

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Manca GORJANC

**HEMOLITIČNA AKTIVNOST STEROIDNIH SAPONINOV IZ
MORSKE SPUŽVE *Pandaros acanthifolium***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**HEMOLYTIC ACTIVITY OF STEROIDAL SAPONINS FROM
MARINE SPONGE *Pandaros acanthifolium***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo, Oddelka za biologijo, na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorja imenovala prof. dr. Toma Turka in za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor diplomske naloge:

Predsednik: doc. dr. Gregor Zupančič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član: prof. dr. Tom Turk
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član: prof. dr. Peter Maček
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Datum zagovora: 16.1.2012

Manca Gorjanc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 577:6:591.47.21(043.2)=163.6
- KG sekundarni metaboliti / akantifolizini / pandarozidi / hemolitična aktivnost / morska spužva / *Pandaros acanthifolium*
- AV GORJANC, Manca
- SA TURK, Tom-mentor
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2012
- IN HEMOLITIČNA AKTIVNOST STEROIDNIH SAPONINOV IZ MORSKE
SPUŽVE *Pandaros acanthifolium*
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XI, 49 str., 1 pregl., 21 sl., 61 vir.
- IJ sl
- JI sl/an
- AJ Za oceno mehanizma hemolize novih steroidnih saponinov, ki so jih izolirali iz morske spužve *Pandaros acanthifolium*, smo testirali 13 različnih spojin. Štiri od teh spadajo v skupino akantifolizinov, devet pa v skupino pandarozidov. Opravili smo hemolitični test za ugotovitev časovnega poteka hemolize in test inhibicije hemolize z osmoprotektanti, pa tudi teste z lipidnimi vezikli, vključno z vezikli s kalceinom. Pri pandarozidih nismo opazili nobene hemolitične aktivnosti. Ugotovili smo, da so akantifolizini močno hemolitično aktivni, in sicer že pri koncentracijah pod 10 µg/ml. Hitrost hemolize je koncentracijsko odvisna, hemoliza pa je koloidno-osmotskega tipa s sigmoidno krivuljo, kar kaže na tvorbo por v eritrocitni membrani. Akantifolizini so se najboljše vezali na lipida POPC in SM, ko sta bila v razmerju 1:1. Prav tako je pri tem razmerju lipidov prišlo do največjega sproščanja kalceina iz lipidnih veziklov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 577:6:591.47.21(043.2)=163.6

CX secondary metabolites / acanthifoliosides / pandarosides / hemolytic activity /
marine sponge / *Pandaros acanthifolium*

AU GORJANC, Manca

AA TURK, Tom-supervisor

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PU University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology

PY 2012

TI HEMOLYTIC ACTIVITY OF STEROIDAL SAPONINS FROM MARINE
SPONGE *Pandaros acanthifolium*

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 49 p., 1 tab., 21 fig., 61 ref.

LA sl

JI sl/en

AI To evaluate the mechanism of hemolysis of novel steroidal saponins, which were isolated from marine sponge *Pandaros acanthifolium*, we tested 13 different compounds. Four of these compounds belong to the group of acanthifoliosides and 9 of them to the group of pandarosides. We performed the test to determine time course of hemolysis and also the hemolysis inhibition test by osmoprotectants. Further experiments were performed with lipid vesicles including calcein-loaded vesicles. Pandarosides showed no hemolytic activity while acanthifoliosides showed strong hemolytic activity below concentrations of 10 µg/ml. Acanthifoliosides induced hemolysis in a dose-dependent manner. Hemolysis is colloid-osmotic with the sigmoid shape of the curve that indicates pore formation in the erythrocyte cell membrane. Acanthifoliosides best bind to lipid vesicles made from POPC and SM in the ratio 1:1. This ratio of lipids also resulted in the greatest calcein release from the liposomes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SEKUNDARNI METABOLITI MORSKIH ORGANIZMOV	3
2.1.1 Sekundarni metaboliti spužev	3
2.1.2 Biotehnoška uporabnost sekundarnih metabolitov spužev	5
2.2 STEROIDNI SAPONINI	6
2.2.1 Struktura steroidnih saponinov	6
2.2.2 Hemolitična aktivnost saponinov	7
2.3 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI IZ SPUŽVE <i>Pandaros acanthifolium</i>	8
2.3.1 Pandarozidi	9
2.3.2 Akantifolizini.....	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	13
3.1.2 Raztopine.....	13

3.1.3 Laboratorijska oprema	14
3.2 METODE	14
3.2.1 Izvor spužve in steroidnih saponinov	14
3.2.2 Test hemolitične aktivnosti steroidnih saponinov iz spužve <i>Pandaros acanthifolium</i>	15
3.2.3 Ocena velikosti por z osmoprotektanti	16
3.2.4 Inhibicija hemolize z lipidi.....	16
3.2.4.1 Priprava SUV veziklov (majhni unilamelarni vezikli)	16
3.2.4.2 Merjenje inhibicije hemolize	17
3.2.5 Test sproščanja kalceina	17
3.2.5.1 Priprava SUV veziklov s kalceinom.....	17
3.2.5.2 Test sproščanja kalceina	18
4 REZULTATI.....	19
4.1 TEST HEMOLITIČNE AKTIVNOSTI	19
4.2 OCENA VELIKOSTI POR Z OSMOPROTEKTANTI	23
4.3 TEST INHIBICIJE HEMOLIZE S SUV VEZIKLI NAREJENIMI IZ POPC, SM IN POPC/SM (1/1)	25
4.4 TEST SPROŠČANJA KALCEINA IZ SUV VEZIKLOV NAREJENIH IZ POPC, SM IN POPC/SM (1/1)	28
4.4.1 Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov (SUV) zaradi akantifolizina B....	28
4.4.2 Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov (SUV) zaradi akantifolizina D....	30
4.4.3 % sproščenega kalceina v odvisnosti od koncentracije akantifolizinov B in D	32
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	35

5.1 RAZPRAVA.....	35
5.2 SKLEPI.....	39
6 POVZETEK.....	40
7 VIRI	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Hemolitična aktivnost steroidnih saponinov	19
-----------------------------------------------------------------	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna struktura steroidnih saponinov (Francis s sod., 2002).....	6
Slika 2: Osnovne strukture pandarozidov in ustreznih metilnih estrov (Regalado s sod., 2009).....	10
Slika 3: Osnovne strukture akantifolizinov in ustreznih metilnih estrov (Regalado s sod., 2011).....	12
Slika 4: Časovni potek hemolize pri različnih koncentracijah akantifolizina B.....	20
Slika 5: Časovni potek hemolize pri različnih koncentracijah akantifolizina C.....	21
Slika 6: Časovni potek hemolize pri različnih koncentracijah akantifolizina D	21
Slika 7: Recipročne vrednosti polovičnih časov hemolize v odvisnosti od koncentracije akantifolizina B, C in D.....	22
Slika 8: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina B ob dodatku PEG z molskimi masami 300, 600, 1450, 3350, 4000 in 8000 Da.....	24
Slika 9: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina C ob dodatku PEG z molskimi masami 300, 600, 1450, 3350, 4000 in 8000 Da.....	24
Slika 10: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina D ob dodatku PEG z molskimi masami 300, 600, 1450, 3350, 4000 in 8000 Da.....	25
Slika 11: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina B ob dodatku veziklov iz POPC, SM in POPC:SM=1:1	26
Slika 12: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina C ob dodatku veziklov iz POPC, SM in POPC:SM=1:1	27
Slika 13: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina D ob dodatku veziklov iz POPC, SM in POPC:SM=1:1	27
Slika 14: Časovni potek sproščanja kalceina iz POPC veziklov pri različnih koncentracijah akantifolizina B	29
Slika 15: Časovni potek sproščanja kalceina iz SM veziklov pri različnih koncentracijah akantifolizina B	29
Slika 16: Časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov iz POPC/SM v molskem razmerju 1:1 pri različnih koncentracijah akantifolizina B	30

Slika 17: Časovni potek sproščanja kalceina iz POPC veziklov pri različnih koncentracijah akantifolizina D	31
Slika 18: Časovni potek sproščanja kalceina iz SM veziklov pri različnih koncentracijah akantifolizina D	31
Slika 19: Časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov iz POP/SM v molskem razmerju 1:1 pri različnih koncentracijah akantifolizina D	32
Slika 20: Odstotek sproščenega kalceina iz veziklov POPC, SM in POPC:SM=1:1 v odvisnosti od koncentracije akantifolizina B.....	33
Slika 21: Odstotek sproščenega kalceina iz veziklov POPC, SM in POPC:SM=1:1 v odvisnosti od koncentracije akantifolizina D	34

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA	goveji serumski albumin
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
PEG	polietilenglikol
POPC	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin, palmitoiloleilfosfatidilholin
SM	sfingomielin
SUV	majhni unilamelarni vezikli (small unilamellar vesicles)

1 UVOD

Morski ekosistemi so s svojo veliko biodiverzitetjo že dolgo časa vir edinstvenih spojin in sekundarnih metabolitov, ki izvirajo iz različnih morskih organizmov. V desetletjih brez potapljaških tehnik so bile raziskave morskih organizmov omejene le na površino. V zadnjih letih pa je zaradi razvoja novih tehnologij prišlo do odkritja več molekul iz morskih nevretenčarjev, ki bi lahko bile potencialno uporabne za človeštvo.

Ena izmed najbolj obetajočih skupin morskih organizmov na tem področju so spužve. To so sesilne, večinoma morske živali, ki so prisotne v vseh oceanih, njihova razširjenost pa se razteza od tropov do obeh polov. Zaradi razširjenosti, relativno nezahtevnega nabiranja in njihove sposobnosti biosinteze velikega števila sekundarnih metabolitov, so postale pomemben vir potencialnih biološko aktivnih snovi. S svojim bogatim naborom spojin, ki jih uporabljajo za kemijsko obrambo, so perspektivna skupina nevretenčarjev, za raziskovanja biološko aktivnih snovi in potencialno uporabo le teh v medicini, farmaciji, prehranski in kozmetični industriji itd. Raziskovanje biološko aktivnih snovi iz morskih organizmov je še v povojih, zato obstaja še mnogo vprašanj, ki jih je potrebno osvetliti.

Saponini so skupina sekundarnih metabolitov, ki je postala priljubljena v dvajsetih letih prejšnjega stoletja. Kot sestavine rastlin so se saponini uporabljali v ljudski medicini. Tudi danes saponini kažejo več vrst bioloških aktivnosti, ki se s pridom uporabljajo za človeške potrebe in so že vrsto let na tržišču (Hostettman in Marston, 1995). Dolgo časa se je domnevalo, da so saponini izključno produkti rastlin, šele v zadnjih desetletjih pa so se raziskave usmerile tudi v druge vrste organizmov. Morski organizmi sicer redkeje proizvajajo saponine, a obstajajo potencialne možnosti obstoja teh snovi v oblikah, ki do sedaj kopenskemu svetu še niso bile poznane. Zaradi posebnih razmer, ki vladajo pod gladino, so se v morju razvile drugačne in bolj kompleksne naravne snovi. Ker se pojavljajo vedno nove bolezni, odpornost proti povzročiteljem bolezni pa narašča, se je povečalo zanimanje za nova zdravila, pa tudi za prehranske in kozmetične izdelke, z novimi in boljšimi mehanizmi delovanja.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Biološko aktivne snovi iz spužev delujejo na različne načine: protibakterijsko, protivirusno, protiglivno, antiprotozojsko, protivnetno. Zaradi opažene velike hemolitične aktivnosti grobih ekstraktov spužve *Pandaros acanthifolium* v prejšnjih raziskavah smo ta mehanizem raziskali podrobneje. Iz omenjene vrste so izolirali več naravnih snovi, po strukturi opredeljenih kot steroidni saponini, ki so jih razdelili na skupino pandarozidov in akantifolizinov. Pri večini teh metabolitov so ugotovili *in vitro* aktivnost proti različnim parazitskim protozjem. Naša naloga je bila dobiti podatke o morebitni hemolitični aktivnosti teh snovi. Z vrsto hemolitičnih testov smo opredelili mehanizem citolize in delovanje steroidnih saponinov, poskušali pa smo najti tudi korelacijo med hemolitično aktivnostjo in kemijskimi strukturami omenjenih spojin, ter opisali razlike v hemolitični aktivnosti med posameznimi spojinami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SEKUNDARNI METABOLITI MORSKIH ORGANIZMOV

Morski organizmi, prav tako kakor kopenski, proizvajajo širok spekter sekundarnih metabolitov. Nekatere od teh snovi zaradi svoje posebne strukture kažejo potencial za razvoj biomedicinsko ali farmacevtsko pomembnih spojin (Rinehart, 1994). Danes je več kot 50 odstotkov zdravil na tržišču izoliranih iz naravnih virov ali umetno proizvedenih, s sintezo, pri kateri uporabljajo naravne produkte kot izhodne spojine (Pomponi, 2001). Sekundarne metabolite so izolirali iz različnih skupin morskih nevretenčarjev, in sicer iz spužev, koral, mehkužcev, iglokožcev, plaščarjev, rakov, mahovnjakov, morskih vetrnic in meduz (Bhakuni in Rawat, 2005). Spužve predstavljajo še posebno bogat vir sekundarnih metabolitov, z veliko strukturno diverziteteto in različnimi mehanizmi delovanja (Braekman in Daloze, 2004).

2.1.1 Sekundarni metaboliti spužev

Morske spužve so primitivni organizmi z relativno preprosto notranjo organizacijo. Posebno spužve brez spikul pogosto proizvajajo velike količine sekundarnih metabolitov (Faulkner, 1984). Razlog za tako veliko diverziteteto snovi, ki jih spužve proizvajajo, je v njihovem sesilnem načinu življenja, čemur so se morale prilagoditi z značilno kemijsko obrambo. Ta organizmom služi tako, da preprečuje napade plenilcev in inhibira njihove fiziološke procese. Onemogoča tudi obraščanje z epizoičnimi organizmi in infekcije s patogeni, vlogo pa ima tudi pri kompeticiji za prostor (Braekmann in Daloze, 1986).

Strukturno so biološko aktivne snovi spužev lahko nukleozidi, porfirini, terpenoidi, peroksidi, steroli, maščobne kisline, ciklični peptidi, alkaloidi in derivati aminokislin, ki so nemalokrat halogenirani. Sekundarni metaboliti iz spužev imajo širok spekter delovanja. Najbolj pogost način delovanja teh snovi je citotoksičnost in protitumorska aktivnost, saj lahko inhibirajo proliferacijo celic. Njihovo delovanje je lahko tudi protivirusno in protibakterijsko (McCaffrey in Endean, 1985), protiglivno (McCarthy s sod., 1992) in

antiprotozojsko (Gutierrez s sod., 2005). Zabeležili so tudi protivnetno (Schmidt in Faulkner, 1996), imunosupresivno (Gunasekera s sod., 1989) in nevrosupresivno delovanje (Nakamura s sod., 1984). Ker je primarna vloga teh snovi obramba organizma, so znani tudi njihovi učinki na rast in razmnoževanje drugih organizmov, kot so alge in nevretenčarji. Aktivne snovi preprečujejo ličinkam in odraslim živalim rast na površini spužev (Tsoukatou s sod., 2001).

Na nivoju celice imajo sekundarni metaboliti spužev več mehanizmov delovanja. Pogosto delujejo na citoskeletne elemente, ki imajo pomembno vlogo pri celičnih procesih, kot so delitev, gibanje in sekrecija metabolitov. Največkrat vplivajo na aktinske filamente in mikrotubule. Lahko jih stabilizirajo s spodbujanjem polimerizacije ali destabilizirajo s pospeševanjem depolimerizacije omenjenih struktur. Ob morebitnem citostatskem učinku lahko takšne snovi inhibirajo rast rakavih celic in zavrejo razvoj različnih tumorjev (Miller s sod., 2010). Odkrili so tudi biološko aktivne snovi, ki delujejo kot inhibitorji različnih encimov, npr. proteinskih serin/treoninskih ali tirozinskih kinaz, proteaz in fosfolipaz (Haefner, 2003), pa tudi acetilholinesteraze (Sepčić s sod., 1998). Delujejo lahko tudi na kanalčke (Morel s sod., 1997) in receptorje (Kobayashi s sod., 1986). Ugotovili so tudi direktno delovanje na DNA, lahko pa aktivne spojine iz spužev sprožijo tudi apoptozo (Hood s sod., 2001).

