

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Bojan MARTINŠEK

**BIOLOŠKA AKTIVNOST V ORGANSKIH EKSTRAKTIH
NEKATERIH TROPSKIH MORSKIH SPUŽEV (*Porifera, Demospongia*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ORGANIC EXTRACTS FROM SOME
TROPICAL MARINE SPONGES (*Porifera, Demospongia*)**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorja prof. dr. Toma Turka, za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha, za predsednika komisije pa doc. dr. Rudija Verovnika.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rudi Verovnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Bojan Martinšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 577.1:593.4(043.2) = 163.6
- KG morske spužve / biološko aktivne snovi /sekundarni metaboliti / hemolitična aktivnost / protibakterijska aktivnost / inhibicija encima acetilholinesteraze / inhibicija encima proteinske fosfataze 1
- AV MARTINŠEK, Bojan
- SA SEPČIĆ, Kristina – mentorica/TURK, Tom – somentor
- KZ SI-1000 Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2010
- IN BIOLOŠKA AKTIVNOST V ORGANSKIH EKSTRAKTIH NEKATERIH TROPSKIH MORSKIH SPUŽEV (*PORIFERA*)
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP X, 58 str., 3 sl., 11 pregl., 61 vir.
- IJ sl.
- JI sl/an.
- AI Morske spužve (*Porifera*) so izjemno bogat vir različnih spojin, predvsem zaradi sekundarnih metabolitov, ki kažejo številne biološke učinke. Te snovi uporabljajo kot zaščito pred plenilci, v teritorialni kompeticiji ali za preprečevanje naseljevanja drugih organizmov na njihovo površino. Ravno zato so spužve uporabne v medicinskih, industrijskih ter številnih drugih panogah. Namen diplomskega dela je bil testirati biološko aktivnost organskih ekstraktov (metanolnega, acetonskega in butanolnega) izbranih liofiliziranih karibskih in avstralskih morskih spužev. Uporabljeni testi so bili test hemolize, testiranje aktivnosti na izbranih G⁻ in G⁺ bakterijah, inhibicija encima acetilholinesteraze in inhibicija encima proteinske fosfataze 1. Po opravljenih testih je hemolitično aktivnost kazalo 24 ekstraktov, po dodatnih redčenjih pa so vsi ekstrakti spužve *Ircinia felix* ter acetonski ekstrakt *Lissodendoryx colombiensis* še vedno imeli močno hemolitično aktivnost. Vsi vzorci so inhibirali rast bakterije *B. subtilis* 36 pa je inhibiralo rast *E. coli*. Po dodatnih redčenjih so bile spužve *Verongula rigida*, *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Ircinia sp.* in *Ircinia strobilina* najbolj aktivne. Proti encimu acetilholinesterazi je po dodatnih redčenjih najbolj inhibitorno deloval vzorec spužve *Agelas conifera*. 11 vzorcev (vsi ekstrakti spužev *Aplysinia archeri* in neidentificirane spužve 1, butanolni in metanolni ekstrakt spužve *Neofibularia nolitangere* ter metanolni ekstrakti spužev *Callyspongia pilcifera*, *Callyspongia vaginalis* in *Ircinia felix*) je inhibiralo delovanje encima proteinska fosfataza 1.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 577.1:593.4(043.2) = 163.6
- CX Marine sponges / biologically active compounds / secondary metabolites / hemolytic activity / antibacterial activity / inhibition of acetylcholinesterase / inhibition of protein phosphatase 1
- AU MARTINŠEK, Bojan
- AA SEPČIĆ, Kristina – supervisor/TURK, Tom – co-supervisor
- PP SI-1000 Ljubljana, večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
- PY 2010
- TI BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ORGANIC EXTRACTS FROM SOME TROPICAL MARINE SPONGES (*PORIFERA*)
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO X, 58 p., 3 fig., 11 tab., 61 ref.
- LA sl.
- AL sl/en.
- AB Marine sponges (*Porifera*) are a rich source of different compounds. Among them, there are various secondary metabolites, which show many biological activities. These compounds are used as protection against predators, for territorial competition or for disabling the settlement of other organisms on their surface. Because of these properties, they can be used in medicine, industry, and many other fields. The objective of this graduation thesis was to test the biological activity of organic extracts (methanol, acetone and butanol) of some loifilized Caribbean and Australian marine sponges. We estimated the hemolytic activity, activity on selected G⁻ and G⁺ bacteria, and inhibition of enzymes acetilholinesteraze and protein phosphatase 1. 24 extracts showed hemolytic activity, and all extracts of *Ircinia felix* and acetone extract of *Lissodendoryx colombiensis* showed strong hemolytic activity after additional dilution. All extracts inhibited the growth of *B. subtilis*, and 36 inhibited the growth of *E. coli*. Extracts of sponges *Verongula rigida*, *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Ircinia sp.* and *Ircinia strobilina* were the most active after additional dilution. Extract of the sponge *Agelas conifera* was the best in inhibiting acetilholinesteraze after additional dilution. 11 extracts (all extracts of *Aplysinia archeri* and non-identified sponge 1, butanol and methanol extracts of *Neofibularia nolitangere* and methanol extracts of *Callyspongia pilcifera*, *Callyspongia vaginalis* and *Ircinia felix*) inhibited the activity of protein phosphatase 1.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV	3
2.2 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI SPUŽEV	3
2.3 NARAVNI PRODUKTI IZ MORSKIH ORGANIZMOV	4
2.3.1 Biološko aktivni naravni produkti iz morskih spužev.....	5
2.3.2 Glavni predstavniki biološko aktivnih produktov iz morskih spužev	7
2.3.2.1 Snovi s protivnetnim delovanjem	7
2.3.2.2 Snovi s protitumorskim in protivirusnim delovanjem	7
2.3.2.3 Snovi z imunosupresivnim delovanjem.....	8
2.3.2.4 Snovi z antibiotičnim in protiglivnih delovanjem	8
2.3.2.5 Snovi s protimalaričnim delovanjem	9
2.3.2.6 Snovi s protivegetativnim delovanjem	9
3 MATERIAL IN METODE	10
3.1 MATERIAL.....	10
3.1.1 Vzorci spužev.....	10
3.1.1.1 Sortiranje materiala.....	10
3.1.1.2 Tehtanje vzorcev	14
3.1.2 Priprava organskih ekstraktov.....	15
3.2 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI.....	16

