin	Sekundarni metaboliti	Organska faza	metanol / diklorometan (1:1)	Protimikrobna aktivnost proti vrstam: <i>Bacillus sp.</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Axinella corrugata</i>	Newbold in sod., 1999
<i>Aplysina aerophoba</i>	Hortein	Sekundarni metaboliti	Organska faza	etil acetat	Ni nobene dokazane aktivnosti	Brauers in sod., 2001
	Aeroplizinin 1 Dienon	Derivati bromotirozina	Organska faza	?	Citotoksičnost za EAT in HeLa tumorske celice	Koulman in sod., 1996
	Aeroplizinin 1 Dibromociklohekaadienon	Derivati bromotirozina	Organska faza	diklorometan / acetonitril (1:1)	Kemijska obramba pred patogeni in plenilskimi ribami	Puyana in sod., 2003
	Aeroplizinin 1 2-acetamid	Derivat bromotirozina	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Fattorusso in sod., 1970

<i>Aplysina archeri</i>		Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1) kloroform	Protiglivna aktivnost proti protivi glivi <i>Cryptococcus neoformans</i>	Ciminiello in sod., 1996
	Fistularin 3 11-ketofistularin 3	Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1)	Inhibicija rasti virusa mačje levkemije	Gunasekera in sod., 1992
		Lektini	Vodna faza	0,9% NaClaq z dodanimi 1Mm CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂ in 0.02% NaN ₃	Hemaglutinacija	Miarons in Fresno, 2000
	Arherin	Derivat bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1) kloroform	Antihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	Ciminiello in sod., 2001
<i>Aplysina caissara</i>	Kaizarin A Kaizarin B Aeroplizinin-1 Fistularin-3	Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol	Zmerna citotoksičnost Protibakterijska aktivnost	Saeki in sod., 2002
<i>Aplysina cauliformis</i>		Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1) kloroform	Citotoksičnost Inhibicija sinteze proteinov in celične delitve pri sesalčjih celicah	Ciminiello in sod., 1999
		Lektini	Vodna faza	0,9% NaClaq z dodanimi 1Mm CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂ in 0.02% NaN ₃	Hemaglutinacija	Miarons in Fresno, 2000

<i>Aplysina cavernicola</i>	Oksohomoaerotionin 11-hidroksifistularin-3	Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1) kloroform	?	Ciminiello in sod., 1997
	3-bromoverongiakvinol 3-bromo-5-kloroverongiakvinol 5-klorokavernikolin C(7)-epimer 7β-bromo-5- klorokavernikolin 7α-bromo-5-klorokavernikolin C(7)-epimer 5-bromo-7β- klorokavernikolin 5-bromo-7α-klorokavernikolin 3,5-dikloroverongiakvinol 5-bromokavernikolin Bromohomogentizamid Bastadini	Dibromovi metaboliti	Organska faza	butanol H2O / metanol (82:12, 4:1) MeCN / H2O (1:9) H2O / tetrahidrofuram (98:2)	Citotoksičnost Protimikrobna aktivnost proti Gram+ bakterijam (<i>Sarcina lutea</i> , <i>Streptococcus foecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>) in Gram - bakterijam (<i>Alcaligena</i> <i>foecalis</i> , <i>Proteus vulgaris</i>)	D'Ambrosio in sod., 1984

<i>Aplysina fistularis</i>	Aerotionin Homoaerotionin	Derivati bromotirozina	Organska faza	cezijev klorid	Protimikrobna aktivnost proti vrstam: <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Paracoccus sp.</i> , <i>Pseudomonas vesicularis</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> Inhibicija bakterijske in nevretenčarske adhezije Kemijska obramba pred plenilskimi ribami	Betancourt-Lozano in sod., 1998
<i>Aplysina gerardogreeni</i>	Aerotionin Kalafianin	Derivati bromotirozina	Organska faza	heksan diklorometan etanol	Protimikrobna aktivnost proti bakteriji <i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	Encarnacion- Dimayuga in sod., 2003
<i>Aplysina lawnosa</i>		Lektini	Vodna faza	0,9% NaClaq z dodanimi 1Mm CaCl ₂ , MgCl ₂ , MnCl ₂ in 0.02% NaN ₃	Hemaglutinacija	Miarons in Fresno, 2000
<i>Aplysina sp.</i>	Aplizanzin A	Derivati dibromotirozina	Organska faza	etil acetat etil acetat / metanol (1:1)	Citotoksičnost Protimikrobna aktivnost	Evan in sod., 2001
	Izoplizin A D-6-bromohipaforin Aplizinopsin	Indol alkaloidi	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za L1210 mišje in KB človeške rakave celice	Kondo in sod., 1994