Morske spužve vsebujejo raznolike združbe mikroorganizmov, ki vključujejo bakterije, arheje, alge in glive. V nekaterih primerih lahko mikroorganizmi zavzemajo tudi do 40 % spužvine biomase in lahko znatno prispevajo k metabolizmu spužve (Taylor s sod., 2007). Pojav strukturno podobnih spojin pri nesorodnih spužvah, še posebej tistih, ki so bile prej poznane samo iz mikroorganizmov, je privedlo do hipoteze, da so te spojine pravzaprav mikroorganizemskega izvora. Izkazalo se je, da nekatere od spojin res proizvajajo simbiotske bakterije, a je to dejstvo prej izjema kot pravilo, vloga spužvinih mikroorganizmov pri sintezi metabolitov pa je še danes predmet znanstvenih razprav (Faulkner s sod., 2000).

2.1.2 Biotehnoška uporabnost sekundarnih metabolitov spužev

Zanimanje za spužve v farmaciji se je začelo v 50. letih prejšnjega stoletja z odkritjem spongotimidina in spongouridina iz morske spužve *Cryptotethya crypta*. Ti nukleozidi so bili osnova za sintezo zdravil vidarabina in citarabina, ki imata antikancerogeno in protivirusno delovanje (Bergmann in Feeney, 1955). Citarabin se trenutno uporablja pri terapiji pacientov z levkemijo in limfomom, eden od njegovih derivatov pa je bil odobren za uporabo pri pacientih z različnimi oblikami raka (Schwartzmann, 2002). Vidarabin je učinkovit pri zdravljenju virusnih okužb, ki jih povzročata *Herpes simplex* in *Herpes zoster* (Whitley, 1980). Še danes spadata ti dve zdravili med redke snovi izolirane iz morskih organizmov, ki so jih dejansko patentirali za biomedicinske aplikacije (Laport s sod., 2009).

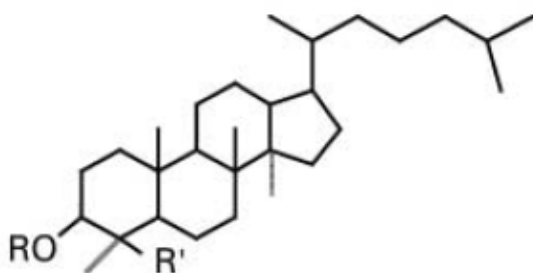
Večji delež spojin je v kliničnih in predkliničnih testih. Med bolj preučeni snovmi sta manoalid, ki so ga izolirali iz spužve *Luffariella variabilis* in je spojina, potencialno uporabna kot protivnetna snov, ter discodermolid, ki je imunosupresivna in citotoksična spojina iz spužve *Discodermia dissolute* (Thakur in Müller, 2004). Iz japonske spužve *Halichondria okadai* so izolirali več halihondrinov, od katerih je halihondrin B pokazal največjo citotoksično aktivnost. Trenutno je omenjena spojina v kliničnih preiskavih raziskav (Hart s sod., 2000). Potencialen vpliv na proliferacijo kažejo tudi latrunkulini, ki inhibirajo polimerizacijo aktina (Spector, 1983). Iz spužve *Dysidea avara* so izolirali spojino avarol, ki kaže protibakterijsko in protiglivno aktivnost (Seibert s sod., 1985), inhibira pa tudi HIV-1 reverzno transkriptazo (Hirsch s sod., 1991). Pri večih vrstah redu Verongida so odkrili spojino psamaplin A, ki je bila vodilna struktura za sintetično antikancerogeno snov, potencialno pa je uporabna tudi kot antibiotik proti bakteriji *Staphylococcus aureus* (Kim s sod., 1998). Primer spojine z imunostimulatornimi lastnostmi je agelasphin iz spužve *Agelas mauritanus*. Njegov sintetični derivat KRN 7000 trenutno predstavlja potencialno spojino, ki aktivira naravne celice ubijalke, kar vodi v zaščito pred avtoimunskimi boleznimi in rakom (Banchet-Cadeddu s sod., 2011). V kliničnih testih proti astmi in vnetju kože in oči se je izkazala tudi spojina contignasterol iz spužve *Petrosia contignata* (Bramley s sod., 1995).

Kljub veliki raznolikosti spojin, ki jih proizvajajo spužve in velikemu številu na novo odkritih spojin vsako leto, je v resnici le malo bioloških snovi, ki izvirajo iz spužev našlo svoje mesto v biomedicini (Sepčić s sod., 2010). Dejansko uveljavljanje biološko aktivnih snovi je problematično iz več razlogov. Največja ovira je omejena razpoložljivost večjih količin materiala, saj so za potrebe raziskav in potencialno komercialno uporabo potrebne velike količine biomase spužev. Večina obetajočih spojin ima tudi zelo kompleksno zgradbo in je zato kemična sinteza ekonomsko vprašljiva (Brümmer in Nickel, 2003). Obstaja več možnih alternativnih rešitev. Nekatere od teh so vodne kulture spužev *in situ* in gojenje *in vitro*, ki zajema proizvodnjo biomase spužev, pa tudi produkcijo sekundarnih metabolitov iz celičnih kultur (Schröder s sod., 2003).

2.2 STEROIDNI SAPONINI

2.2.1 Struktura steroidnih saponinov

Saponini so skupina amfipatičnih glikozidov, ki jih sestavlja hidrofobna nesladkorna komponenta, imenovana sapogenin. V primeru steroidnih saponinov to komponento predstavlja policiklični steroidni skelet (Oleszek in Hamed, 2010).



Slika 1: Osnovna struktura steroidnih sapogeninov (Francis s sod., 2002).

Aglikon lahko vsebuje eno ali več nenasičenih vezi. Na steroidni skelet je vezana ena ali več sladkornih komponent, ki so lahko razvejane ali linearne. Monosaharidi, ki se lahko

pojavljajo v oligosaharidnih vejah, so največkrat D-glukoza, D-galaktoza, D-glukuronska kislina, D-galakturonska kislina, D-ksiloza, L-ramnoza, lahko pa tudi L-arabinoza in D-fukoza. Sladkorji v saponinih morskih organizmov so pogosto acilirani, metilirani ali sulfatirani. Sladkorne verige večine saponinov so kratke in vsebujejo od 2 do 5, največ pa 10 monosaharidov. Glede na število oligosaharidnih verig jih razdelimo na monodezmotske, bidezdmotske in tridezdmotske. Monodezmotski saponini imajo le eno oligosaharidno verigo, ki je navadno pripeta na C-3 mestu z glikozidno vezjo. Steroidni saponini te vrste so spirostanskega tipa. Bidezdmotski saponini imajo prvo oligosaharidno verigo na mestu C-3, drugo pa na mestu C-26, obe vezani preko estrske vezi. Takšni steroidni saponini so furostanskega tipa in večinoma zaradi dodatne verige nimajo običajnih karakteristik saponinov, so pa tudi manj razširjeni. Tridezdmotski saponini imajo vezane tri oligosaharidne verige in so v naravi redki. Funkcionalne skupine in s tem narava aglikona, pa tudi število sladkornih verig znotraj steroidnih saponinov se razlikuje, posledica pa je velika diverziteteta strukture in funkcije omenjenih spojin (Hostettmann in Marston, 1995).

2.2.2 Hemolitična aktivnost saponinov

Saponini imajo mnogo različnih aktivnosti. V živalskih tkivih lahko vplivajo na rast in reprodukcijo, imunski in živčni sistem, privzem nutrientov skozi membrano črevesnih celic, prebavo proteinov in metabolizem holesterola. Delujejo tudi kot antioksidanti, predvsem pa je znana njihova sposobnost permeabilizacije in litični učinek na membrano eritrocitov (Francis s sod., 2002).

Zaradi prisotnosti polarnih in nepolarnih skupin saponini delujejo kot surfaktanti, kar pomeni, da so površinsko aktivne snovi. Saponini iz membrane iztrgajo lipide in na ta način poškodujejo membrano. Ta pojav vključuje zmanjšanje površinske napetosti med vodno in lipidno fazo eritrocitne membrane, kar povzroči emulzijo lipidov in njihovo izključitev iz membrane. Ob vezavi saponina na membrano se zaradi nastanka velikih por poveča permeabilnost membrane za ione (Hostettmann in Marston, 1995).

Hemolitična aktivnost saponinov naj bi bila posledica afinitete aglikonske molekule do fosfolipidov v membrani, predvsem do holesterola, s katerim tvorijo netopne komplekse. Afiniteta saponinov do membrane je večja pri celicah, ki imajo membrane bolj bogate s holesterolom (Glauert s sod., 1962). Saponini ob vezavi na membrano človeških eritrocitov tvorijo manjše pore, diametra 4-5 nm, pri umetnih membranah do 8 nm (Seeman s sod., 1973). Lezije, ki jih povzroči saponin v membrani, so micelom podobni agregati saponinov in holesterola v ravnini membrane. Molekule saponina so predvidoma razporejene v obroč, njihove hidrofobne verige pa so povezane s holesterolom (Bangham & Horne, 1962).

Hemolitična aktivnost se razlikuje glede na strukturo glikozida. V raziskavi časovnih potekov hemolize različnih saponinov so ugotovili, da steroidni saponini dosežejo maksimalno vrednost hemolize dosti prej kot njim sorodni triterpenski steroli. Zaradi steroidnega obroča naj bi imeli steroidni saponini večjo afiniteto do holesterola v membrani eritrocita (Takechi s sod., 1992). Bolj hemolitični so tisti steroidni saponini, ki imajo le eno sladkorno verigo, manj pa tisti, ki imajo vezanih več takih verig. Učinek hemolize se zmanjša z dolžino in poveča z razvejanostjo sladkorne verige (Hostettmann in Marston, 1995).

2.3 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI IZ SPUŽVE *Pandaros acanthifolium*

Pomemben sekundarni metabolit, ki so ga kot prvega odkrili v spužvi *Pandaros acanthifolium*, je akantifolicin. Ta spojina je derivat okadaične kisline. Neobičajna pri njej je episulfidna funkcionalna skupina in zelo dolg ogljikov skelet. Ker so podobne polietske spojine izolirali tudi iz nekaterih dinoflagelatov, so domnevali, da akantifolicin pravzaprav izvira iz mikroorganizmov. Akantifolicin ima citotoksično, antibiotsko in protitumorsko aktivnost proti sesalčjim celicam. Protitumorsko aktivnost so ugotovili proti celicam človeškega karcinoma nazofarinksa in limfoidni levkemiji ter levkemiji pri miših. (Schmitz, 1981). Akantifolicin deluje tudi inhibitorno na proteinsko fosfatazo 1 (Holmes s sod., 1990). Prav ta aktivnost naj bi bila odgovorna za pojav t.i. diarejogenega sindroma zastrupitve s školjkami ali DSP (Thomson, 1993).

Organske in vodne ekstrakte biološko aktivnih snovi iz spužve *Pandaros acanthifolium* so testirali na več načinov. Rezultati so pokazali, da imajo spojine zelo močno hemolitično aktivnost, organski ekstrakti pa kažejo tudi šibko inhibicijo encima acetilholin esteraze. Vodni ekstrakti močno inhibirajo proteinsko fosfatazo1, za razliko od organskih ekstraktov, ki encim inhibirajo v manjši meri. Protibakterijske aktivnosti niso zasledili (Sepčić s sod., 2010).

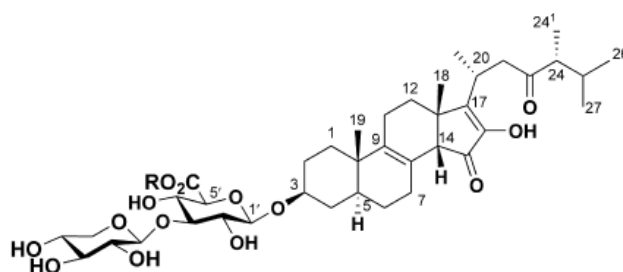
Steroidne in triterpenske saponine so do danes našli le pri spužvah reda *Astrophorida* (Takada s sod., 2002). Prvi saponin iz spužev nasploh je bil sarasinozid A, ki so ga izolirali iz rodu *Asteropus* (Schmitz, 1988). Saponine so kasneje odkrili še v rodu *Erylus* (Takada s sod., 2002) in v rodu *Melophlus* (Dai s sod., 2005). Nedavno odkrita prisotnost saponinov pri spužvi *Pandaros acanthifolium* je bila nepričakovana, saj spužve iz redu *Poecilosclerida*, kamor omenjena spužva spada, proizvajajo biološko aktivne snovi, med katerimi so v največji meri zastopani gvanidinski alkaloidi (Berlinck s sod., 2008). Nedavne filogenetske raziskave sicer razdvajajo rod *Pandaros* od reda *Poecilosclerida*. Zdi se, da so veliko bolj sorodne spužvam *Astrophorida*, ki proizvajajo različne saponine (Erpenbeck in Van Soest, 2005).

Spojine, ki so jih nedavno izolirali iz spužve *Pandaros acanthifolium*, so dveh vrst. Večino biološko aktivnih komponent predstavlja skupina steroidnih saponinov, poimenovanih pandarozidi in njihovih metilnih estrov. V manjši meri so zastopani akantifolizini in njihovi metilni estri (Regalado s sod., 2010).

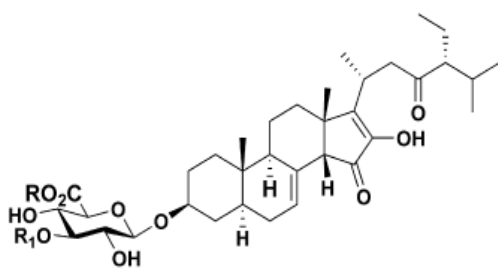
2.3.1 Pandarozidi

Iz spužve *Pandaros acanthifolium* so izolirali veliko družino steroidnih saponinov, skupaj 19 podobnih spojin, ki so jih poimenovali pandarozidi, vključno z njihovimi metilnimi estri. Njihove strukture so bile določene spektroskopsko, z 1D in 2D NMR spektroskopijo in HREMSIS analizo. Vsem pandarozidom je skupen redek, 2-hidroksiciklopentenonski D obroč, s 14β konfiguracijo in *cis* C/D stičišče obroča. Ta vrsta spužve je do sedaj edini

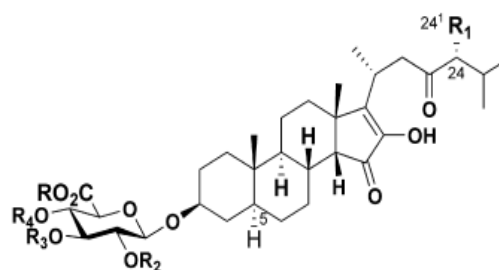
poznani morski organizem, ki proizvaja steroidne saponine s takšno vrsto aglikona. Steroidni skelet je lahko holestanskega, ergostanskega ali stigmastanskega tipa. Nekateri od pandarozidov vsebujejo dodatne dvojne vezi v B in C obroču steroidnega skeleta, kar povezujejo z njihovo biološko aktivnostjo. Značilna za vse pandarozide je tudi glukuronska kislina na C-3. Prvi izolirani pandarozidi so bili pandarozidi A-D in njihovi metilni estri. Kasneje so izolirali tudi skupino pandarozidov E-J, ter njihovih metilnih estrov. Razlike med prvo in drugo skupino so v B in C obročih steroidnega skeleta, alkilni verigi aglikonske molekule in sladkornih ostankih. Pandarozidi E-J vsebujejo prvič v tej družini odkrite ramnozo in ksilozo kot sladkorne ostanke (Regalado s sod., 2009).