3.2.1	Hemolitični test	16
3.2.2	Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju.....	17
3.2.3	Test inhibicije acetilholinesteraze.....	18
3.2.4	Test inhibicije proteinske fosfataze 1	19
4	REZULTATI.....	20
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH.....	20
4.2	HEMOLITIČNA AKTIVNOST	23
4.3	PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	29
4.4	ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST	37
4.5	INHIBICIJA PROTEINSKE FOSFATAZE 1	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1	RAZPRAVA	45
5.2	SKLEPI.....	48
6	POVZETEK.....	50
7	VIRI.....	51
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste in oznake spužev, nabranih na južnem morskem grebenu otoka Curacao, Karibsko morje	11
Preglednica 2: Vrste in oznake spužev nabranih na morskem grebenu otoka Lizard, ob obali avstralskega Queenslanda	13
Preglednica 3: Mase in porazdelitve testnih vzorcev spužev	14
Preglednica 4: Koncentracije suhe snovi v organskih ekstraktih spužev	20
Preglednica 5: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov testiranih spužev	24
Preglednica 6: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov spužev, ki so v preliminarnem testu povzročili hemolizo v manj kot petih minutah, ter izbrani vzorci, ki so hemolizo povzročili v petih do desetih minutah (107B, 107A, 70B, 70A, 93A, 93M, 132B, 132A, 56A, 2A, 44A ter 38B)	27
Preglednica 7: Protibakterijska aktivnost organskih ekstraktov vzorcev spužev proti sevom <i>Escherichia coli</i> in <i>Bacillus subtilis</i>	29
Preglednica 8: Določanje minimalne inhibitorne koncentracije vzorcev, ki so pred redčenjem kazali najmočnejšo inhibicijo rasti bakterij <i>E. coli</i> in/ali <i>B. subtilis</i>	33
Preglednica 9: Antiacetilholinesterazna aktivnost testiranih vzorcev spužev glede na kontrolo (18 mOD/min)	37
Preglednica 10: Dodatna redčenja vzorcev spužev, ki so v preliminarnem testu pokazali močno inhibicijo acetilholinesteraze	40
Preglednica 11: Test inhibicije proteinske fosfataze 1 z vzorci spužev. Stopnja aktivnosti encima PP1 je izražena glede na kontrolo (3 mOD/min)	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Zemljevid otoka Curacao v Karibskem morju, kjer je bil nabran del spužev za testiranje	10
Slika 2: Izrez iz slike 1, (1:30000 povečava)	11
Slika 3: Otok Lizard. Zemljevid otoka Lizard, ki je del velikega koralnega grebena ob obali avstralskega Queenslanda	13

KAZALO PRILOG

Priloga A: Pregled objav

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ara-C	1- β -D-arabinofuranozil citozin
Ara-A	1- β -D-arabinofuranozil adenin
AChE	Acetilholinesetraza
PP1	Proteinska fosfataza 1
DNA	Deoksiribonikleinska kislina
HIV	Humani imunodeficientni virus
PKC	Protein-kinaza C
HSV	Herpes simplex virus
A	Acetonski ekstrakt
B	Butanolni ekstrakt
M	Metanolni ekstrakt
TRIS-HCl	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol-hidroklorid
t ₅₀	Polovični čas hemolize
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
EE	Encimske enote
EDTA	Etilendiaminotetraocetna kislina
DL-DTT	DL-Ditiotreitol
mOD/min	Sprememba optične gostote na minuto

1 UVOD

Flemingovo odkritje penicilina leta 1920 je morda najpomembnejše farmacevtsko odkritje sodobnega časa. Farmacevtska industrija po vsem svetu je hitro sprejela to in podobna odkritja ter je nato odkrila stotine "čudežnih naravnih zdravil", ki so lahko ozdravila pljučnico in skoraj vse bakterijske infekcije ter so v času med in po drugi svetovni vojni rešila milijone življenj. Poleg tega pa so nam dala lažni občutek, da bolezni kot je kolera, ne bomo ponovno videli. Za biomedicinsko uporabnost so namreč naravne snovi superiorne tistim, ki se pridobivajo na tradicionalne, kemijske načine. (Müller in sod., 2004).

Vrsto let so rastline in mikroorganizmi veljali za najbolj pomembne vire biološko aktivnih naravnih produktov. Vendar v primerjavi z zemeljskimi ekosistemi, kjer živijo predstavniki 17 od 36 debel življenja, živijo v morjih predstavniki iz kar 34, zaradi česar so morski ekosistemi resnično naša zadnja meja preučevanja genetske in biokemijske raznolikosti (Fenical., 2006).

37% od približno 18000 do sedaj odkritih biološko aktivnih morskih snovi izvira iz spužev. Razlog za to je, da je zaradi njihovega sesilnega načina življenja, kemična obramba njihov edini odgovor na stresne dejavnike okolja, med katere spadajo borba za prostor, obramba pred plenilci ter obramba pred patogeni (Sepčić, 2008). Morske spužve in z njimi povezani mikroorganizmi so velika in raznovrstna zakladnica biološko aktivnih snovi in je treba poudariti potencialno vrednost iz njih pridobljenih sekundarnih metabolitov, ki so že v uporabi v zdravstvu, npr. pri zaviranju tumorske / virusne rasti (arabinofuranozil citozin in arabinofuranozil adenin), kot citostatiki in protivnetna sredstva (avarol / avaron), pri povzročanju indukcije apoptoze (sorbicillakton) in pri imunske aktivnosti (Müller in sod., 2004).