<i>Callyspongia bilamellata</i>	Foriospongin A Foriospongin B	Depsipeptidi	Organska faza	etanol	Nematocidna aktivnost	Capon in sod., 2002
<i>Callyspongia fistularis</i>	Kalispongamid A	Poliacetilenski amid	Organska faza	metanol / diklorometan (1:1)	Citotoksičnost	Youssef in sod., 2003
<i>Callyspongia plicifera</i>	Ekstakt		Organska faza	diklorometan	Inhibicija bakterijske rasti Toksičnost za -ličinke mnogoščetinca <i>Hydroides elegans</i> -raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> Protivegetativna aktivnost	Qian in sod., 2006
<i>Callyspongia schulzi</i>	Metaloproteaza	Peptid	Vodna faza	destilirana voda	Proteolitična aktivnost	Mebs in sod., 1997

<i>Callyspongia sp.</i>	Ilhabelanol Ilhabrene Izoakaterpin	Bisulfatni meroterpenoidi	Organska faza	etanol metanol	Inhibicija adenzin fosforibozil transferaze	Gray in sod., 2006
	?	Maščobne kisline	Organska faza	metanol kloroform / metanol (1:1)	Citotoksičnost	Toth in Schmitz., 1994
	Untenin A Untenin B Untenin C	Piridinski alkaloidi (nitroalkilni metaboliti)	Organska faza	metanol	Inhibicija obraščanja ladijskega dna	Wang in sod., 1996
	Kalispongenol A Kalispongenol B Kalispongenol C Dehidroizofonohalinol	Sekundarni metaboliti	Organska faza	metanol / diklorometan (1:1)	Zmerna citotoksičnost za P388 in HeLa rakave celice	Youssef in sod., 2003a
<i>Callyspongia truncata</i>	Kalistatin A	Poliketidi	Organska faza	etil acetat	Citotoksičnost	Murakami in sod., 2001
	Kalisponginska kislina	Poliacetileni	Organska faza	etanol	Inhibicija α -glukozidaze	Nakao in sod., 2002
	Kalistatin A	Poliketid	Organska faza	aceton	Citotoksičnost za L1210 in KB celične linije	Kobayashi in Kitagawa, 1999

<i>Callyspongia vaginalis</i>	Butenolid	Sekundarni metabolit	Organska faza	aceton	Citotoksičnost za človeške rakave celice Inhibicija α -glukozidaze Inhibicija obraščanja spužve Inhibicija oploditve pri morskih zvezdah	Layne in Tinto, 2006
<i>Druinella sp.</i>	Purealidin S Purpuramin J	Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol diklorometan	Zmerna citotoksičnost	Tabudravu in Jaspars, 2002
<i>Dysidea arenaria</i>	Arenastatin A	Depsipeptid	Organska faza	aceton	Citotoksičnost za L1210 in KB celične linije	Kobayashi in Kitagawa, 1999
<i>Haliclona cribricutis</i>	Triterpenski ketid Halikotriol B Haliklonadiamin Papuanin	Sekundarni metaboliti	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost proti vrstam: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Vibrio cholerae</i> Protiglivna aktivnost proti vrsti <i>Aspergillus fumigatus</i>	Ely in sod., 2004
<i>Hirtios altum</i>	Altohirtin A	Makrolid	Organska faza	aceton	Citotoksičnost za L1210 in KB celične linije	Kobayashi in Kitagawa, 1999