Pandarozida E in F



Pandarozid G



Pandarozidi A, B, C, D, H, I, J

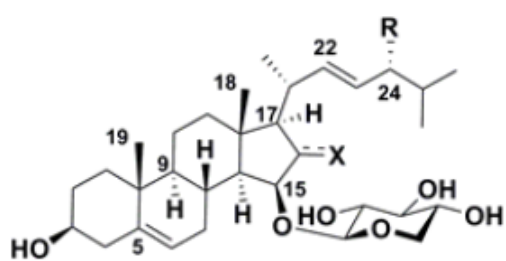
Slika 2: Osnovne strukture pandarozidov in ustreznih metilnih estrov (Regalado s sod., 2009).

Večina teh komponent kaže zanimivo antiprotozojsko aktivnost *in vitro*, vsaj proti trem parazitskim protozom. Trenutne raziskave kažejo, da vsi pandarozidi, z izjemo pandarozida H, inhibirajo rast parazitskih protozov *Plasmodium falciparum*, *Leishmania*

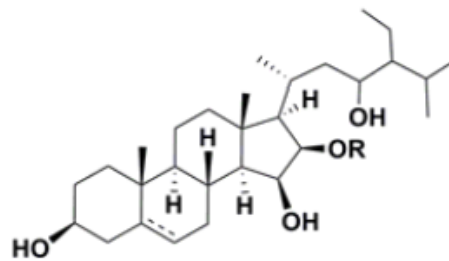
donovani, *Trypanosoma brucei rhodesiense* in *Trypanosoma cruzi*. Prva skupina izoliranih pandarozidov A-D je kazala le šibko aktivnost proti omenjenim organizmom, ne pa tudi protitumorske aktivnosti proti trem različnim človeškim tumorskim celičnim linijam, v koncentracijah manjših od 10 μ g/ml. Največjo aktivnost med pandarozidi imajo pandarozid G, metilni ester pandarozida G in pandarozid F. Ti so med vsemi tudi najbolj citotoksični za sesalčji skeletni mioblastom. Antiprotozojska aktivnost naj bi bila posledica dodatne dvojne vezi na B obroču, ki jo omenjeni pandarozidi imajo, za razliko od šibko aktivnih pandarozidov A-D ter I-J, ki te vezi nimajo. Opazili so tudi večjo antiprotozojsko aktivnost in citotoksičnost metilnih estrov, v primerjavi s samimi pandarozidi. Metilnim estrom struktura omogoča lažji prehod v celico, kjer se hidrolizirajo v spojine s citotoksično aktivnostjo. Vse spojine so prav tako testirali proti rekombinantnemu encimu za biosintezo maščobnih kislin organizma *P. falciparum* za oceno njihovega potenciala za preprečevanje malarije. Nobena od testiranih spojin ni bila učinkovita pri uporabljeni koncentraciji 20 μ g/ml (Cachet s sod., 2009).

2.3.2 Akantifolizini

Za pandarozidi so izolirali novo skupino sedmih steroidnih saponinov, poimenovanih akantifolizini A-F in njihovih metilnih estrov. Tudi njihovo strukturo so določili s pomočjo 1D in 2D NMR spektroskopije in HREMSIS analize. Za razliko od pandarozidov so akantifolizini brez ciklopentenonskega D obroča. Njihova skupna značilnost je C-15 in C-16 dioksidiran D obroč, ki je bil prej znan le v primeru saponinov iz morskih zvezd. Značilen je en sladkorni ostanek na C-15 ali C-16. Pri nekaterih akantifolizinih so opazili antiprotozojsko aktivnost in citotoksičnost spojin, a v manjši meri kakor pri pandarozidih (Regalado s sod., 2011).



Akantifolizini A, B, C



Akantifolizini D, E, F

Slika 3: Osnovne strukture akantifolizinov in ustreznih metilnih estrov (Regalado s sod., 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

EDTA	Kemika, Hrvaška
epruvete	Eppendorf, Nemčija
etanol	Merck, Nemčija
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
kalcein	Sigma, ZDA
kloroform	Merck, Nemčija
metanol	Merck, Nemčija
natrijev klorid	Merck, Nemčija
natrijev hidroksid	Merck, Nemčija
POPC (1 palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero- 3-fosfoholin)	Avanti Polar Lipids, ZDA
Sephadex G-50-Medium	Sigma, ZDA
Steklene kapilare	Euroglass, Slovenija
PEG (300, 600, 1450, 3350, 4000, 8000 Da)	Merck, Nemčija
SM (iz svinjskih možgan)	Avanti Polar Lipids, ZDA
Tris	Merck, Nemčija
Triton-X-100	Sigma, ZDA
vodikov klorid	Merck, Nemčija

3.1.2 Raztopine

Fiziološka raztopina	0,9 % NaCl
Pufer za eritrocite	130 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,4

Pufer za vezikle	140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0
Raztopina kalceina	80 mM; pH 8,0
Raztopina detergenta Triton-X-100	100 mM

3.1.3 Laboratorijska oprema

avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
centrifuga	Centric 322A, Tehnica, Slovenija
hladilnik, 4°C	Gorenje, Slovenija
magnetno mešalo	Tehnica MM 540, Slovenija
pH meter	Mettler Toledo, Nemčija
rotavapor	R-134 in R-200, Buchi, Švica
sonikator	Vibracell Ultrasonic Disintegrator, Sonics and materials, ZDA
spektrofluorimeter	Jasco FP-750, Jasco Ltd, Essex, UK
spektrofotometer	UV-2101 PC, Shimadzu, Japonska
tehnica	Sartorius MC 210P, Nemčija
vodna kopel	B-480, Buchi, Švica
vibracijski stresalnik	Vibromix 114 EV, Tehnica, Slovenija
zamrzovalnik, -20°C	Gorenje, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Izvor spužve in steroidnih saponinov

Primerke morske spužve vrste *Pandaros acanthifolium* so nabrali v poletju leta 2003, na otoku Martinik v Karibskem morju, v globini 19 metrov. Spužvo je določil dr. Jean Vacelet iz Oceanografskega inštituta v Marseilleu. Iz biološkega materiala so izolirali

skupino novih steroidnih saponinov, ki so jih poimenovali pandarozidi in njihovih metilnih estrov, določili pa so jim tudi strukturo. Kasneje so izolirali tudi drugo skupino steroidnih glikozidov, ki so jih poimenovali akantifolizini (Regalado et al, 2010). Dr. Regalado z univerze v Havani (Kuba) nam je poslal 13 različnih saponinov iz omenjene spužve, za katere smo opravili hemolitične teste. Iz skupine akantifolizinov smo testirali akantifolizine A, B, C in D, iz skupine pandarozidov pa pandarozide E, F, I in G ter metilne estre pandarozidov A, E, F, I in G.

3.2.2 Test hemolitične aktivnosti steroidnih saponinov iz spužve *Pandarus acanthifolium*

Za testiranje hemolitične aktivnosti smo uporabili svežo govejo kri, kateri smo pri odvzemu dodali citrat, ki prepreči strjevanje. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino. Izvedli smo petminutno centrifugiranje pri 2.500 obratov na minuto in eritrocite uporabili za testiranje, ali pa jih spravili v Alseverjevem konzervansu v hladilnik. Preden smo eritrocite ponovno uporabili, smo jih dvakrat sprali s fiziološko raztopino, nato pa resuspendirali v pufru za eritrocite (130 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4). Iz tako pripravljenih eritrocitov smo pripravili suspenzijo, ki je imela navidezno absorpcijo 0.5 pri 700 nm.

Časovni potek spremembe absorpcije zaradi hemolize smo spremljali na spektrofotometru 5 minut, pri 700 nm. V kiveto smo odpipetirali 1 ml eritrocitne suspenzije, kateri smo dodali različne volumne steroidnih saponinov, raztopljenih v metanolu. Volumen saponinov, ki smo ga dodali eritrocitni suspenziji, smo postopno povečevali. Začetni volumen dodanega vzorca je bil 10 μ L. Tiste saponine, ki pri omenjenem volumnu vzorca niso bili aktivni, smo testirali s 50 μ L dodanega vzorca, nato pa še s 100 μ L. Za vsakega izmed trinajstih posameznih vzorcev smo izvedli meritev v treh ponovitvah.

Na ta način smo določili, kateri izmed trinajstih začetnih steroidnih saponinov sploh kaže hemolitično aktivnost. Tiste, ki niso bili aktivni niti pri dodanem volumnu 100 μ L, smo

izločili kot neaktivne. Vzorce, ki so bili hemolitično aktivni, smo redčili na ustrezne volumne toliko časa, da je navidezna absorpcija eritrocitne suspenzije padla na polovico svoje vrednosti v približno 60-90 sekundah. Iz rezultatov smo odčitali polovičen čas hemolize (t_{50}), tj. čas, pri katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pade na polovico svoje začetne vrednosti, v našem primeru na 0,250.

3.2.3 Ocena velikosti por z osmoprotektanti

Za oceno velikosti morebitnih por, ki jo hemolitični saponini iz morske spužve *Pandaros acanthifolium* naredijo v membrano eritrocitov, smo uporabili osmoprotektante različnih velikosti, in sicer serijo polietilenglikolov z molekulskimi masami: 300, 600, 1450, 3350, 4000 in 8000 Da. Ustrezno količino vsakega od polietilenglikolov smo raztopili v Tris pufru. Koncentracija polietilenglikolov v pufru je bila 30 mM. V 1 ml eritrocitne suspenzije, ki smo jo odpipetirali v kiveto, smo dodali 30 μ L vsakega od polietilenglikolov, raztopljenih v pufru. Končna koncentracija vsakega od osmoprotektantov v kiveti je bila 1 mM. Dodali smo še steroidne saponine v različnih koncentracijah. Sledile so ponovne meritve hemolize v kiveti s spektrofotometrom pri 700 nm z navidezno absorpcijo 0,5, in sicer 10 minut.

3.2.4 Inhibicija hemolize z lipidi

3.2.4.1 Priprava SUV veziklov (majhni unilamelarni vezikli)

Lipidne vezikle smo pripravili iz lipidov z znanimi molskimi masami. Pripravili smo lipidne vezikle treh vrst. Prvi so vsebovali čisti sfingomielin, drugi čisti POPC, tretji pa mešanico SM in POPC v molskem razmerju 1:1. Ustrezno količino lipidov v obliki prahu, shranjenih na -80°C , smo zatehtali, nato pa raztopili v 1 ml kloroforma. Raztopine smo na rotavaporju sušili okrog 3 ure, v bučki z znižanim tlakom, oziroma toliko dolgo, dokler se

na površini bučke ni ustvaril lipidni film. Dodali smo 1 ml Tris pufra za vezikle in 15-20 steklenih kroglic, zatem pa stresali na vibracijskem stresalniku 1-2 minuti. Tako smo dobili suspenzijo multilamelarnih veziklov.

Suspenzijo multilamelarnih veziklov smo 30 minut sonicirali na ledu z 10-sekundnimi pulzi (Lasch, 1997). Tako smo dobili SUV (majhne unilamelarne vezikle), ki smo jih dali na vodno kopel za 45 minut pri temperaturi 40°C in centrifugirali 5 minut pri 6000 obratih na minuto. Supernatant smo prestavili v čiste epice in vezikle shranili na 4 °C ali uporabili za meritve. Končna koncentracija veziklov je bila 10 mg/ml.

3.2.4.2 Merjenje inhibicije hemolize

K 1 ml eritrocitne suspenzije smo v kiveto dodali določeno količino SUV in tisto koncentracijo saponina, pri kateri je navidezna absorbcija padla na polovico svoje vrednosti v 60-90 sekundah. Na spektrofotometru smo spremljali potek hemolize, in sicer 10 minut pri 700 nm. Ob vezavi saponina na lipidni vezikel, saponin ni več na razpolago za hemoliziranje eritrocitov, zato pride do inhibicije hemolize.

3.2.5 Test sproščanja kalceina

3.2.5.1 Priprava SUV veziklov s kalceinom

Vezikle s kalceinom smo pripravili na isti način, kot je opisano v točki 3.2.4.1, le da smo namesto pufra za vezikle, k lipidnemu filmu v bučki dodali 80 mM raztopino kalceina. Na koncu smo vezikle ločili od kalceina z gelsko kromatografijo. Uporabili smo 10-mililitrsko gelsko kolono, napolnjeno s Sephadexom G-50. Kolono smo dvakrat sprali s Tris pufrom, nato pa nanjo nanесли 300 ml raztopine veziklov s kalceinom. Frakcije, ki so vsebovale

vezikle smo shranili na 4 °C ali uporabili za testiranje sproščanja kalceina iz veziklov. Končna koncentracija veziklov s kalceinom je bila 10 mg/ml.

3.2.5.2 Test sproščanja kalceina

Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov smo spremljali s spektrofluorimetrom Jasco FP-750. Če saponini lizirajo membrano veziklov, se kalcein sprošča iz veziklov, posledica pa je povečana relativna fluorescenca na račun »de quenchinga«. Uporabili smo kvarčno kiveto z magnetnim mešalom, v katero smo dali 1ml pufru za vezikle. Dodali smo 5 µl SUV in odčitali začetno fluorescenco. K pufru in veziklom smo nato dodali še različne koncentracije steroidnih saponinov. Emisijo smo merili pri valovni dolžini 520 nm, ekscitacijska valovna dolžina je bila 485 nm. Kinetiko sproščanja kalceina smo spremljali 10 minut. Po koncu vsakega poskusa smo dodali Triton-X-100, ki povzroči popolno lizo veziklov. Izračunali smo odstotek sproščenega kalceina po enačbi:

$$\% \text{ sproščenega kalceina} = (F_{izm} - F_{min}) / (F_{max} - F_{min}) \times 100 \quad \dots(1)$$

F_{izm} -najvišja izmerjena vrednost fluorescence po dodatku saponina

F_{max} - najvišja izmerjena vrednost fluorescence po dodatku detergenta Triton-X-100

F_{min} -začetna fluorescenca

4 REZULTATI

4.1 TEST HEMOLITIČNE AKTIVNOSTI

V tabeli 1 je prikazana prisotnost oz. odsotnost hemolitične aktivnosti testiranih spojin. Hemolitično aktivnost imajo le steroidni saponini iz skupine akantifolizinov. Nobeden od predstavnikov skupine pandarozidov niti pri največji koncentraciji ni bil hemolitično aktiven.

Preglednica 1: Hemolitična aktivnost steroidnih saponinov.