Sekundarni metaboliti, ki jih spužve proizvajajo, imajo različno število ogljikovih atomov in lahko vplivajo na več različnih mestih patogeneze, kar poveča verjetnost proizvodnje

zdravila za specifične tarče. Kljub nepoznavanju načina učinkovanja večine metabolitov, so pri precejšnjem številu spojin poročali o vpletenosti v mehanizme patogeneze širokega spektra bolezni (Sipkema in sod., 2005; Fenical, 2006).

Očitno je, da ima molekularna etologija bolezni med metazoji skupno osnovo, saj je bilo ugotovljeno, so osnovni strukturni in funkcionalni elementi pri pro- (*Drosophila melanogaster* in *Caenorhabditis elegans*) in deuterostomijih (človek) zelo dobro ohranjeni. Velik izziv za znanstvenike je pojasniti katera je tarča za dani sekundarni metabolit, ki je sam po sebi zelo aktiven in selektiven. Šele nato namreč lahko razmišljajo o možnosti njegove klinične uporabe (Müller in sod., 2004).

Nekatere snovi izolirane iz spužev v današnjem času poleg v zdravstvu uporabljamo tudi v prehrani, kozmetiki kot v okolju prijaznih industrijskih aplikacijah. Uporaba novih kemijskih in molekularno-bioloških tehnologij bo v prihodnosti odprla nove razsežnosti za uporabo novih metabolitov v zgoraj omenjenih panogah (Sipkema in sod., 2005; Fenical, 2006).

Ravno zaradi velikega števila biološko aktivnih snovi ter njihovega širokega spektra delovanja, smo se odločili raziskati nekaj vrst morskih spužev, ki so nam jih poslali z Univerze v Frankfurtu (Nemčija), v upanju da bi v njih našli nove in potencialno uporabne biološko aktivne snovi.

V diplomski nalogi smo raziskali 30 vzorcev spužev. Organske ekstrakte smo testirali na hemolitično in protibakterijsko aktivnost ter na sposobnost inhibicije encimov acetilholinesteraze (AChE) in proteinske fosfataze 1 (PP1).

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV

Preglednica objavljenih raziskav je podana v prilogi A in predstavlja iz literature zbrane podatke o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v vodnih in organskih ekstraktih spužev, katere so bile vključene v naše raziskovalno delo. Zanimalo nas je namreč, če so aktivnosti opažene v naših testih že bile opisane oziroma če 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 najbolj primitivne mnogocelične živali. Čeprav imajo dobro razvita vezivna tkiva, v katerih celice opravljajo najrazličnejše funkcije, nimajo razvitih pravih organov. V primerjavi z drugimi metazoji kažejo celice spužev tako visoko stopnjo samostojnosti, da njihovo telo prej spominja na kolonijo enoceličarjev. Spužve so sesilne živali in so jih zaradi nenavadne zgradbe telesa v preteklosti naravoslovci (Aristotel, Plinij) uvrščali med rastline. Med raziskavami morskih tokov leta 1765 so prvič ugotovili, da gre pravzaprav za živalske vrste (Ruppert in Barnes, 1996).

Spužve so zelo stara razvojna linija, najstarejši najdeni fosili pa izvirajo iz obdobja med 650 in 550 milijonov let pred našim štetjem. Zoologi jih od pravih mnogoceličnih živali (Eumetazoa) ločujejo in uvrščajo v drugo skupino, imenovano Parazoa. Z izjemo ene družine so spužve izključno morske živali. Njihove celice so funkcijsko zelo prilagodljive, saj niso strogo specializirane. Odrasle spužve so skoraj vedno pritrjene na podlago, njihova rast in oblika pa sta odvisni od lastnosti le-te ter vodnih tokov v njihovi neposredni okolici. Glede na velikost so med seboj različne, saj lahko merijo od le nekaj milimetrov pa vse do enega metra, njihovo telo pa nima jasno vidne simetrije. Osnovna lastnost spužev je veliko število odprtih na površini, ki se delijo na maloštevilne odtekalke in manjše, številčnejše

dotekalke, skozi katere dovajajo vodo in se na ta način prehranjujejo. Prebavit nimajo, telo pa je zgrajeno iz kamric, obdanih s hoanocitami (celice z ovratnikom) in kanalčkov. Glede na zgradbo kanalov ločimo tri gradbene tipe spužev: askon, sikon in levkon. Askon je najpreprostejši gradbeni tip, v katerega spadajo majhne spužve z enotno notranjo votlino (spongocel), ki je obdana s hoanocitami. Sikon in levkon imata zaradi zapletene in razvejane notranje zgradbe večjo notranjo površino, kar jima omogoča bolj učinkovito izmenjavo plinov in večji sprejem hrane. Zunanjo površino prekrivajo ploščate celice, ki jim pravimo pinakocite, dotekalke tvorijo porocite. Mezohil, amebocite (npr. skleroblasti, ki izdelujejo spužvin skelet) in skelet se nahajajo pod epidermalnimi calicami. Skelet je sestavljen iz kremenca in apnenca, ki tvorita osnovne skeletne elemente spikule, ter iz spongina, ki tvori sponginski skelet. Spikule oz. iglice, katere delimo na makrosklere in mikrosklere, so pri določevanju spužev glavni taksonomski znak. Makrosklere gradijo mrežast skelet, ki je pri nekaterih vrstah povezan s sponginom, mikrosklere pa so nepovezane in ponavadi razpršene. Pri nekaterih spužvah je skelet sestavljen izključno iz spongina, saj nimajo spikul.