<i>Ircinia campana</i>	(8Z,13Z,20Z)-strobilin (7Z,13Z,20Z)-feliksinin	Furanosester- terpenske tetronske kisline	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997a
	(7E,12E,18R,20Z)-variabilin	Furanosesterterpen	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997b
	Dimetil sulfid Metil izocijanid Metil izotiocianat	Dušikovi in žveplovi metaboliti	Organska faza	metanol diklorometan / metanol (1:1)	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Thalassoma bifasciatum</i> Protimikrobna aktivnost Inhibicija Ca ²⁺ transporta	Pawlik in sod., 2002
		Furanosester- terpenske tetronske kisline				
<i>Ircinia fasciculata</i>	Ircisulfamid Ircicerebrozid	Sfingolipidi	Organska faza	etanol	Inhibicija proteinske kinaze C, Na ⁺ /K ⁺ -ATP- aze in kalmodulin kinaze Aktivacija fosfolipaze C, fosfolipaze D, kazein kinaze II, tirozin kinaze in DG kinaze	Zhang in sod., 2005

<i>Ircinia felix</i>	Tiobismetan Metil izocijanid Metil izotiocijanat	Hidrokarboni	?	plin dušik	Protibakterijska aktivnost proti bakterijam: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> Kemijska obramba pred plenilci in epibionti	Duque in sod., 2001
	(8Z,13Z,20Z)-strobilin (7Z,13Z,20Z)-feliksinin	Furanosester-terpenske tetronske kisline	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997a
	(7E,12E,18R,20Z)-variabilin	Furanosesterterpen	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997b
	Dimetil sulfid Metil izocijanid Metil izotiocijanat	Dušikovi in žveplovi metaboliti	Organska faza	metanol diklorometan / metanol (1:1)	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Thalassoma bifasciatum</i> Protimikrobna aktivnost Inhibicija Ca ²⁺ transporta	Pawlik in sod., 2002
	Furanosester-terpenske tetronske kisline					
<i>Ircinia oros</i>	Hidrokinon A Hidrokinon B Variabilin Ircinin I Ircinin II	Hidrokinoni	Organska faza	metanol / diklorometan (1:2)	Obramba pred plenilci Protivegetativna aktivnost	Tsoukatou in sod., 2002

<i>Ircinia ramosa</i>	73-deoksihondropsin A Hondropsin C	Makrolidni laktami	Vodna faza	deionizirana voda	Citotoksičnost	Rashid in sod., 2001
		Terpenoidi Steroidi	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost Protivirusna aktivnost Anti-alge aktivnost	Thakur in Anil, 2000
<i>Ircinia sp.</i>	Tedanolid C	Sekundarni metaboliti	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za HCT-116 celične linije	Chevallier in sod., 2006
	Irciniasulfonska kislina B	?	Organska faza	etanol	Prekinitev rezistence KB/VJ300 celic na vinkristin	Emura in sod., 2006
		Sesterterpeni	Organska faza	aceton	Zmerna citotoksičnost za KB celice	Issa in sod., 2003
	Ircinal A Ircinal B	β -karbolin alkaloidi	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za L1210 mišje in KB človeške rakave celice	Kondo in sod., 1992
	Cikloteonamid E4 Cikloteonamid E5	Cicklični pentapeptidi	Organska faza	metanol kloroform	Inhibitorji človeške triptaze	Murakami in sod., 2002
	Sulfircin	Sesterpen sulfat	Organska faza	metanol	Protiglivna aktivnost	Wright in McCarthy, 1989

<i>Ircinia spinosula</i>	2-oktaprenil-1,4-hidrokinon 2-(24-hidroksi)-oktaprenil-1,4-hidrokinon	Hidrokinoni	Organska faza	diklorometan / metanol (3:1)	Citotoksičnost za človeške celične linije pljučnega raka Protimikrobna aktivnost proti Gram+ bakterijam (<i>Staphylococcus aureus</i>) in Gram- bakterijam (<i>Enterobacter cloacae</i>)	Mihopoulos in sod., 1999
	Hidrokinon A Hidrokinon B Variabilin Ircinin I Ircinin II	Hidrokinoni	Organska faza	metanol / diklorometan (1:2)	Obramba pred plenilci Protivegetativna aktivnost	Tsoukatou in sod., 2002