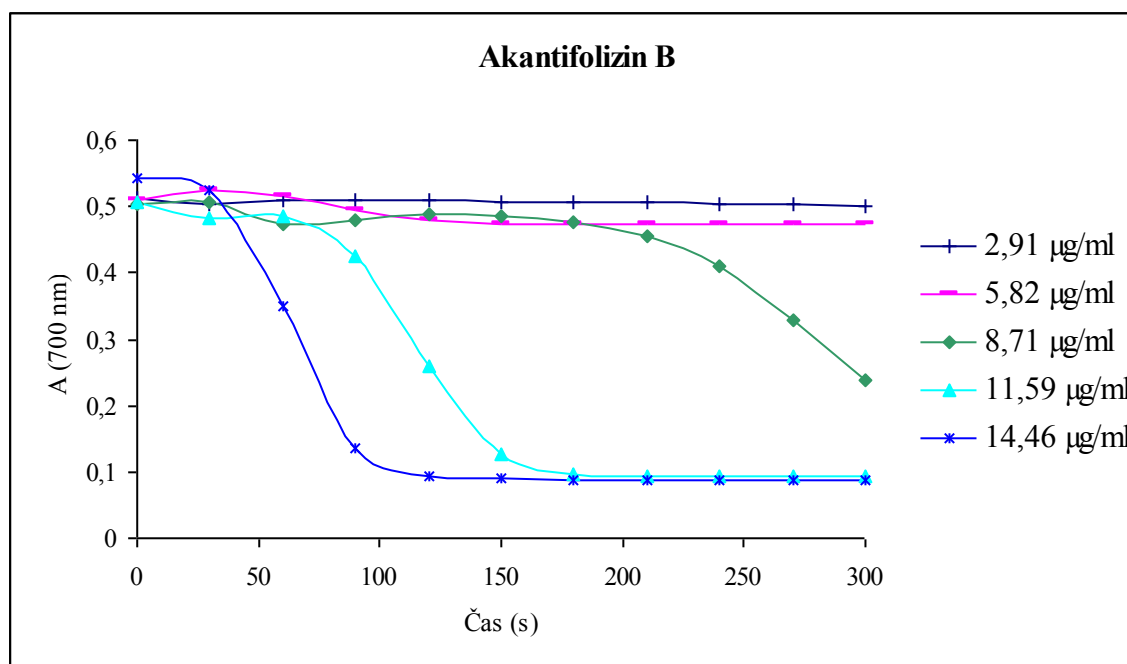
Steroidni saponin	Hemolitična aktivnost
Akantifolizin A	+
Akantifolizin B	+
Akantifolizin C	+
Akantifolizin D	+
Metilni ester pandarozida A	–
Pandarozid E	–
Metilni ester pandarozida E	–
Pandarozid F	–
Metilni ester pandarozida F	–
Pandarozid G	–
Metilni ester pandarozida G	–
Pandarozid I	–
Metilni ester pandarozida I	–

Za akantifolizine B, C, in D smo opravili nadaljnje hemolitične teste. Akantifolizina A kljub opaženi hemolitični aktivnosti nismo vključili v nadaljnje teste zaradi majhne količine razpoložljivega vzorca.

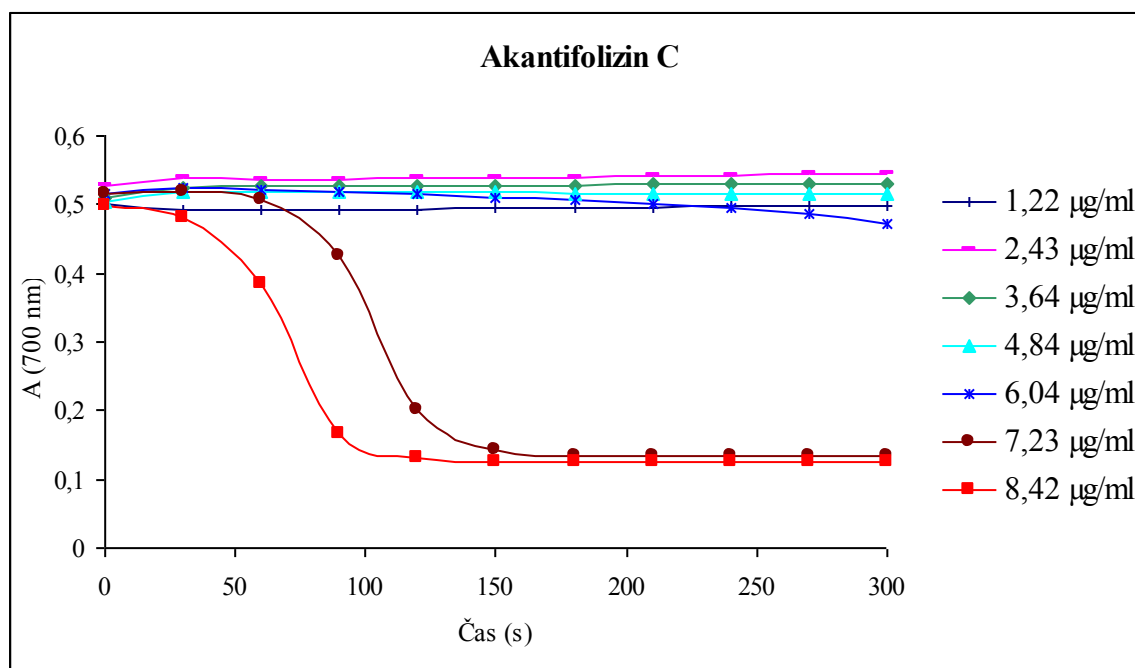
Slike 4, 5 in 6 prikazujejo časovne poteke hemolize zaradi delovanja akantifolizinov B, C in D. Časovni potek smo spremljali 5 minut pri valovni dolžini 700 nm. Ugotavljali smo odvisnost hitrosti hemolize od koncentracije saponina v vzorcu.

Krivulja je sigmoidna, s kratko fazo lag, ki ji sledi liza eritrocitov, krivulja pa se nato približuje asimptotični vrednosti. Z večanjem koncentracije akantifolizinov v vzorcu se je postopoma povečevala tudi hitrost hemolize.

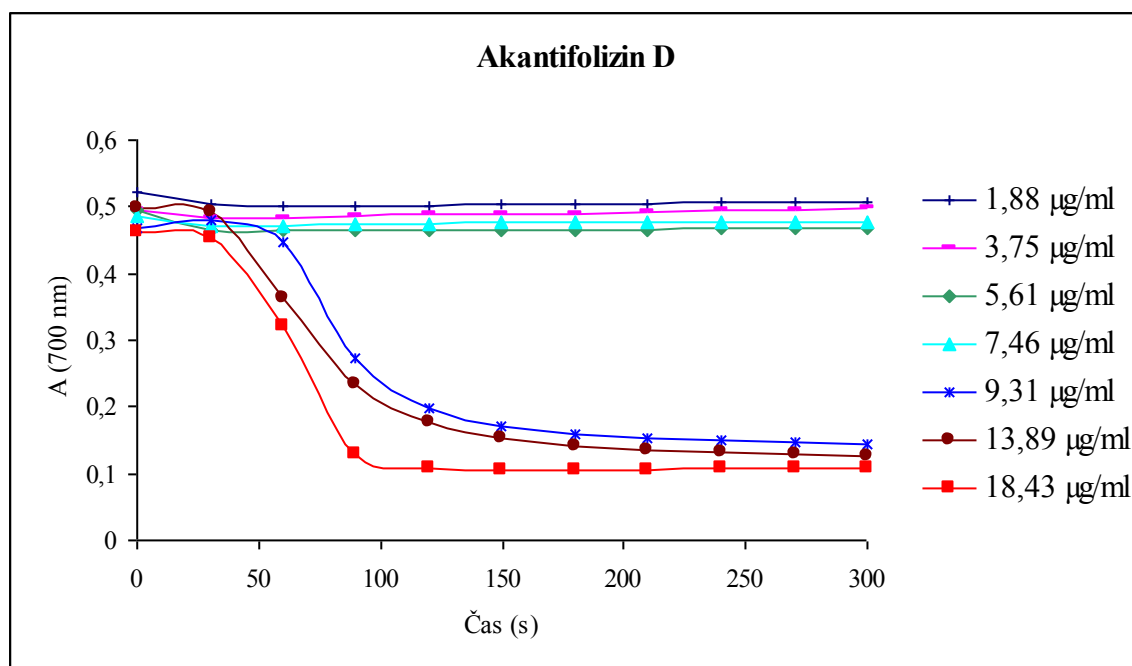
Pri zelo nizkih koncentracijah hemolize ni bilo. Najmanjša koncentracija, pri kateri je bilo zaznati hemolizo, je bila za akantifolizin B 8,71 $\mu\text{g/ml}$, za akantifolizin C 7,23 $\mu\text{g/ml}$ in za akantifolizin D 9,31 $\mu\text{g/ml}$. Pri vseh treh akantifolizinih smo opazili najhitrejši padec navidezne absorpcije pri največji dodani koncentraciji posameznega saponina.



Slika 4: Časovni potek hemolize pri različnih koncentracijah akantifolizina B.

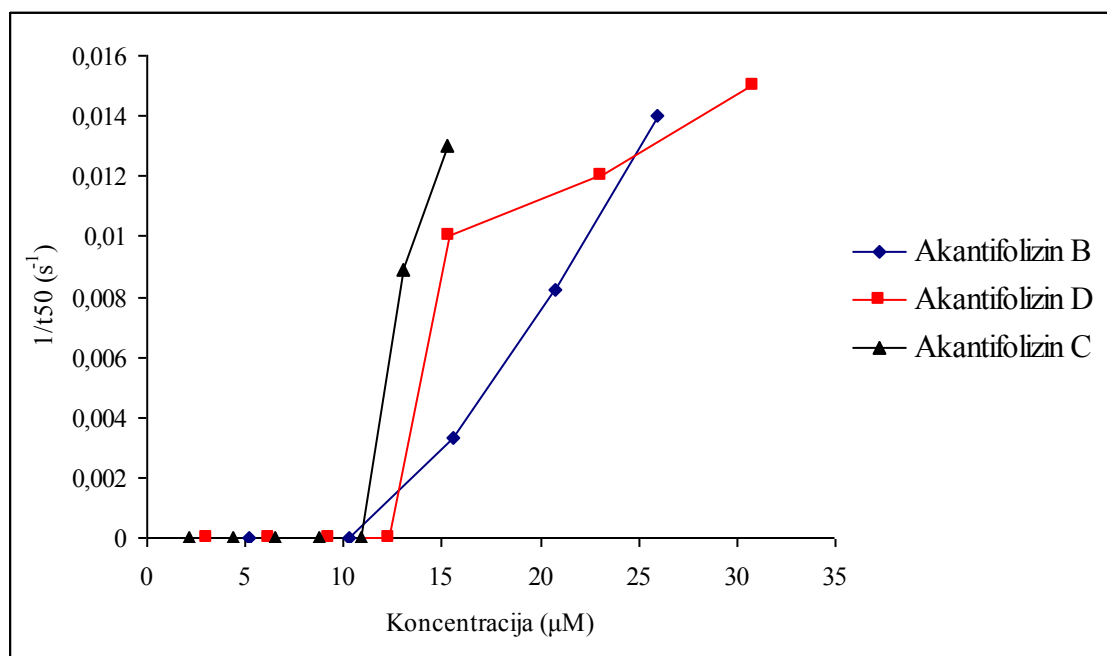


Slika 5: Časovni potek hemolize pri različnih koncentracijah akantifolizina C.



Slika 6: Časovni potek hemolize pri različnih koncentracijah akantifolizina D.

Koncentracijo dodanega saponina smo postopoma povečevali, dokler nismo dosegli padca navidezne absorpcije na polovico svoje vrednosti, do česar je prišlo v približno 60 do 90 sekundah. Iz krivulj časovnih potekov hemolize smo nato odčitali polovični čas hemolize, pri katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pade na polovico svoje začetne vrednosti. Na sliki 7 so prikazane recipročne vrednosti polovičnih časov hemolize v odvisnosti od koncentracije akantifolizinov B, C in D.

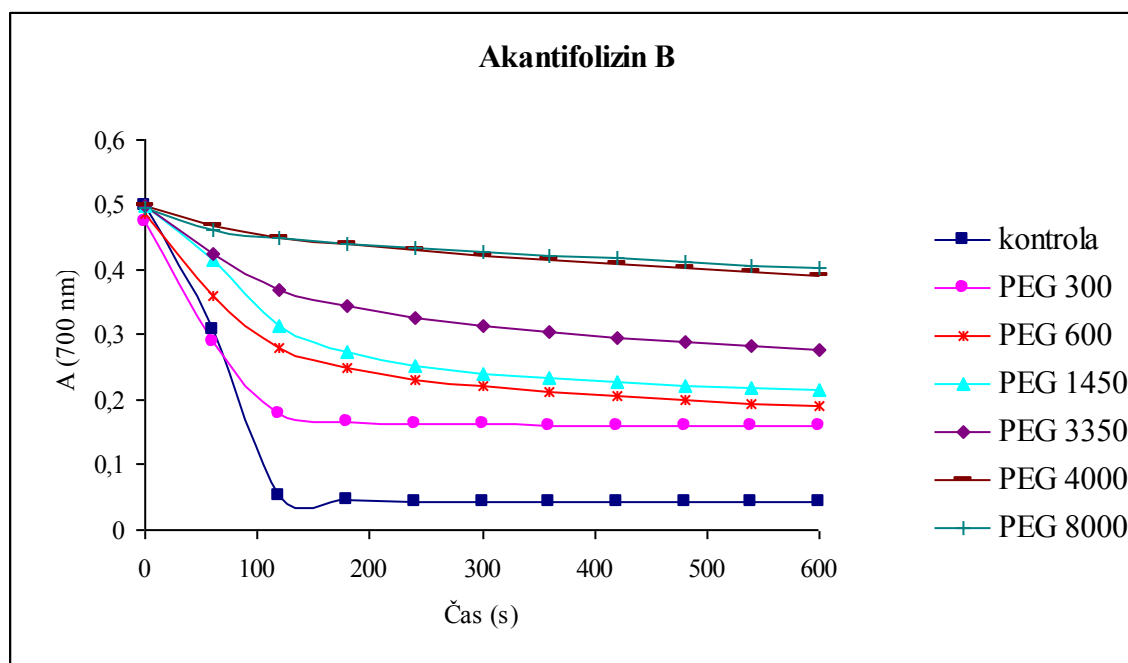


Slika 7: Recipročne vrednosti polovičnih časov hemolize v odvisnosti od koncentracije akantifolizina B, C in D.

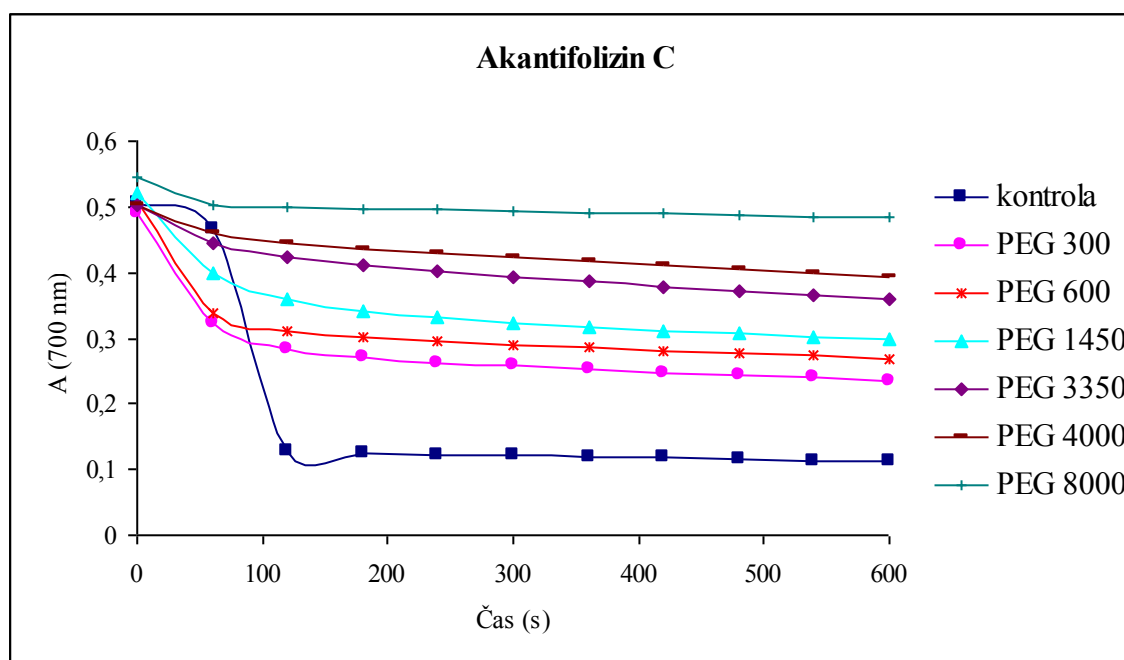
4.2 OCENA VELIKOSTI POR Z OSMOPROTEKTANTI

S testom inhibicije hemolize zaradi osmoprotektantov smo ugotavljali, kako dodatek osmoprotektantov vpliva na časovni potek hemolize, ki smo ga spremljali 10 minut pri valovni dolžini 700 nm in glede na zmanjšano hitrost hemolize poskušali ugotoviti, kakšna je velikost pore, ki jo v membrani naredi določena snov. Na slikah 8, 9 in 10 so prikazani časovni poteki hemolize ob dodatku serije polietilenglikolov z naraščajočimi molskimi masami, ki so znašale 300, 600, 1450, 3350, 4000 in 8000 Da. Do inhibicije hemolize pride, ker ob dodatku osmoprotektanta le ta prepreči porušenje osmotskega ravnovesja v celici in posledično upočasni hemolizo.