Morske spužve živijo v čisti vodi z malo anorganskih delcev in v vodi, ki je bogata s kisikom od plitkega infralitorala vse do največjih globin, pogosto pa jih najdemo v poltemnih in temnih podvodnih votlinah. Smatramo jih lahko kot bioindikatorje čistosti vode (Turk, 2007).

2.3 NARAVNI PRODUKTI IZ MORSKIH ORGANIZMOV

Sesilni morski organizmi, med katere uvrščamo mahovnjake, plaščarje in spužve, so bogat vir spojin, od katerih imajo številne različne biološke učinke. Vzrok temu je sesilni način življenja in posledično kemični odgovor na stresne zunanje dejavnike, kar se kaže kot produkcija širokega spektra biološko aktivnih sekundarnih metabolitov. V produkciji le teh prednjačijo spužve, ki so se izkazale kot prave »kemične tovarne« (Sepčić, 2008; Sipkema in sod., 2005).

Biološko aktivne sekundarne metabolite ne proizvajajo le sesilni organizmi ampak tudi mikroorganizmi kot so alge, cianobakterije, glive in bakterije z drugimi oblikami metabolizma, ki z njimi živijo v simbiozi in lahko predstavljajo do 40% suhe teže gostitelja. 27% biološko aktivnih snovi sodi med poliketide in 8 med neribosomalne proteine, katere večina endosimbiontskih mikroorganizmov ni sposobna sintetizirati in jasno nakazujejo na drugačen, endosimbiontski izvor (Sepčić, 2008).

Organska sinteza biološko aktivnih spojin iz sesilnih morskih organizmov je zelo težka, včasih celo nemogoča, saj jih večina ima zelo kompleksne skelete. Poleg težavnosti sinteze je tudi zelo neekonomična, saj zaradi kompleksnosti struktur le ta obsega veliko korakov. Gojenje spužev v akvakulturah in v laboratorijskih pogojih sta še slabši opciji, saj spužve v laboratoriju ponavadi prenehajo proizvajati sekundarne metabolite. Endosimbiontske mikroorganizme se da lahko gojiti v kulturi, vendar je večina obveznih simbiotov in ne preživijo zunaj svojega gostitelja. Rešitev te težave se morda skriva v rekombinantni DNA tehnologiji, pri kateri v bakterijsko celico vstavimo vse gene, ki so udeleženi v biosintetski poti sekundarnega metabolita, celica pa bo izražala in proizvajala metabolit morskega organizma (Sepčić, 2008).

2.3.1 Biološko aktivni naravni produkti iz morskih spužev

V medicini so morske spužve uporabljali že v času Aleksandrijskega cesarstva, ko so jih natopili z jodom in s tem stimulirali koagulacijo krvi. Poleg tega so jih uporabljali pri različnih zlomih, ranah, bolečinah v trebuhu, infekcijskih boleznih ter pri drugih tegobah, npr. kot implantate po operaciji prsi. V 18. stoletju so ruski, ukrajinski in poljski zdravniki uporabljali posušen prah več vrst sladkovodnih spužev (»Badiaga«) pri zdravljenju pacientov s pljučnimi boleznimi ter proti revmi. Vendar je šele odkritje spongotimidina in spongouridina morske spužve *Cryptotethia crypta* v zgodnjih 1950-ih zbudilo zanimanje farmacevtske industrije. Ta nukleozida sta bila osnova za sintezo prvega morskega protitumorskega agensa, 1-β-D-arabinofuranozil citozina (Ara-C), in protivirusnega zdravila, 1-β-D-arabinofuranozil adenina (Ara-A). Ara-C se še danes uporablja pri zdravljenju levkemije, njegovi fluorirani derivati pa se uporabljajo pri pacientih z rakom na

trebušni slinavki, prsni, mehurju in pljučih. Biološko aktivne snovi, ki so jih v naslednjih desetletjih izolirali iz morskih spužev, lahko delujejo protivnetno, protitumorsko, protivirusno, antibiotično, protiglivično, protimalarično, nekatere delujejo kot kardiovaskularna sredstva za zdravljenje tromboze, druge pa vplivajo na delovanje živčevja (sproščanje gladkih mišic) (Sipkema in sod., 2005).

Za odkritje velikega števila teh metabolitov so zaslužni organski kemiki iz Združenih držav, Evrope in Japonske, ki so v srednjih do poznih 1960-ih so začeli preučevati morske organizme in so odkrili, da se v njih skriva bogata zakladnica do tedaj še neznanih novih spojin. S postopnim odkrivanjem novih spojin so vsi počasi uvideli potencial morskih organizmov za prihodnost. V 1980-ih je bila ustanovljena nova smer morske ekologije z imenom »morska kemična ekologija«. Znanstveniki so takrat tudi prikazali, da so temelji kemične obrambe in komunikacije v morjih ravno biološko aktivne snovi izolirane iz morskih rastlin in živali. V 1980-ih letih so raziskovalci začeli ugotavljati, kako bi lahko vso to zapleteno morsko kemijo uporabili za izboljšanje zdravja ljudi. V Kaliforniji so iz karibske korale *Pseudopterogorgia elisabethae* izolirali nov dodatek za nego kože, alkaloid pseudopterozin, ki pri posameznikih dramatično zmanjša alergijsko reakcijo na losjone za kožo. Ta dodatek je v uporabi še danes v izdelkih kozmetičnega podjetja Estée Lauder. V istem obdobju so raziskovalci preučevali druge spojine iz morskih virov v upanju, da bodo pripomogle k zdravljenju raka. Izmed 500 strukturno različnih bioaktivnih molekul, ki so pokazale zmožnost zaviranja rasti rakavih celic jih je večina izvirala iz spužev, kozolnjakov in mahovnjakov. Genska tehnologija je ne samo z znanjem o človeškem genomu, temveč tudi z možnostjo sekvencioniranja, kloniranja in izražanja genomov morskih živali in s tem povezano proizvodnjo različnih spojin iz le teh, odprla vrata novim načinom diagnoze bolezni in odkrivanju novih tarč delovanj zdravil, Ugotovljeno je tudi, da ne le morski organizmi, temveč tudi bakterije, ki živijo v simbiozi z morskimi nevretenčarji, igrajo pomembno vlogo v biosintezi spojin (Fenical, 2006).