<i>Ircinia strobilina</i>	(8Z,13Z,20Z)-strobilinin (7Z,13Z,20Z)-feliksinin	Furanosester- terpenske tetronske kisline	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997a
	(7E,12E,18R,20Z)-variabilin	Furanosesterterpen	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997b
	Variabilin	Furanosesterterpen	Organska faza	etanol metanol / diklorometan (6:4)	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami	Epifanio in sod., 1999
	Dimetil sulfid Metil izocijanid Metil izotiocianat	Dušikovi in žveplovi metaboliti	Organska faza	metanol diklorometan / metanol (1:1)	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Thalassoma bifasciatum</i> Protimikrobna aktivnost Inhibicija Ca ²⁺ transporta	Pawlik in sod., 2002
	Furanosester- terpenske tetronske kisline					
<i>Ircinia variabilis</i>	Hidrokinon A Hidrokinon B Variabilin Ircinin I Ircinin II	Hidrokinoni	Organska faza	metanol / diklorometan (1:2)	Obramba pred plenilci Protivegetativna aktivnost	Tsoukatou in sod., 2002

<i>Lissodendrorox</i> sp.	Halihondrin B Homohalihondrin B Izohomohalihondrin B Norhalihondrin B	Makrolidni polietri	Organska faza	diklorometan metanol	Inhibitorna aktivnost proti P388 mišjim rakavim celicam Inhibitorna aktivnost proti DNA virusu (<i>Herpes simplex</i> Tip I) in RNA virusu (<i>Polio vaccine</i> virus)	Litaudon in sod., 1997
<i>Luffariella</i> sp.	Kerufarid	Glikolipidi	Organska faza	metanol	Stimulacija sinteze NGF (nerve growth factor)	Ishibashi in sod., 1993
<i>Petrosia</i> sp.	Kribrostatin Renieron O-demetilrenieron	Izokvinolin kvinoni	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za HCT 116 človeške rakave celice	Sandoval in sod., 2004
<i>Phoriospongia</i> sp.	Foriospongina A Foriospongina B	Depsipeptidi	Organska faza	etanol	Nematocidna aktivnost	Capon in sod., 2002
<i>Phyllospongia</i> sp.	Dihomoskalarani	Sesterterpeni	Organska faza	?	Zmerna citotoksičnost za KB celice Protimikrobna aktivnost Protivnetno delovanje Anti-HIV delovanje	Tanaka in sod., 2005

<i>Pseudoceratina crassa</i>	Bromometoksifenilacetonitril 1,1-dimetil-2-karboksi-2H-indole	Bromirani metaboliti	Organska faza	metanol	?	Ciminiello in sod., 1995
	Kraseridi 1a-1f	Glikolipidni analogi	Organska faza	metanol / toluen (3:1) kloroform	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami	Constantino in sod., 1994
<i>Pseudoceratina purpurea</i>	Aplizamin-2 Purpuroceratična kislina A Purpuroceratična kislina B 3-maleimid-5-oksim	Derivati bromotirozina	Organska faza	etanol	Zmerno inhibitorno delovanje na človeške rakave celične linije	Kijjoa in sod., 2005
<i>Sphaciospongia vesparia</i>	Metaloproteaza	Protein	Vodna faza	destilirana voda	Proteoliza kazeina	Arreguin in sod., 1993
	Vespariozid	Glikosfingolipid	Organska faza	kloroform metanol	Protitumorsko delovanje Imunostimulacija	Costantino in sod., 2005
<i>Suberites japonicus</i>	Seragamid A Seragamid B Saregamid C Seragamid D Geodiamolid I	Depsipeptidi	Vodna faza	destilirana voda	Citotoksičnost za NBT-II celice	Tanaka in sod., 2005

<i>Theonella cf. swinhoei</i>	Bitungolid A Bitungolid B Bitungolid C Bitungolid D Bitungolid E Bitungolid F	Poliketidi	Organska faza	?	Zmerna in selektivna inhibicija encima fosfataze	Tanaka in sod., 2005
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	Ofirapstanol trisulfat	Steroid	Organska faza	etanol	Inhibicija izmenjave gvaninskih nukleotidov, ki so vezani na p21RAS kompleks, pomemben v celičnem ciklu in pri transdukciji celičnih signalov	Gunasekera in sod., 1994
<i>Verongia aerophoba</i>	Dienon Dienonedietoksi ketal Fistularin-3	Derivati dibromotirozina	Organska faza	aceton etanol metanol	Citotoksičnost Protimikrobna aktivnost	Aydogmus in sod., 1999
	Aeroplizinin 1 Dienon 5 Izofistularin-3 Aerofobin-2	Derivati dibromotirozina	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost proti vrstam: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Teeyapant in Proksch, 1993
<i>Verongia sp.</i>	3,5,8-trihidroksi-4-kvinolon	Sekundarni metabolit	Organska faza	etil acetat	Inhibicija RNA vodene DNA sinteze reverzne transkriptaze človeškega HIV virusa tip 1 in 2	Loya in sod., 1994