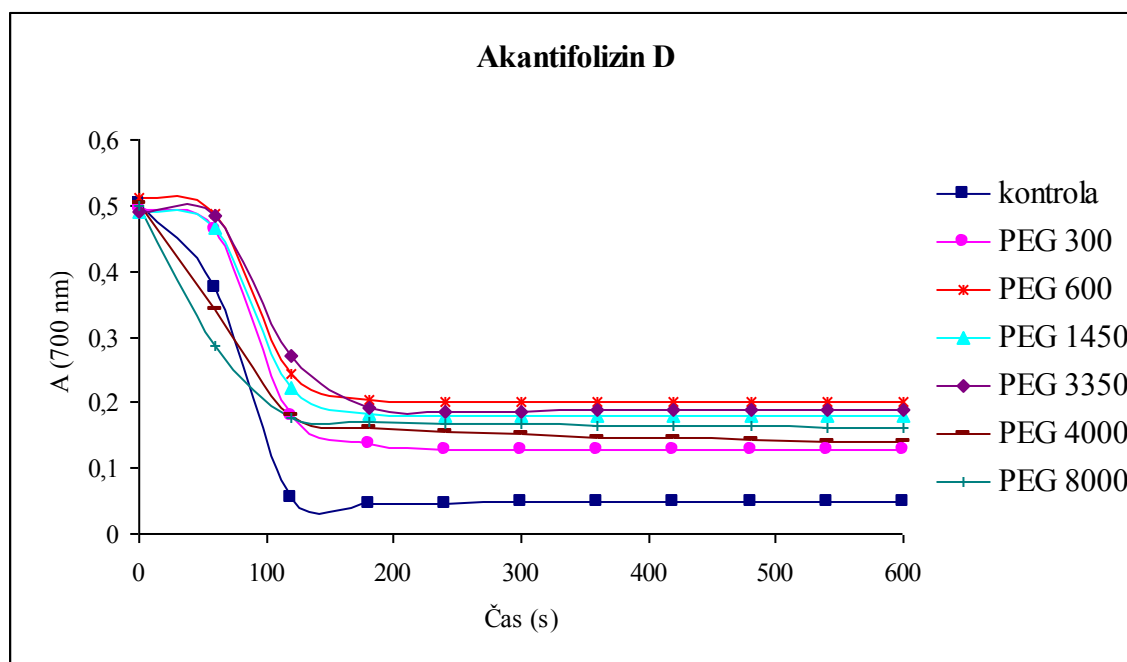
Pri akantifolizinu B in C se je z večanjem molske mase dodanega osmoprotektanta zmanjšala tudi hitrost hemolize (slika 8 in 9). Ob kontrolni koncentraciji akantifolizina B in C je navidezna absorbcija padla na polovico svoje vrednosti po približno 90 sekundah. Že ob dodatku PEG 300 se je ta vrednost zelo povečala, ob dodatku PEG 600 pa navidezna absorbcija ni dosegla polovične vrednosti niti v 10 minutah. Ob dodatku PEG 4000 in PEG 8000 se je hemoliza skoraj popolnoma zaustavila. Pri akantifolizinu D nismo opazili zmanjšane hitrosti hemolize, če smo uporabili večjo molsko maso polietilenglikola. Vrednosti t_{50} so pri vseh krivuljah približno enake (slika 10).



Slika 8: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina B ob dodatku PEG z molskimi masami 300, 600, 1450, 3350, 4000 in 8000 Da. Koncentracija PEG je bila 1 mM., koncentracija akantifolizina B pa 14 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 9: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina C ob dodatku PEG z molskimi masami 300, 600, 1450, 3350, 4000 in 8000 Da. . Koncentracija PEG je bila 1 mM, koncentracija akantifolizina C pa 8 $\mu\text{g/ml}$.



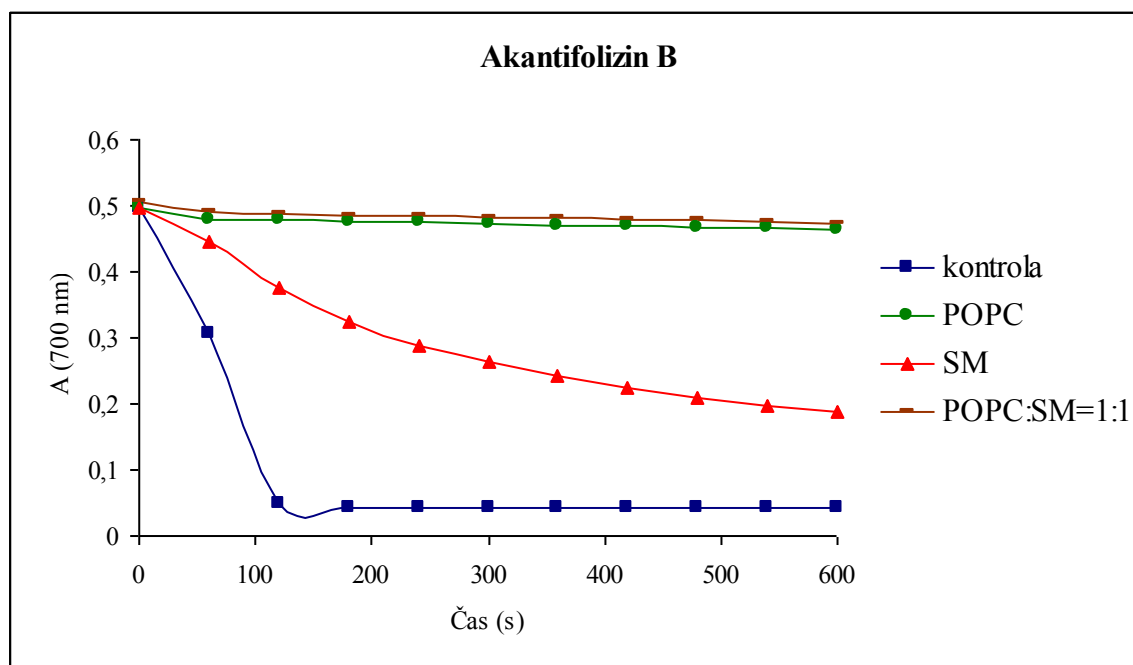
Slika 10: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina D ob dodatku PEG z molskimi masami 300, 600, 1450, 3350, 4000 in 8000 Da. . Koncentracija PEG je bila 1 mM, koncentracija akantifolizina D pa 18 $\mu\text{g/ml}$.

4.3 TEST INHIBICIJE HEMOLIZE S SUV VEZIKLI NAREJENIMI IZ POPC, SM IN POPC/SM (1/1)

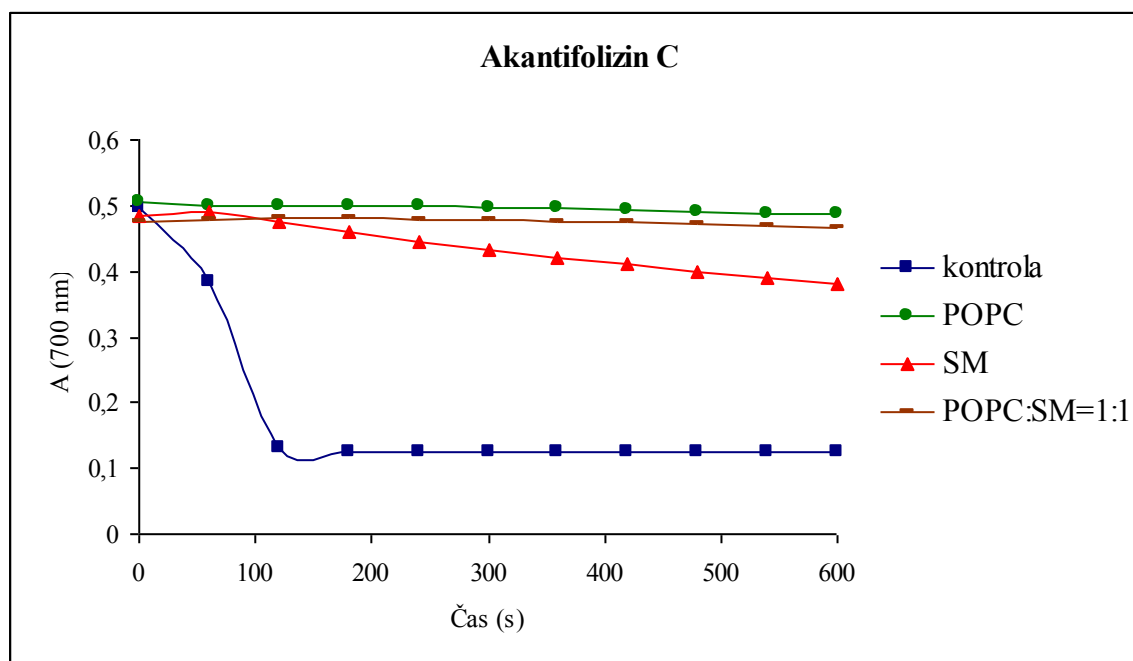
S testom inhibicije hemolize z lipidi smo ugotavljali odvisnost hitrosti hemolize od lipidne sestave SUV veziklov. Slike 11, 12 in 13 prikazujejo časovne poteke hemolize za akantifolizine B, C in D, ob dodatku veziklov, sestavljenih iz čistega POPC, čistega SM in mešanice POPC in SM v molskem razmerju 1:1. Ob vezavi akantifolizina na membrano vezikla ta ni več na razpolago za hemoliziranje eritrocitov, zato je hemoliza upočasnjena ali popolnoma ustavljena.

Kot je razvidno iz slik 11 in 12 smo z akantifolizinom B in C dosegli podobne rezultate. Oba se najmočneje vežeta na vezikle, sestavljene iz čistega POPC in na vezikle iz POPC in SM, v razmerju 1:1. Ob dodatku teh dveh vrst veziklov je bila hemoliza popolnoma zaustavljena. Ob dodatku SM veziklov se je hitrost hemolize le zmanjšala, kar nakazuje na

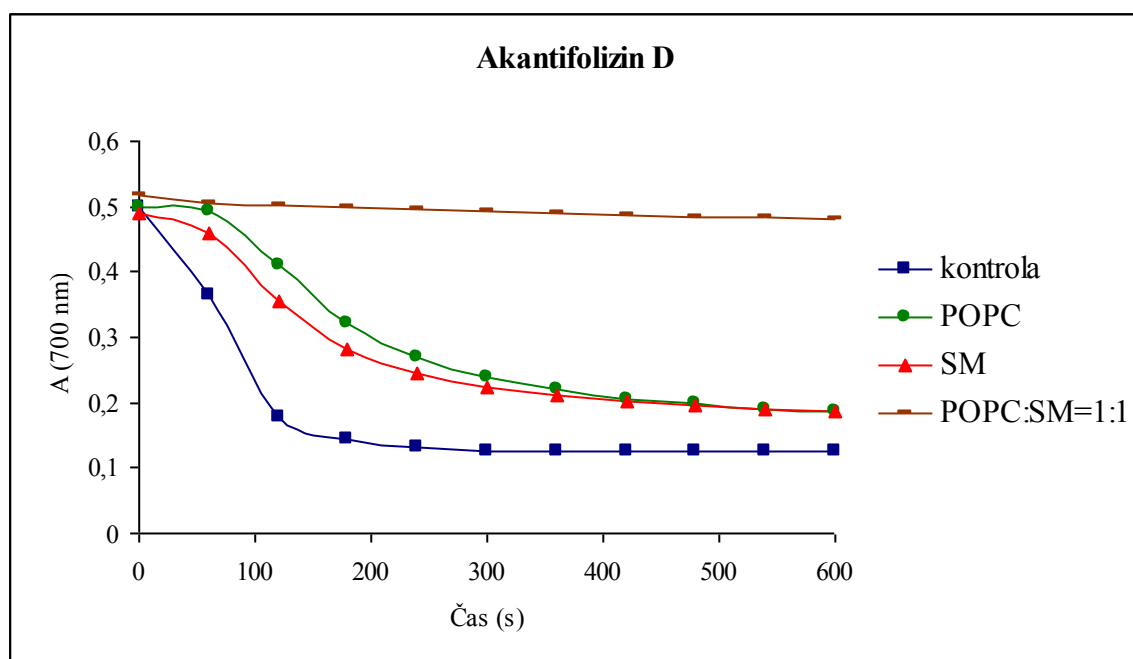
to, da se tako akantifolizin B kot C sicer vežeta na omenjene vezikle, vendar v manjši meri kot na vezikle, ki vsebujejo samo POPC ali mešanico POPC in SM. Akantifolizin B se na SM vezikle veže še šibkeje kot akantifolizin C. Slika 13 prikazuje, da se akantifolizin D najmočneje veže na vezikle iz POPC in SM v razmerju 1:1, kjer hemolize praktično ni bilo zaznati. Slabše se veže na vezikle iz čistega POPC in čistega SM, saj je tu hemoliza le upočasnjena.



Slika 11: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina B ob dodatku veziklov iz POPC, SM in POPC:SM=1:1. Koncentracija akantifolizina B je bila 14 $\mu\text{g/ml}$, koncentracija lipidnih veziklov pa 5 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 12: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina C ob dodatku veziklov iz POPC, SM in POPC:SM=1:1. Koncentracija akantifolizina C je bila 8 $\mu\text{g/ml}$, koncentracija lipidnih veziklov pa 5 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 13: Časovni potek hemolize zaradi akantifolizina D ob dodatku veziklov iz POPC, SM in POPC:SM=1:1. Koncentracija akantifolizina D je bila 18 $\mu\text{g/ml}$, koncentracija lipidnih veziklov pa 5 $\mu\text{g/ml}$.

4.4 TEST SPROŠČANJA KALCEINA IZ SUV VEZIKLOV NAREJENIH IZ POPC, SM IN POPC/SM (1/1)

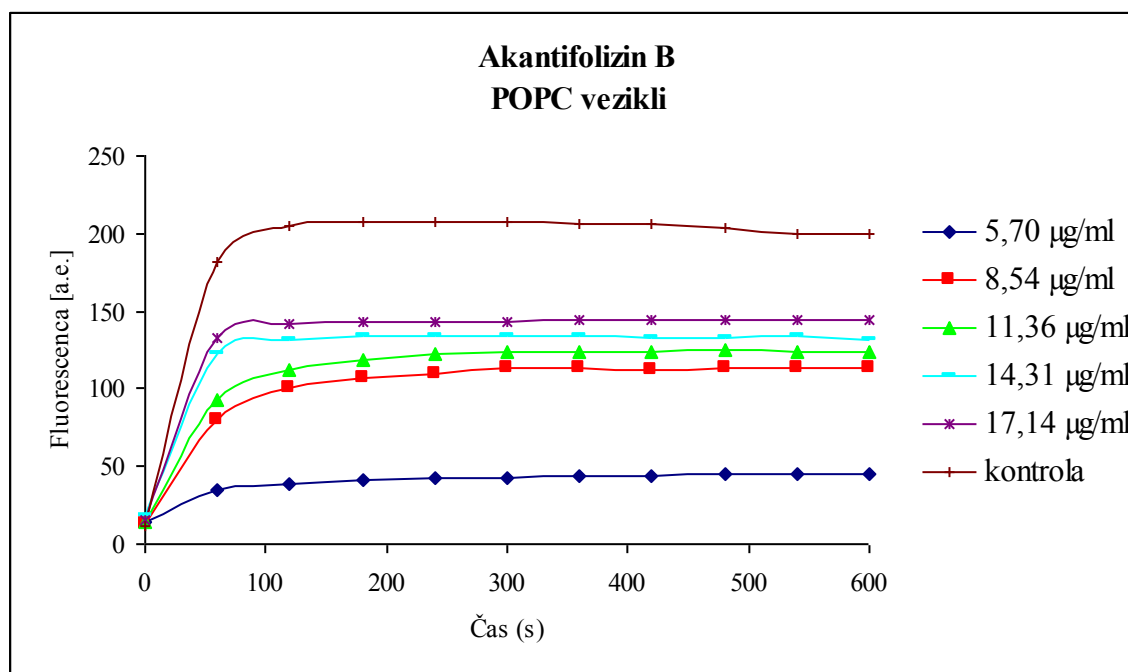
Z metodo sproščanja kalceina iz lipidnih veziklov smo preučevali vezavo posameznega akantifolizina na membrano vezikla. Ob vezavi se na membrani vezikla pojavijo pore, kalcein pa se pri tem sprošča, kar se kaže v povečani relativni fluorescenci. Test sproščanja kalceina smo opravili le za akantifolizina B in D, ne pa tudi za akantifolizin C, saj zaradi pomanjkanja vzorca to ni bilo mogoče. Relativna fluorescenca se je pri obeh preučevanih spojinah povečevala z večjo koncentracijo akantifolizina v vzorcu.