2.3.2 Glavni predstavniki biološko aktivnih produktov iz morskih spužev

2.3.2.1 Snovi s protivnetnim delovanjem

Akutna vnetja v človeškem telesu so lahko posledica mikrobne okužbe, fizične poškodbe ali kemičnih snovi, kjer telo reagira s spreminjanjem pretoka krvi in povečevanjem prepustnosti žil, kar omogoči pobeg celic iz krvi v tkivo. Spužve so zanimiv vir protivnetnih spojin. Za enega izmed prvih sesterterpenoidov (manoalid) izoliranih iz morske spužve *Luffariella variabilis*, je bilo ugotovljeno da ima poleg antibiotičnega in protibolečinskega tudi protivnetno delovanje, ki je bilo obsežno preučevano. Nepovratno inhibira sproščanje arahidonske kisline iz membrane fosfolipidov preko inhibicije encima fosfolipaze A2 (Sipkema in sod., 2005). Med snovmi s protivnetnih delovanjem sta morda najbolj obširno proučevana seskiterpenoid hidrokinon avarol in njegov kinon avaron, izolirana iz spužve *Dysidea avara*. Poleg protivnetnega delovanja kažeta spojini še citostatično in protilevkemično delovanje ter delujeta proti virusu HIV (Müller in sod., 2004).

2.3.2.2 Snovi s protitumorskim in protivirusnim delovanjem

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

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

2.3.2.3 Snovi z imunosupresivnim delovanjem

Zaviranje delovanja imunskega sistema je še posebej zaželeno pri preobčutljivosti na določene antigene, kot pri alergijah oziroma pri presaditvah organov. Uživanje imunosupresorjev skozi celotno življenje bolnika po presaditvi je nujno potrebno, da ne pride do zavračanja presajenega organa (Sipkema in sod., 2005).

2.3.2.4 Snovi z antibiotičnim in protiglivnim delovanjem

Antibiotično delovanje kažejo številne spužve, izmed katerih nekatere kažejo zelo močno učinkovanje na širok spekter Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij. Nekatere snovi kažejo tudi protiglivno delovanje, vendar so te snovi manj raznolike kot antibiotične spojine. Uporaba snovi z antibiotičnim in protiglivnim delovanjem, izoliranih iz morskih spužev, je zaradi strupenih učinkov na ljudi, živali in rastline omejena. Še je treba dokazati, ali imajo snovi, kot so topsentiasterol D in E iz spužve *Topsentia* sp., akantosterol sulfati I in J iz spužve *Acanthodendrilla* sp. ali makrolid leukaskandrolid iz spužve *Leucascandra caveolata*, drugačne lastnosti kot snovi, ki so trenutno v uporabi. Vendar lahko dejstvo, da jih proizvajajo evkariontski organizmi (morda tudi simbionti) nakazuje, da so manj strupeni za druge evkarionte. (Sipkema in sod., 2005).

2.3.2.5 Snovi s protimalaričnim delovanjem

V zadnjem desetletju je bilo odkritih več protimalaričnih snovi iz spužev. Nova zdravila so potrebna, saj je vse več sevov *Plazmodium* sp. odpornih na zdravila. Najbolj obetavna protimalarična spojina, manzamin, je bila odkrita v številnih spužvah, njen protimalarični učinek pa je najverjetneje posledica okrepljenega imunskega odziva.

2.3.2.6 Snovi s protivegetativnim delovanjem

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

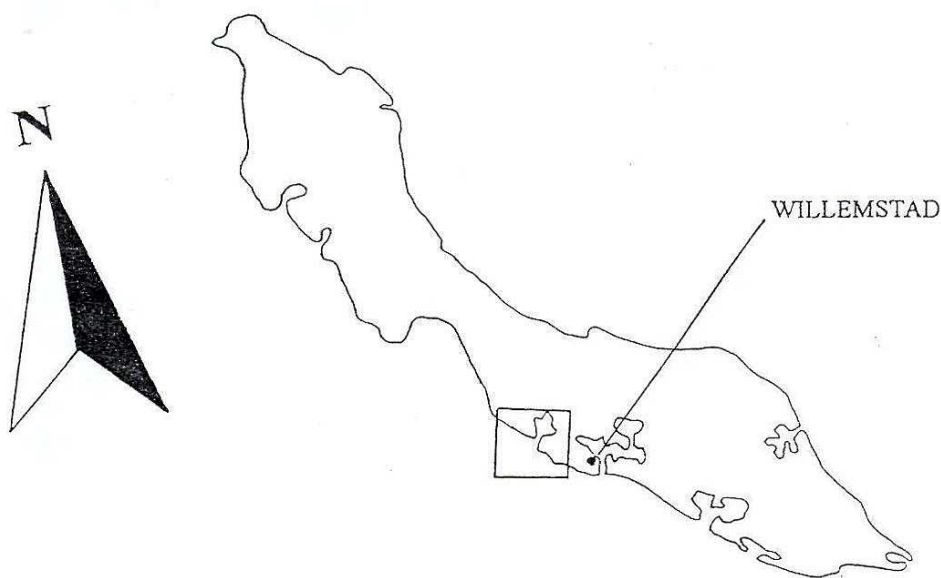
3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