<i>Verongula gigantea</i>	Aeroplizinin 1 Aeroplizinin 2 5,6-dibromo- <i>N,N</i> -dimetiltryptamini	Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1) kloroform	?	Ciminiello in sod., 2000
	Verongamin	Derivati bromotirozina	Organska faza	etanol	Antagonist histamina-H3	Mierzwa in sod., 1994
<i>Verongula rigida</i>	Dihidroksiaerotionin Aerofobin 1	Derivati bromotirozina	Organska faza	etil acetat	Ni biološke aktivnosti	Gunasekera in sod., 1989
<i>Verongula sp.</i>	?	Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1)	Protibakterijska aktivnost proti Gram + bakterijam Citotoksičnost Inhibicija Na ⁺ /K ⁺ -ATP-aze Aktivacija miozina K ⁺	Ciminiello in sod., 1994
<i>Xestospongia cf. carbonaria</i>	Neoamfimedín 5-metoksineoamfimedín Neoamfimedín Y Neoamfimedín Z Alpkinidin	Alkaloidi	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za tumorske celice	Thale in sod., 2002

<i>Xestospongia caycedoi</i>	<p>Ksestospongin C</p> <p>Halnakvinon</p> <p>Dibromoacetilenska kislina</p> <p>Renierol</p> <p>Mimozamicin</p>	Alkaloidi	Organska faza	metanol	<p>Citotoksičnost za L1210 mišje rakave celice</p> <p>Insekticidna aktivnost proti <i>Heliothis virescens</i></p> <p>Protibakterijska aktivnost proti: <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	Mckee in sod., 1987
<i>Xestospongia cf. exigua</i>	<p>Neoamfimedín</p> <p>5-metoksineoamfimedín</p> <p>Neoamfimedín Y</p> <p>Neoamfimedín Z</p> <p>Alpkinidin</p>	Alkaloidi	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za tumorske celice	Thale in sod., 2002

<i>Xestospongia muta</i>	Ksesterol Ksestostanol	Steroli	Organska faza	metanol	Stabilizacija celične membrane	Kokke in sod., 1979
	16-bromo-7,11,15- heksadekatrien-5,1-diinoična kislina 18-bromo-9,13,17-oktadekatrien- 5,7,15-triinoična kislina	Bromirane poliacetilenske kislina	Organska faza	etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	14,16-dibromo-7,13,15- heksadekatrien-5-inoična kislina	Dibromo acetilenska kislina	Organska faza	diklorometan	Inhibicija tumorske aktivnosti Inhibicija aktivnosti centralnega živčnega sistema	Schmitz in Gopichand, 1978

<i>Xestospongia sp.</i>	Halenakvinon Adociakvinon A Adociakvinon B 3-ketoadociakvinon A 3-ketoadociakvinon B Tetrahidrohalenakvinon A Tetrahidrohalenakvinon B 13-O-metil ksestokvinol sulfat	Derivati ksestokvinona	Organska faza	metanol	Inhibicija Cdc25B fosfataze	Cao in sod., 2005
	2-amino- tetradeka-5,7-dien-3-ol 1 2-amino- tetradeka-5,7-dien-3-ol 2	Amino alkoholi	Organska faza	metanol	Protiglivna aktivnost proti glivi <i>Candida albicans</i> Protimikrobna aktivnost Citotoksičnost	Langlois, 2001
	Demetilksestospongin B Derivat tetrahidrokarbolina Ksestospongin B Ksestospongin D Araguspongin F	Alkaloidi	Organska faza	etil acetat	Citotoksičnost za KB celice	Quirion in sod., 1992
	Aragusterol A	Steroid	Organska faza	metanol	Inhibicija razmnoževanja KB celic Citotoksičnost za L1210 mišje rakave celice	Mitome in sod., 2003