4.4.1 Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov (SUV) zaradi akantifolizina B

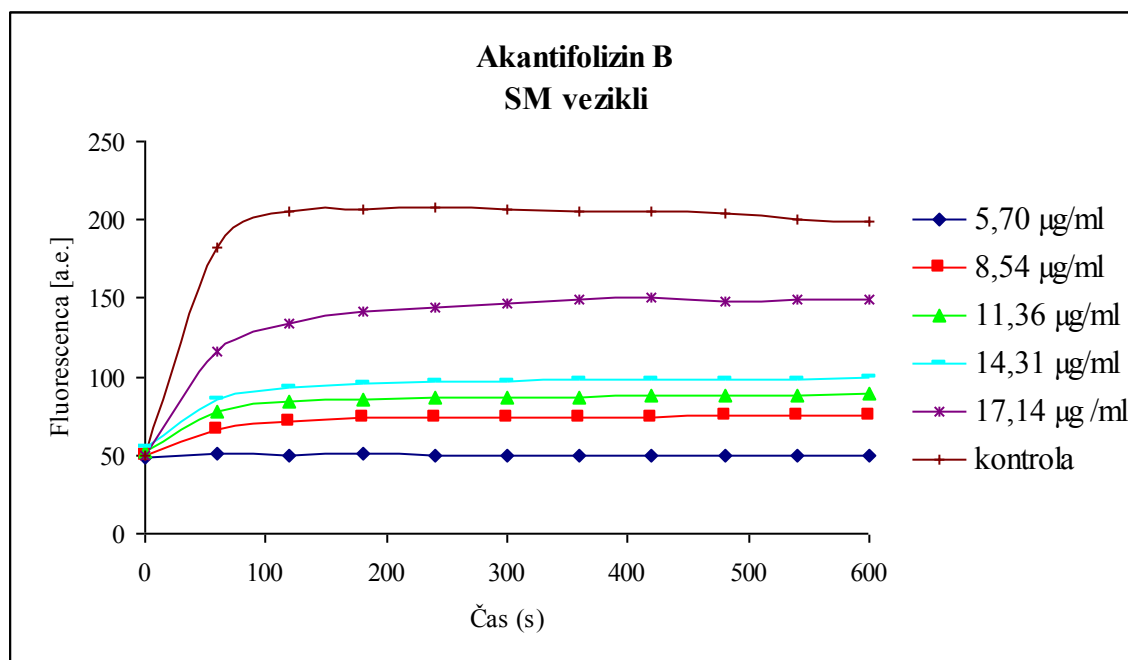
Na sliki 14, 15 in 16 so predstavljeni časovni poteki sproščanja kalceina iz veziklov POPC, SM in POPC in SM, v molskem razmerju 1:1 za akantifolizin B, ki smo jih spremljali na spektrofluorimetru Jasco 10 minut. Na koncu poskusa smo veziklom dodali Triton-X-100, ki povzroči popolno lizo veziklov in predstavlja kontrolno krivuljo.

Kot je razvidno iz slik 13 in 14, je sproščanje kalceina iz veziklov, ki so vsebovali čisti POPC ali čisti SM manjše v primerjavi s sproščanjem kalceina iz veziklov iz POPC in SM v molskem razmerju 1:1 (slika 15). Pri veziklih, ki so vsebovali le POPC tudi opazimo, da so vrednosti relativne fluorescence precej podobne med seboj in niti pri največji koncentraciji ne dosežejo 100% sproščanja kalceina. Pri SM veziklih so vrednosti prav tako podobne, izstopa le krivulja pri največji koncentraciji akantifolizina B, kjer je relativna fluorescenca bistveno večja od ostalih vrednosti.

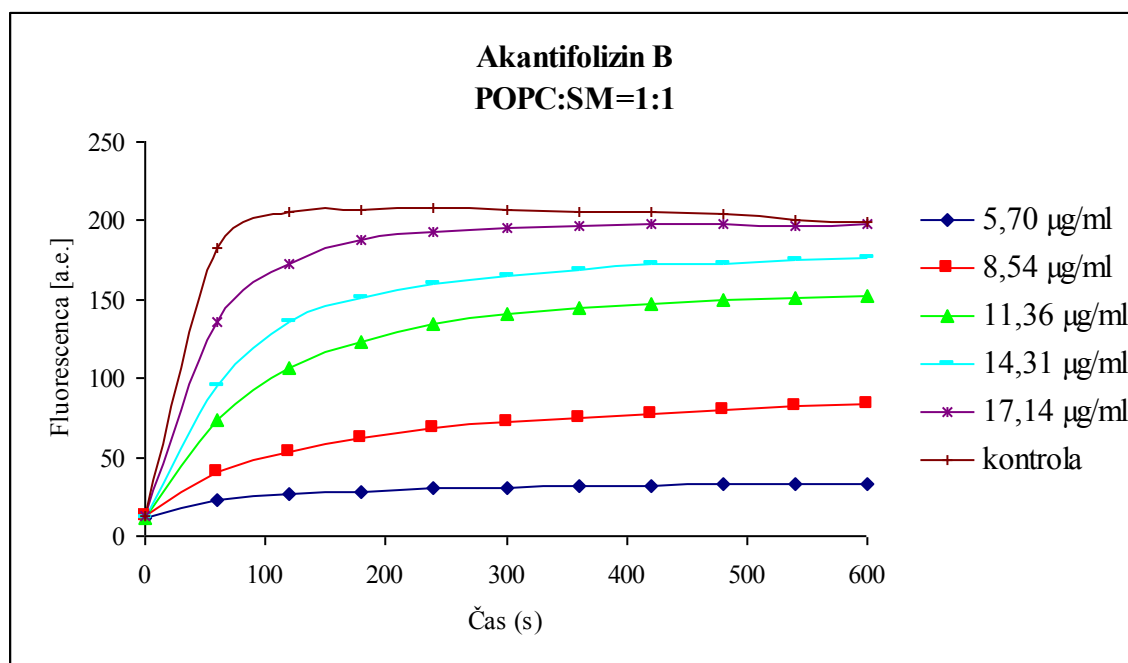
Najvišje vrednosti relativne fluorescence in s tem največje sproščanje kalceina iz veziklov smo opazili pri veziklih iz POPC in SM v molskem razmerju 1:1. Pri največji dodani koncentraciji akantifolizina B je vrednost relativne fluorescence skoraj dosegla maksimalno vrednost.



Slika 14: Časovni potek sproščanja kalceina iz POPC veziklov pri različnih koncentracijah akantifolizina B. Končna koncentracija lipidnih veziklov je bila 5 µg/ml.



Slika 15: Časovni potek sproščanja kalceina iz SM veziklov pri različnih koncentracijah akantifolizina B. Končna koncentracija lipidnih veziklov je bila 5 µg/ml.

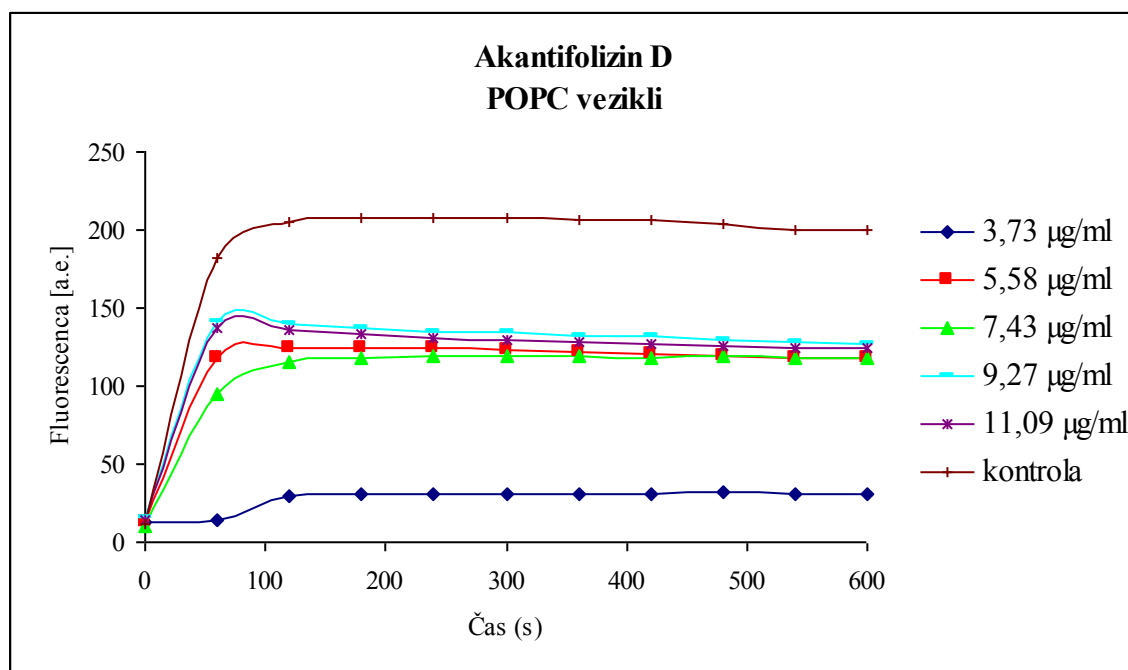


Slika 16: Časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov iz POPC/SM v molskem razmerju 1:1 pri različnih koncentracijah akantifolizina B. Končna koncentracija lipidnih veziklov je bila 5 µg/ml.

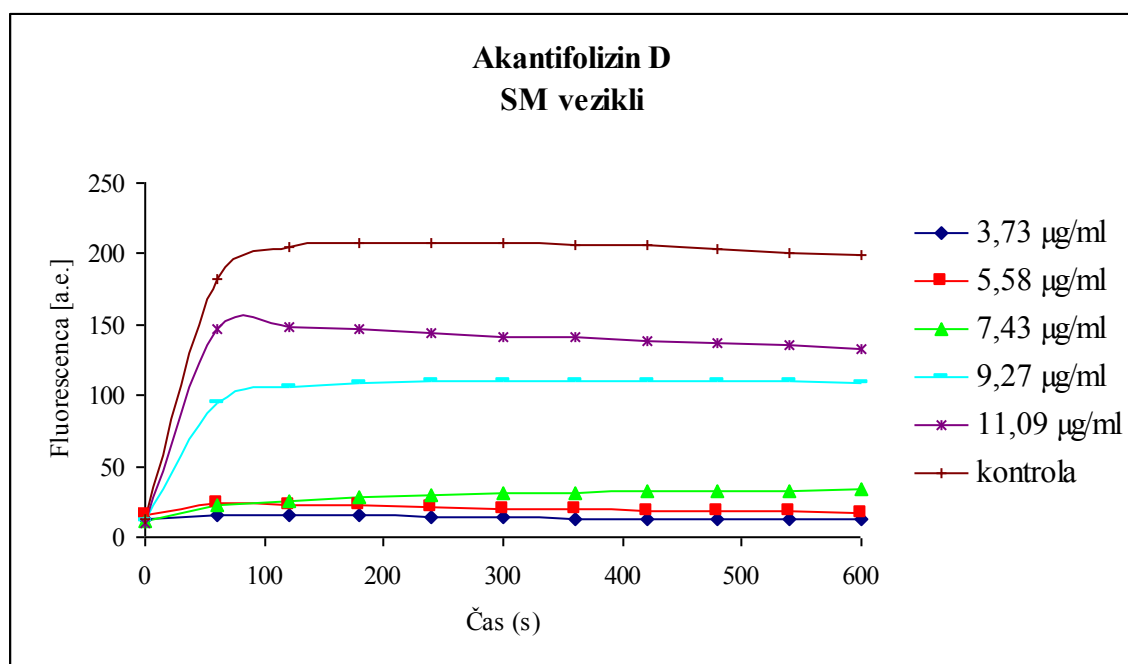
4.4.2 Sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov (SUV) zaradi akantifolizina D

Slike 17, 18 in 19 prikazujejo časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov POPC, SM in POPC in SM v molskem razmerju 1:1 za akantifolizin D. Iz slike 17 je razvidno, da se pri sproščanju kalceina iz POPC veziklov vrednosti relativne fluorescences ne povečujejo z večjo koncentracijo akantifolizina D v vzorcu. Vrednosti relativne fluorescences so pri vseh koncentracijah približno enake.

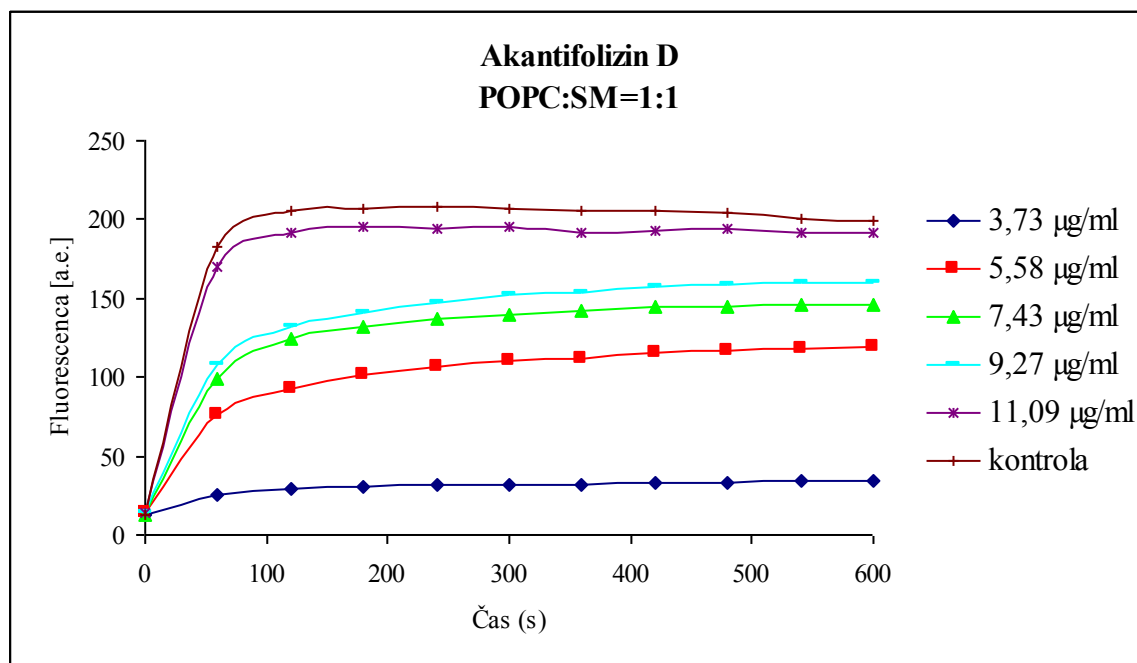
Pri SM veziklih smo opazili, da se kalcein pri nižjih koncentracijah akantifolizina D ni sproščal. Pri koncentracijah 9,27 µg/ml in 11,09 µg/ml pa se je relativna fluorescenca povečala, kar pomeni, da je do sproščanja kalceina prišlo (slika 18). Iz slike 19 je razvidno, da je bilo sproščanje kalceina največje iz veziklov z mešanico POPC in SM v razmerju 1:1. Tu se je relativna fluorescenca povečala že ob nizki koncentraciji dodanega akantifolizina D, pri največji koncentraciji pa dosegla skoraj 100 % sproščanje kalceina (slika 21).