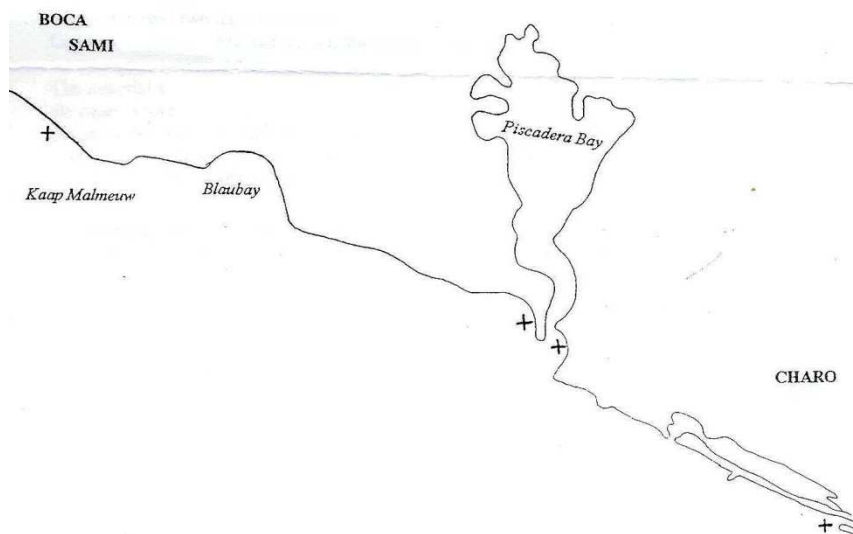
3.1.1 Vzorci spužev

3.1.1.1 Sortiranje materiala

28 od tridesetih vzorcev spužev je bilo nabranih na otoku Curacao (Nizozemski Antili) (slika 1), preostala dva pa na otoku Lizard (slika 2), ki je del velikega koralnega grebena ob obali avstralskega Queenslanda. Vzorce so nabrali na globinah med 5 in 45 metri, jih globoko zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pod temi pogoji transportirali v Evropo, kjer je Dr. Daniel Schaft z univerze v Frankfurtu vzorce naknadno determiniral, liofiliziral in shranil za nadaljnjo obdelavo.



Slika 1: Zemljevid otoka Curacao v Karibskem morju, kjer je bil nabran del spužev za testiranje



Slika 2: Izrez iz slike 1, (1:30000 povečava). S + so označena mesta vzorčenja.

V preglednici 1 so navedene vrste spužev in oznake vzorcev z lokacij na morskem grebenu Curacao, Karibsko morje.

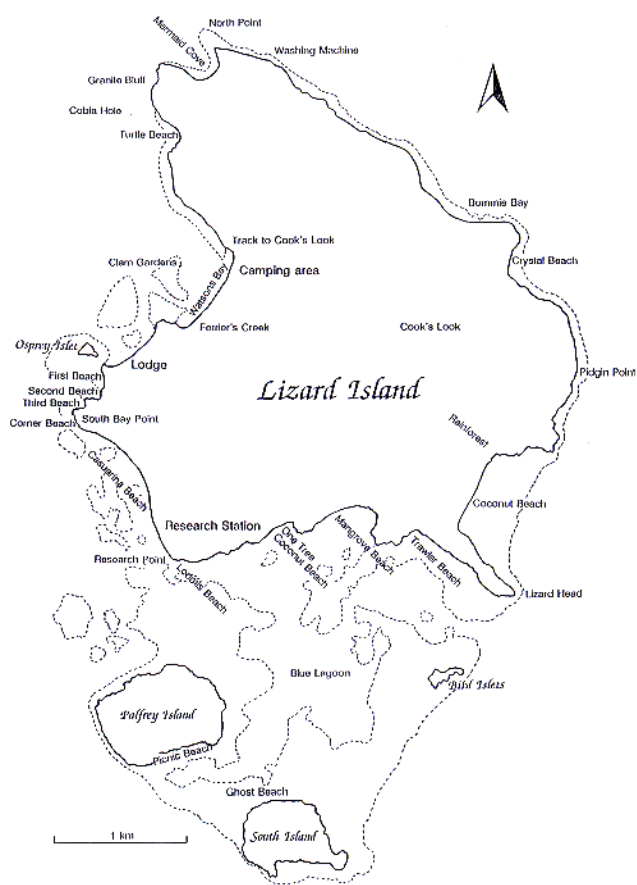
Preglednica 1: Vrste in oznake spužev, nabranih na južnem morskem grebenu otoka Curacao, Karibsko morje.

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

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca
<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 spužva 1	21
Neidentificirana spužva 2	32
Neidentificirana spužva 3	96
Neidentificirana spužva 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 3: Otok Lizard. Zemljevid otoka Lizard, ki je del velikega koralnega grebena ob obali avstralskega Queenslanda.

V preglednici 2 sta navedeni vrsti spužev in oznake vzorcev iz lokacije otoka Lizard, Avstralija.

Preglednica 2: 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, 1/2 pa strli v terilnici in jo uporabili kot testno maso, ki smo jo naknadno razdelili na 3 enake dele (kot je opisano v poglavju 3.1.2.). Preostalo maso (1/3) je Petra Cesarec uporabila za pripravo vodnih ekstraktov, katere je analizirala v svoji diplomski nalogi. Preglednica 3 prikazuje mase vzorcev in njihove porazdelitve.