Slika 17: Časovni potek sproščanja kalceina iz POPC veziklov pri različnih koncentracijah akantifolizina D. Končna koncentracija lipidnih veziklov je bila 5 µg/ml.



Slika 18: Časovni potek sproščanja kalceina iz SM veziklov pri različnih koncentracijah akantifolizina D. Končna koncentracija lipidnih veziklov je bila 5 µg/ml.



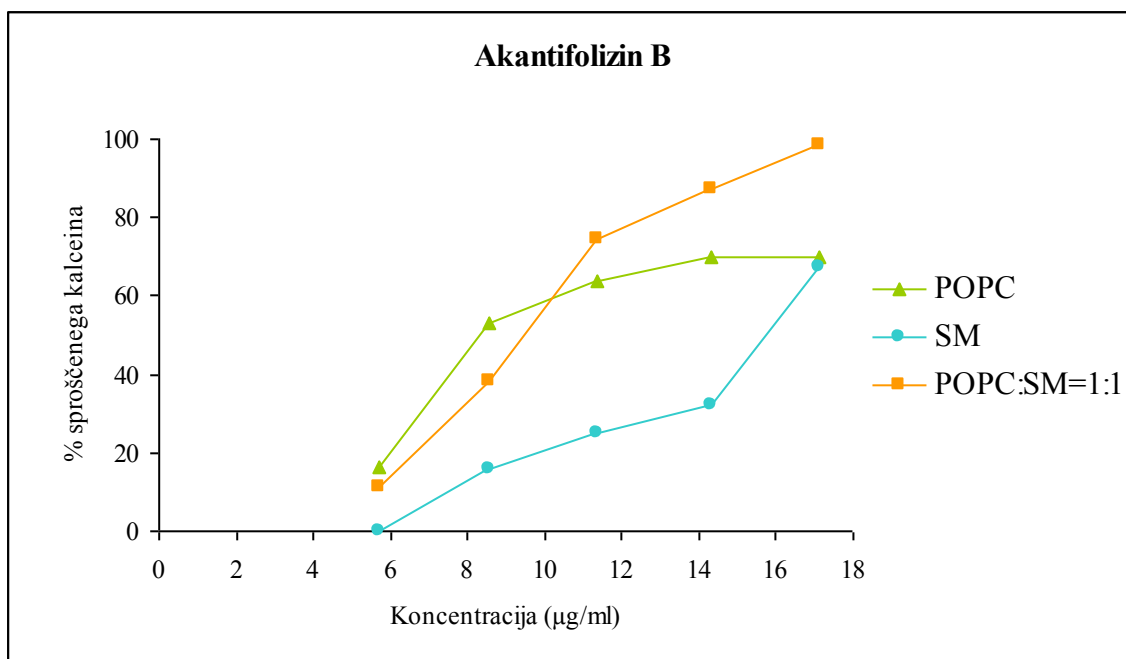
Slika 19: Časovni potek sproščanja kalceina iz veziklov iz POPC in SM v molskem razmerju 1:1 pri različnih koncentracijah akantifolizina D. Končna koncentracija lipidnih veziklov je bila 5 µg/ml.

4.4.3 % sproščenega kalceina v odvisnosti od koncentracije akantifolizinov B in D

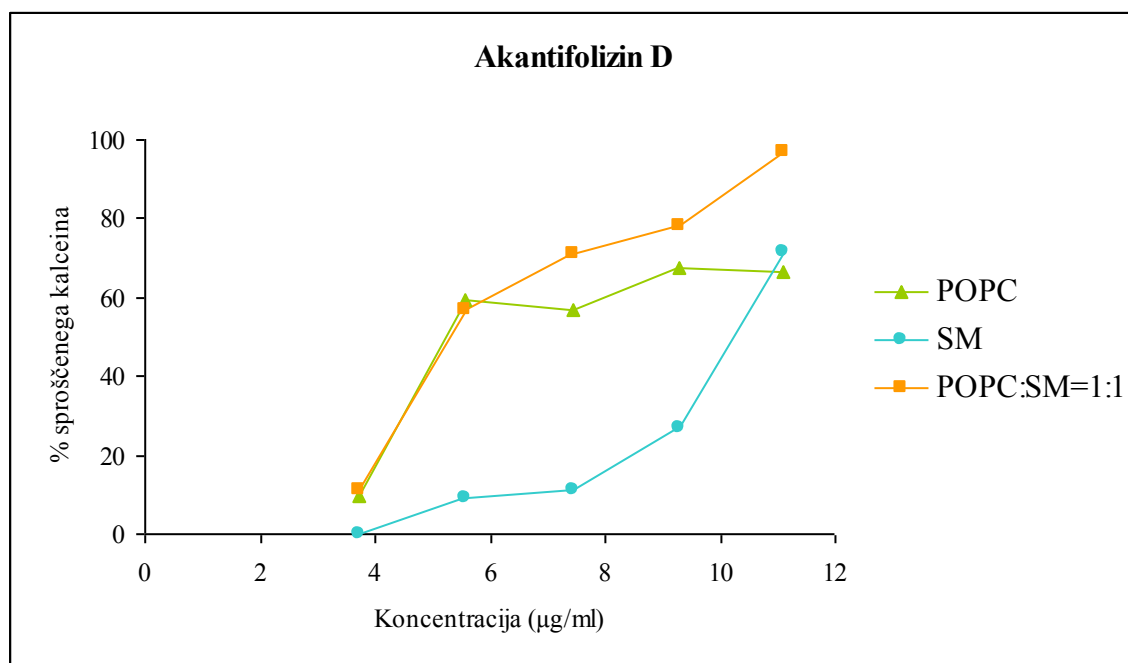
Slika 20 predstavlja % sproščenega kalceina iz veziklov, sestavljenih iz POPC, SM in POPC:SM v razmerju 1:1 po 10 minutah interakcije z akantifolizinom B v različnih koncentracijah. % sproščenega kalceina smo izračunali po enačbi 1. Kot je razvidno, je % sproščenega kalceina pri vseh koncentracijah akantifolizina B najmanjši pri veziklih iz čistega SM. Ta odstotek se poveča pri veziklih iz čistega POPC, največji pa je pri veziklih, ki vsebujejo oba lipida. Pri veziklih iz obeh čistih lipidov je največji dosežen odstotek sproščenega kalceina 70%, pri mešanici lipidov pa ta odstotek ob najvišji koncentraciji akantifolizina B doseže celo 100%.

Slika 21 prikazuje % sproščenega kalceina iz lipidnih veziklov zaradi delovanja akantifolizina D. Kot je iz slike razvidno, je bil % sproščenega kalceina, podobno kot pri akantifolizinu B, manjši pri veziklih iz čistega SM in čistega POPC, pri katerih je kalcein

dosegel največ 70 % sproščanja. Večje sproščanje kalceina smo opazili pri veziklih iz POPC in SM, v razmerju 1:1, pri katerih je ob največji koncentraciji akantifolizina D % sproščanja dosegel skoraj 100 %.



Slika 20: Odstotek sproščenega kalceina iz veziklov POPC, SM in POPC:SM=1:1 v odvisnosti od koncentracije akantifolizina B.



Slika 21: Odstotek sproščenega kalceina iz veziklov POPC, SM in POPC:SM=1:1 v odvisnosti od koncentracije akantifolizina D.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Spužve so zaradi sesilnega načina življenja odvisne od proizvodnje bioaktivnih snovi z različnimi mehanizmi delovanja, ki jim omogočajo obrambo pred drugimi organizmi (Braekmann in Daloz, 1986). Nema lokrat imajo te snovi hemolitično učinkovanje. Ob morebitni medicinsko pomembni aktivnosti teh spojin, kot so protitumorska aktivnost ali potencialna uporabnost sekundarnih metabolitov za cepiva, je hemoliza eritrocitov lahko tudi nezaželena lastnost, ki se ji skušajo izogniti, saj lahko za klinične raziskave predstavlja oviro (Podolak s sod., 2010). V diplomskem delu smo ugotavljali morebitno hemolitično aktivnost trinajstih snovi, ki so jih izolirali iz morske spužve *Pandaros acanthifolium*.

Hemolitično aktivnost spojin iz te vrste spužve so odkrili že Sepčič s sod. (2010). Odkrili so, da so vodni ekstrakti močno hemolitični. Pri koncentraciji 60 µg/ml je hemoliza dosegla polovičen čas po največ 5 minutah. Ob segrevanju hemolitična aktivnost vodnih ekstraktov izgine, kar je namigovalo na to, da so snovi, ki pri spužvi povzročajo hemolizo, proteini. Spojine iz spužve, ki je bila nabrana na drugi lokaciji, niso bile hemolitično aktivne, za kar bi lahko bili vzrok različni endosimbiontski organizmi v vzorcih spužev v različnih okoljih (Sepčič s sod., 2010).

Cachet s sod. (2009) in Regalado s sod. (2010) so iz spužve *Pandaros acanthifolium* nato izolirali dve povsem novi skupini spojin, pandarozide in akantifolizine. Po strukturi so obe skupini snovi opredelili kot steroidne saponine, pri katerih so odkrili potencialno inhibicijsko aktivnost proti parazitskim protozomem in vitro, in sicer proti vrstam *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* in *Trypanosoma cruzi*. Ugotovili so tudi, da so nekatere od teh snovi citotoksične proti primarni celični liniji iz mioblastov podgane. (Cachet s sod., 2009, Regalado s sod., 2010). O hemolitični aktivnosti pandarozidov in akantifolizinov niso poročali.

V primerjavi z akantifolizini so opazili večjo citotoksičnost in antiprotozojsko aktivnost pandarozidov. Nasprotno smo v naši raziskavi ugotovili, da so hemolitično aktivni izključno akantifolizini, ki eritrocite močno hemolizirajo že v manjših koncentracijah. Že pri koncentracijah pod 10 µg/ml je po 60 do 90 sekundah navidezna absorbcija padla na polovico svoje vrednosti. Pri pandarozidih nismo opazili nobene hemolitične aktivnosti. Zaključimo lahko, da protitumorska in antiprotozojska aktivnost nista povezani s hemolitično aktivnostjo spojin. To se sklada z raziskavami Wanga in sod. (2007), ki so primerjali hemolitično in citotoksično aktivnost steroidnih saponinov, pri tem pa niso ugotovili korelacije med obema aktivnostima zaradi različnih mehanizmov delovanja.

Razlog za razlike v hemolitični aktivnosti med obema vrstama spojin je verjetno v njihovi kemijski strukturi. Na hemolitično aktivnost saponinov vpliva afiniteta aglikonskega dela molekule do lipidov v membrani, ki pa je odvisna od vrste aglikona, prisotnosti stranskih verig in acilnih ostankov. Na hemolitično aktivnost saponinov vplivajo tudi število, dolžina in lokacija sladkornih verig pa tudi tip sladkorja. Za hemolitično aktivnost so pomembne tudi posamezne funkcionalne skupine in celotna konformacija saponina (Sun s sod., 2009).

Vsi pandarozidi imajo na mestu C-3 vezano glukuronsko kislino, ki je akantifolizini nimajo. Akantifolizini imajo sladkorno verigo, ki je L-ramnoza, vezano na C-15 ali C-16. Hidroksilna skupina je tako pri akantifolizinih izpostavljena na mestu C3, pri pandarozidih pa na mestu C-16. Razlike so tudi v dvojnih vezeh, ki so v steroidnem skeletu molekule. Akantifolizini imajo le eno dvojno vez na B obroču skeleta, pandarozidi E, F, in G imajo dve dvojni vezi, in sicer v B in D obroču skeleta, pandarozidi A-D in H-J pa imajo eno dvojno vez v D obroču. Obe vrsti spojin se razlikujeta tudi v acilnih verigah.

Analiza časovnega poteka hemolize kaže na sigmoidno obliko krivulje s prelitično lag fazo, kar nakazuje na to, da preučevane spojine ne delujejo kot detergenti, pač pa gre za koloidno osmotski tip lize, kjer do lize celice pride zaradi nastanka por v membrani eritrocita. Hemoliza steroidnih saponinov je potekala hitro, saj se je celoten proces zaključil v manj kot 5 minutah, kar se sklada z nekaterimi podatki o hemolizi steroidnih saponinov v literaturi. Takechi s sod. navaja, da hemoliza steroidnih saponinov poteka

dosti hitreje kot pri triterpenskih saponinih, ki za hemolizo potrebujejo tudi do 60 minut (Takechi s sod., 1992).

Na tvorbo por nakazuje tudi dejstvo, da se je hemoliza upočasnila ob dodatku osmoprotektantov. Osmoprotektanti namreč povzročijo zamik hemolize in preprečijo izpust hemoglobina (Ponder in Kennedy, 1926). Ob dodatku akantifolizina B in C smo zasledili inhibicijo hemolize. Z večanjem molske mase osmoprotektanta se je hitrost hemolize zmanjševala, kar pa ne velja za akantifolizin D, pri katerem dodatek osmoprotektantov ni imel vpliva. Glede na nizko koncentracijo PEG, ki smo jih dodali eritrocitni suspenziji je prispevek le teh k spremembi absorpcije zanemarljiv.

Z vezikli, ki smo jih naredili iz različnih lipidov, smo poskušali dognati, na katere lipide se akantifolizini najbolj vežejo. Membrana sesalčjih eritrocitov je asimetrična. Na zunanji strani prevladujeta fosfolipida fosfatidilholin in sfingomielin, medtem ko so na notranji strani membrane prisotni fosfatidiletanolamin, fosfatidil-inozitol in fosfatidilserin. Prisoten je tudi holesterol, ki je enakomerno razporejen po membrani in omogoča kontrolo fluidnosti membrane (Sackmann, 1995).

Test inhibicije hemolize z lipidi je pokazal, da se vsi trije preučevani akantifolizini najbolj vežejo na vezikle iz POPC in SM v molskem razmerju 1:1, ki tudi najbolj oponašajo naravno sestavo zunanje eritrocitne membrane. Inhibicija hemolize je bila pri vseh treh akantifolizinih popolna, kar nakazuje na to, da sta tarča saponinov v eritrocitni membrani POPC in SM. Inhibicija hemolize je bila pri akantifolizinu B in C popolna tudi ob interakciji z vezikli, ki so vsebovali izključno POPC, na SM vezikle pa se nista tako močno vezala. Pri akantifolizinu D smo zopet opazili nekoliko drugačne rezultate, in sicer se na POPC vezikle ni vezal tako močno kot druga dva akantifolizina. Glede na nizko koncentracijo lipidnih veziklov v končnem vzorcu je prispevek le teh k spremembi absorpcije zanemarljiv.

Akantifolizina B in C se od akantifolizina D razlikujeta v zgradbi. Prva dva imata sladkor vezan na mestu C-15, drugi pa na mestu C-16, kar lahko razloži drugačne izsledke pri testu z osmoprotektanti kot tudi pri testu z lipidi.

Saponini lahko reagirajo s polarnimi glavami membranskih fosfolipidov ali z OH skupino holesterola, rezultat pa je nastanek micelom podobnih struktur (Abe s sod., 1978). Čeprav je holesterol pogosto mesto vezave za različne saponine (Shany, 1974), so nekatere raziskave pokazale, da imajo saponini različne tarčne molekule na membrani, na katere se vežejo (Segal, 1987). V našem primeru smo ugotovili, da tvorba por ob interakciji akantifolizinov z membrano poteče ob prisotnosti POPC in SM. Testa z vezikli iz holesterola nismo naredili, vendar je očitno, da za permeabilizacijo eritrocitne membrane prisotnost holesterola ni nujna.

Da se akantifolizini najmočneje vežejo na vezikle iz obeh dodanih lipidov, potrjujejo tudi rezultati testa sproščanja kalceina. Potrdili smo, da je pri tej vrsti veziklov nastajanje por največje, saj se iz veziklov sprošča največ kalceina, kar se kaže s povišano relativno fluorescenco.

5.2 SKLEPI

- Hemolitično aktivni so akantifolizini A, B, C in D, ne pa tudi pandarozidi, kar je posledica razlik v kemijski strukturi teh snovi.
- Akantifolizini delujejo po principu koloidno-osmotskega tipa lize, kjer je krivulja časovnega poteka hemolize sigmoidna.
- Hitrost hemolize eritrocitov je odvisna od koncentracije akantifolizina. Z večjo koncentracijo saponina narašča tudi hitrost hemolize.
- Bistvenih razlik v hitrosti hemolize med posameznimi akantifolizini nismo opazili. Vsi so bili aktivni pri koncentracijah pod 10 µg/ml.
- Akantifolizini v membrani eritrocita delajo pore. Ob dodatku osmoprotektantov je prišlo do počasnejše hemolize ali do popolne inhibicije hemolize, vendar pa velikosti pore nismo uspeli določiti.
- Ob stiku z lipidnimi vezikli se akantifolizini najbolje vežejo na membrano veziklov, ki so sestavljeni iz POPC in SM v molskem razmerju 1:1, šibkeje pa se vežejo na vezikle iz čistega POPC ali čistega SM.
- Do največjega sproščanja kalceina iz lipidnih veziklov je prav tako prišlo ob stiku akantifolizinov z lipidnimi vezikli iz POPC in SM v molskem razmerju 1:1, manjša relativna fluorescenca pa je bila prisotna pri drugih dveh vrstah veziklov.

6 POVZETEK

Za oceno mehanizma hemolize novih steroidnih saponinov, ki so jih izolirali iz morske spužve *Pandaros acanthifolium*, smo testirali 13 različnih spojin. Štiri od teh spojin spadajo v skupino akantifolizinov, devet pa v skupino pandarozidov. Opravili smo hemolitični test za ugotovitev časovnega poteka hemolize in test inhibicije hemolize z osmoprotektanti, pa tudi teste z lipidnimi vezikli, vključno z vezikli s kalceinom. Pri pandarozidih nismo opazili nobene hemolitične aktivnosti. Ugotovili smo, da so akantifolizini močno hemolitično aktivni, in sicer že pri koncentracijah pod 10 µg/ml. Hitrost procesa hemolize je koncentracijsko odvisna, hemoliza pa je koloidno-osmotskega tipa s sigmoidno krivuljo, kar kaže na tvorbo por v eritrocitni membrani. Akantifolizini so se najbolje vezali na lipida POPC in SM, ko sta bila v razmerju 1:1. Prav tako je pri tem razmerju lipidov prišlo do največjega sproščanja kalceina iz lipidnih veziklov.

SUMMARY

To evaluate the mechanism of hemolysis of novel steroidal saponins, which were isolated from marine sponge *Pandaros acanthifolium*, we tested 13 different compounds. Four of these compounds belong to the group of acanthifoliosides and 9 of them to the group of pandarosides. We performed the test to determine time course of hemolysis and also the hemolysis inhibition test by osmoprotectants. Further experiments were performed with lipid vesicles including calcein-loaded vesicles. Pandarosides showed no hemolytic activity while acanthifoliosides showed strong hemolytic activity below concentrations of 10 µg/ml. Acanthifoliosides induced hemolysis in a dose-dependent manner. Hemolysis is colloid-osmotic with the sigmoid shape of the curve that indicates pore formation in the erythrocyte cell membrane. Acanthifoliosides best bind to lipid vesicles made from POPC and SM in the ratio 1:1. This ratio of lipids also resulted in the greatest calcein release from the liposomes.

7 VIRI

Abe H., Sakaguchi M., Konishi H., Tani T., Arichi S. 1978b. The effects of saikosaponins on biological membranes. The relationship between the structures of saikosaponins and haemolytic activity. *Planta Medica*, 34: 287-290

Banchet-Cadeddu A., Henon E., Dauchez M., Renault J.H., Monneaux F., Haudrechy A. 2011. The stimulating adventure of KRN 7000. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9: 3080-3104

Bangham A.D., Horne R.W. 1962. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*, 196: 952-953

Bergmann W., Feeney R.J. 1955. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. *The Journal of Organic Chemistry*, 20, 11: 1501-1507

Berlinck R.G.S., Burtoloso A.C.B., Kossuga M.H. 2008. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Natural Product Reports*, 25: 919-954.

Bhakuni D.S., Rawat D.S. 2005. Bioactive marine natural products. New York, Springer: 382 str.

Braekmann J.C., Daloz D. 1986. Chemical defense in sponges. *Pure and Applied Chemistry*, 58: 357-364

Braekman J.C., Daloz D. 2004. Chemical and biological aspects of sponge secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 3: 275-283

Bramley A.M., Langlands J.M., Jones A.K., Burgoyne D.L., Li Y., Andersen R.J., Salari H. 1995. Effects of IZP-94005 (contignasterol) on antigen-induced bronchial responsiveness in ovalbumin-sensitized guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology*, 115, 8: 1433-1438

Brümmer F., Nickel M., 2003. Sustainable use of marine resources: cultivation of sponges. V: *Sponges (Porifera)*. Müller W.E.G. (ed.). Heidelberg, Springer-Verlag: 143-162

Cachet N., Regalado E.L., Genta-Jouve G., Mehiri M., Amade P., Thomas O.P. 2009. Steroidal glycosides from the marine sponge *Pandaros acanthifolium*. *Steroids*, 74: 746-750

Dai H.F., Edrada R.A., Ebel R., Nimtz R., Wray V., Proksch P. 2005. Norlanostane triterpenoidal saponins from the marine sponge *Melophlus sarassinorum*. *Journal of Natural Products*, 68:1231-1237

Erpenbeck D., Van Soest R. W. M. 2005. A survey for biochemical synapomorphies to reveal phylogenetic relationship of halichondrid demosponges (Metazoa: Porifera). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 585-616

Faulkner D.J. 1984. Marine natural products: metabolites of marine invertebrates. *Natural product reports*, 1: 551-598

Faulkner D.J., Harper M.K., Haygood M.G., Salomon C.E., Schmidt E.W. 2000. Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances. V: *Drugs from the sea*. Fusetani N. (ed.). Basel, Karger: 107-119

Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S, Becker K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88: 587-605

Glauert A.M., Dingle J.T., Lucy J.A. 1962. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*, 196: 953-955

Gunasekera S.P., Cranick S., Longley R.E. 1989. Immunosuppressive Compounds from a deep water marine sponge, *Agelas flabelliformis*. *Journal of Natural Products*, 52, 4: 757-761

Gutierrez M., Capson T.L., Guzman H.M., Gonzales J., Ortega-Barria E., Quinoa E., Riguera R. 2005. Antiprotozoal activity against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi* of aeropylsinin-1 isolated from the new sponge *Aplysina chiriquensis*. *Pharmaceutical Biology*, 43, 9: 762-765

Haefner B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discoveries and Therapeutics*, 12, 8: 536-544

Hart J.B., Lill R.E., Hickford S.J.H., Blunt J.W., Munro M.H.G. 2000. The halichondrins: chemistry, biology, supply and delivery. V: *Drugs from the sea*. Fusetani N. (ed.). Basel, Karger: 134-153

Hirsch S., Rudi A., Kashman Y., Loya Y. 1991. New avarone and avarol derivatives from the marine sponge *Dysidea cinerea*. *Journal of Natural Products*, 54: 92-97

Holmes C.F.B., Luu H.A., Carrier F., Schmitz F.J. 1990. Inhibition of protein phosphatases-1 and -2A with acanthifolicin: Comparison with diarrhetic shellfish toxins and identification of a region on okadaic acid important for phosphatase inhibition. *Febs Letters*, 270, 1-2: 216-218

Hood K.A., Wetst L.M., Northcote P.T., Berridge M.V., Miller J.H. 2001. Induction of apoptosis by the marine sponge (Mycale) metabolites, mycalamide A and pateamine. *Apoptosis*, 6, 3: 207-219

Hostettmann K., Marston A. 1995. *Saponins*. New York, Cambridge University Press: 549 str.

Kim D., Lee I.S., Jung J.H., Yang S.I. 1998. Psammaphin A, a natural bromotyrosine derivative from a sponge, possesses the antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the DNA gyrase-inhibitory activity. Archives of Pharmacal Research, 22, 1: 25-29

Kobayashi J., Ohizumi Y., Nakamura H., Hirata Y. 1986. A novel antagonist of serotonergic receptors, hymenidin, isolated from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. Cellular and Molecular Life Sciences, 42, 10: 1176-1177

Laport M.S., Santos O.C.S., Muricy G. 2009. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. Current Pharmaceutical Biotechnology, 10: 86-105

Lasch J., Weissing V., Brandl M. 2003. Preparation of liposomes. V: Liposomes 2nd ed. Torchilin V.P., Weissing V. (eds). Oxford, Oxford University Press: 3-29

McCaffrey E.J., Endean R. 1985. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. Marine Biology, 89: 1-8

McCarthy P.E., Pitts T.P., Gunawardana G.P., Kelly-Borges M., Pomponi S.A. 1992. Journal of Natural Products, 55, 11: 1664-1668

Miller J.H., Singh A.J., Northcote P.T. 2010. Microtubule-stabilizing drugs from marine sponges: Focus on peloruside A and zampanolide. Marine Drugs, 8, 4: 1059-1079

Morel J.L., Drobecq H., Sautiere P., Tartar A., Mironneau J., Qar J., Lavie J.L., Hugues M. 1997. Purification of a new dimeric protein from *Cliona vastifica* sponge, which specifically blocks a non-L-type calcium channel in mouse duodenal myocytes. Molecular Pharmacology, 51, 6: 1042-1052

Nakamura H., Ohizumi Y., Kobayashi J., Hirata Y. 1984. Keramadine, a novel antagonist of serotonergic receptors isolated from the okinawan sea sponge *Agelas* sp. Tetrahedron Letters, 25, 23: 2475-2478

Oleszek W., Hamed A. 2010. Saponin-based surfactants. V: Surfactants from renewable resources. Kjellin M., Johansson I. (eds.). Chichester, John Wiley & Sons, Ltd: 239-247

Podolak I., Galanty A., Sobolewska D. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 9, 3: 425-474

Pomponi S.A. 2001. The oceans and human health: The discovery and development of marine-derived drugs. *Oceanography*, 14: 78-87

Ponder E., Kennedy W.P. 1926. The inhibitory effect of the sugars on saponin haemolysis. *Biochemical Journal*, 20, 2: 237-242

Regalado E.L., Jimenez-Romero C., Genta-Jouve G., Tasdemir D., Amade P., Nogueiras C., Thomas O.P. 2011. Acanthifoliosides, minor steroidal saponins from the Caribbean sponge *Pandaros acanthifolium*. *Tetrahedron*, 67, 5: 1011-1018

Regalado E.L., Tasdemir D., Kaiser M., Cachet N., Amade P., Thomas O.P. 2010. Antiprotozoal steroidal saponins from the marine sponge *Pandaros acanthifolium*. *Journal of Natural Products*, 73, 8: 1404-1410

Rinehart K.L. 1992. Secondary metabolites from marine organisms. Ciba Foundation symposium, 171: 236-249

Sackmann E. 1995. Biological membranes architecture and function. V: Structure and dynamics of membranes. From cells to vesicles. Lipowski R., Sackmann E. (eds.). Amsterdam, Elsevier B.V.: 1-64

Schmidt E.W., Faulkner D.J. 1996. Palauolol, a new anti-inflammatory sesterterpene from the sponge *Fascaplysinopsis* sp. From Palau. *Tetrahedron Letters*, 37, 23: 3951-3954

Schmitz F.J., Gopichand Y., Michaud D.P., Prasad R.S., Remaley S. 1981. Recent developments in research on metabolites from caribbean marine invertebrates. *Pure and Applied Chemistry*, 51: 853-865

Schmitz F.J., Ksebati M.B., Gunasekera S.P., Agarwal S. 1988. Sarasinose A1: a saponin containing amino sugars isolated from a sponge. *Journal of Organic Chemistry*, 53: 5941-5947

Schröder H.C., Brümmer F., Fattorusso E., Aiello A., Menna M., de Rosa S., Batel R., Müller W.E.G. 2003. Sustainable production of bioactive compounds from sponges: Primmorphs as bioreactors. V: *Sponges (Porifera)*. Müller W.E.G. (ed.). Heidelberg, Springer-Verlag: 261 str.

Schwartzmann G., Ratain M.J., Cragg G.M., Wong J.E., Saijo N., Parkinson D.R., Fujiwara Y., Pazdur R., Newman D.J., Dagher R., Di Leone D. 2002. Anticancer drug discovery and development throughout the world. *Annals of Oncology*, 11: 235-143

Seeman P., Cheng D., Iles G.H. 1973. Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *The Journal of Cell Biology*, 56: 519-527

Segal R., Milo-Goldzweig I. 1978. The susceptibility of cholesterol depleted erythrocytes to saponin and sapogenin hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 512, 1: 223-226

Seibert G., Raether W., Dogović N., Gasić M.J., Zahn R.K., Müller W.E. 1985. Antibacterial and antifungal activity of avarone and avarol. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 260, 3: 379-386

Sepčić K., Marcel V., Kläbe A., Turk T., Šuput D., Fournier D. 1998. Inhibition of acetylcholinesterase by an alkylpyridinium polymer from the marine sponge, *Reniera sarai*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1387: 217-225

Sepčić K., Kauferstein S., Mebs D., Turk T. 2010. Biological activities of aqueous and organic extracts from tropical marine sponges. *Marine Drugs*, 8, 5: 1550-1566

Spector I., Shochet N.R., Kashman Y., Groweiss A. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cell. *Science*, 219, 4584: 493-495

Sun H.X., Xie Y., Ye Y.P. 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27: 1787-1796

Takada K., Nakao Y., Matsunaga S., van Soest R.W.M., Fusetani N. 2002. Nobiloside, a new neuraminidase inhibitory triterpenoidal saponin from the marine sponge *Erylus nobilis*. *Journal of Natural Products*, 65: 411-413

Takechi M., Shimada S., Tanaka Y. 1992. Time course and inhibition of saponin-induced hemolysis. *Planta Medica*, 58, 2: 128-130

Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 298-347

Thakur N.L., Müller W.E.G. 2004. Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*, 86, 11: 1506-1512

Thomson R.H. 1993. *The chemistry of natural products*. 2nd edition. New York, Springer: 452 str.

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 für Naturforschung*, 57c: 161-171

Wang Y., Zhang Y., Zhu Z., Zhu S., Li Y., Li M., Yu B. 2007. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic and Medicinal chemistry*, 15, 7: 2528-2532

Whitley R.J., Tucker B.C., Kinkel A.W., Barton N.H., Pass R.F., Welchel J.D., Cobbs G.C., Diethelm A.G., Buchanan R.A. 1980. Pharmacology, tolerance, and antiviral activity of vidarabine monophosphate in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18, 5: 709-715

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Tomu Turku in recenzentu, prof. dr. Petru Mačku za pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem osebju katedre za biokemijo, predvsem Nini Orehar in Katji Ota za pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala tudi staršem za pomoč in podporo tekom študija.