Preglednica 3: 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	6.883	1.147	3.441
<i>Agelas dispar</i>	88	3.310	0.552	1.655
<i>Aplysina archeri</i>	40	1.970	0.332	0.958
<i>Aplysina lacunosa</i>	112	5.159	0.859	2.580
<i>Callyspongia plicifera</i>	9	0.763	0.127	0.382
<i>Callyspongia plicifera</i>	67	1.338	0.223	0.669
<i>Callyspongia plicifera</i>	103	2.174	0.362	1.087
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48	1.089	0.182	0.363
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66	1.666	0.278	0.833
<i>Holopsamma helwigi</i>	5	2.112	0.352	1.056
<i>Ircinia sp.</i>	107	3.802	0.634	1.901
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132	3.996	0.666	1.998
<i>Ircinia campana</i>	70	3.212	0.535	1.606
<i>Ircinia felix</i>	59	4.107	0.685	2.054
<i>Ircinia felix</i>	93	2.733	0.455	0.911
<i>Ircinia strobilina</i>	56	2.318	0.386	0.772
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110	5.506	0.918	2.753
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83	1.671	0.278	0.836
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94	7.319	1.220	3.660
<i>Panadaros acanthifouum</i>	76	1.919	0.326	0.640
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2	5.528	0.921	2.764
<i>Spheciospongia vesparum</i>	45	2.440	0.407	0.814

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Masa vzorca (g)	1/6 mase vzorca (g)	1/3 mase vzorca (g)
<i>Tridideum misolidum</i>	79	8.871	1.479	4.436
<i>Verongula gigantea</i>	44	3.443	0.574	1.722
<i>Verongula rigida</i>	38	1.441	0.240	0.721
<i>Xestospongia muta</i>	95	6.465	1.078	3.233
<i>Neidentificirana spužva 1</i>	21	2.348	0.392	0.784
<i>Neidentificirana spužva 2</i>	32	2.950	0.492	1.475
<i>Neidentificirana spužva 3</i>	96	2.636	0.439	1.318
<i>Neidentificirana spužva 4</i>	117	5.269	0.878	2.635

3.1.2 Priprava organskih ekstraktov

Zatehtani vzorec (1/2 celotnega vzorca) smo strli v terilnici in enakomerno razdelili v tri epruvete. Vzorce, ki jih nismo mogli streti v terilnici, smo s škarjami narezali na majhne koščke (nekaj mm³) in jih prav tako enakomerno razdelili v tri epruvete. Epruvete smo označili s številko vzorca ter črkami A, B in M glede na uporabljeno topilo za ekstrakcijo (A=acetone, B=butanol, M=metanol). V epruvete smo dodali toliko topila, da je prekrilo vzorec spužve za približno 1 cm. Epruvete smo zamašili s kovinskimi zamaški in oblepili s parafilmom. Nato smo jih vstavili v stresalnik in pustili, da se stresajo čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo vzorce prefiltrirali preko filtrirnih papirjev in še enkrat ponovili ekstrakcijo s topili. Tokrat smo epruvete z vzorci na stresalniku stresali 3 ure pri 37 °C. Filtrata posameznih vzorcev smo združili v erlenmajerice. Ekstrakte smo posušili z evaporacijo topil v digestoriju ter usedlino raztopili v 1 ml etanola in shranili v epice. Epice smo oblepili s parafilmom in jih shranili v hladilniku pri 4 °C.

Koncentracijo suhe snovi v vzorcih (mg/ml) 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 stehtali in preračunali suhe teže v mg/ml.

3.2 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI

3.2.1 Hemolitični test

Eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže goveje krvi, ki smo ji pri odvzemu dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino (0,9% raztopina NaCl v destilirani vodi) in uporabili za biološke teste. 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 [2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol-hidroklorid] pH 7.4). Pripravili smo suspenzijo eritrocitov, ki je pri 650 nm imela navidezno absorbanco 0.5 ± 0.01 .

Hemolitično aktivnost smo spremljali s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA), ki omogoča hkratno zasledovanje 96 časovnih potekov. Na mikrotitrnih ploščah smo napolnili 108 vdolbinic s po 100 μ l eritrocitnega pufru in 20 μ l posameznega vzorca (A, B in M ekstrakta posameznih spužev). Nato smo v vsako vdolbinico dodali še po 100 μ l eritrocitov in pričeli z meritvijo. Hemolizo smo opazovali kot padec absorbance pri 650 nm. Kot kontrolo smo uporabili 100 μ l eritrocitnega pufru, 20 μ l etanola in 100 μ l eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 20 minut pri 25 °C. Vzorce smo glede na hitrost poteka hemolize razdelili v štiri skupine in sicer na vzorce pri katerih je hemoliza potekla v času do 5 minut smo označili z +++, vzorce pri katerih je hemoliza potekla v času od 5 do 10 minut smo označili z ++, vzorce pri katerih je hemoliza potekla v času od 10 do 15 minut smo označili z + in vzorce pri katerih je hemoliza potekla po 15 minutah oziroma ni potekla. Vse vzorce pri katerih je hemoliza potekla v času do 10 minut smo nadalje redčili v razmerjih 1:10, 1:100 ter 1:1000, in smo jim odčitali polovične čase (t_{50}) oz. čas pri katerem navidezna absorbanca suspenzije eritrocitov pade na polovico svoje začetne vrednosti.

3.2.2 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju

Protibakterijsko aktivnost vzorcev spužev smo testirali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Kot testni bakteriji smo uporabili po Gramu negativno bakterijo *Escherichia coli* in po Gramu pozitivno bakterijo *Bacillus subtilis*. Obe bakteriji sta v zbirki Katedre za biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Omenjeni bakteriji smo sterilno nacepili v 100 ml erlenmajerici, ki sta vsebovali po 10 ml avtoklaviranega tekočega gojišča. Gojišče smo predhodno pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 2,5 g gojišča Luria broth (Luria broth, raztopina 10 g/L triptona, 5 g/L ekstrakta kvasovk, 10 g/L NaCl, Sigma, ZDA). in raztopino razdelili v erlenmajerici. Erlenmajerici z nacepljenim gojiščem smo preko noči stresali pri 250 obratov/minuto pri 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 Luria broth tekoče gojišče. 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 in mešanjem 25 g gojišča Luria broth in 15 g agarja (Merck, Nemčija) v 1 litru deionizirane vode. Tako pripravljen medij smo nalili v 2 l erlenmajerice in jih pokrili z aluminijasto folijo ter avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo vroč medij pustili, da se je ohladil na primerno temperaturo (~42 °C). Medtem smo izračunali potrebni 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 v 1 l avtoklaviranega gojiščnega medija. Preračunane volumne smo sterilno prenesli v ohlajeni medij ter dobro premešali. Sledilo je razlivanje plošč, pri čemer smo po 20 ml agarja z vcepljeno bakterijsko kulturo razlili na vsako od 72 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 vsako ploščo zvrtili 4 luknje premera 1 cm. V vsako od njih smo za test dodali po 100 µl posameznega vzorca (acetonskega, butanolnega ali metanolnega ekstrakta posameznih spužev). Kot kontrolo smo uporabili 100 µl etanola. 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 se inhibicijska cona ni več kazala. Redčenja so bila 1:10, 1:100, 1:1000 in 1:10000. Na ta način smo določili približno minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) vsakega od aktivnih vzorcev.

3.2.3 Test inhibicije acetilholinesteraze

AChE je encim, ki v sinaptičnih špranjah hidrolizira acetilholin in s tem prepreči konstantno vezavo omenjenega nevrottransmitorja na receptorje postsinaptične membrane, kar bi sicer povzročalo neprestano proženje postsinaptičnih potencialov. Zato lahko spojine, ki inhibirajo delovanje acetilholinesteraze, uvrščamo med nevrotoksine.

Aktivnost acetilholinesteraze 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 ga raztopili v 100 mM fosfatnem pufru, pH 7.3 v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/ml. Pred testom smo ga stokrat redčili v istem pufru. Mikrotitrno ploščo smo napolnili s po 140 µl 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 še s po 10 µl substrata acetilholina s končno koncentracijo 1 mM. Potem smo v posamezne vdolbinice dodali 20 µl vsakega testnega vzorca (acetonskega, butanolnega ali metanolnega ekstrakta posameznih spužev) in tik pred začetkom meritve še 50 µl encima AChE. Kontrola je namesto vzorca vsebovala 20 µl etanola.

S testom smo izločili vzorce, ki ne inhibirajo delovanja encima. Vzorce, ki pa so inhibirali delovanje encima smo še enkrat testirali in uporabili le 2 μ l vzorca, tako da je bila koncentracija desetkrat manjša kot v prvem poskusu. Vse vzorce pri katerih smo ugotovili pozitiven rezultat smo v nadaljevanju redčili v razmerjih 1: 10 in 1:100. 12 minut smo spremljali absorbanco pri 412 nm in 25 °C.

3.2.4 Test inhibicije proteinske fosfataze 1

Fosfataze so celični encimi, ki sodelujejo pri fosforilaciji in defosforilaciji celičnih proteinov in tako omogočajo njihovo aktivacijo oz. deaktivacijo. Motnje v delovanju fosfataz največkrat privedejo do nenormalnega metabolizma celice, kar se navadno kaže v pospešeni oz. upočasnjeni rasti. Aktivnost PP1 in njeno inhibicijo s testnimi vzorci smo zasledovali s kolorimetrično metodo (Tubaro in sod., 1996) s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Uporabili smo encim PP1, ki je kunčja rekombinantna α -izooblika izražena v *E. coli* (Sigma, ZDA). Jamice mikrotitrne plošče smo napolnili s po 150 μ l pufra (raztopina 40 mM TRIS-HCl, 34 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$, 4 mM etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA) in 4 mM DL-ditiotreitol (DL-DTT), pH 8.4), za kontrolo dodali še 2 μ l etanola, v test pa po 2 μ l vzorca (A, B ali M ekstrakta posameznih spužev). Tik pred začetkom meritve smo v vse jamice na plošči dodali še 50 μ l encima PP1.

Vzorce, ki so pokazali inhibitorno aktivnost na PP1 smo redčili v razmerjih 1:10 in 1:100 in ponovili poskus. 12 minut smo spremljali absorbanco pri 412 nm in 25 °C.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH

Koncentracijo suhe snovi v ekstraktih smo ugotavljali s sušenjem 500 μ l vzorca na stehtanem in označenem urnem stekelcu. Sušenje je potekalo v sterilizatorju 30 min pri 120 °C. Po sušenju smo stekelca ponovno stehtali in preračunali suhe teže v mg/ml.

V preglednici 4 so prikazane koncentracije suhe snovi v vseh testiranih ekstraktih spužev, ki smo jih uporabili pri preračunavanju količine snovi v bioloških testih.

Preglednica 4: Koncentracije suhe snovi v organskih ekstraktih spužev.

A = acetonski ekstrakt

B = butanolni ekstrakt

M = metanolni ekstrakt

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Suhe teže (mg/ml)
<i>Agelas conifera</i>	97B	1,08
	97A	8,46
	97M	29,52
<i>Agelas dispar</i>	88B	6,66
	88A	3,00
	88M	39,60
<i>Aplysina archeri</i>	40B	8,40
	40A	3,60
	40M	27,60
<i>Aplysina lacunosa</i>	112B	8,76
	112A	14,94
	112M	26,82

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Suhe teže (mg/ml)
<i>Callyspongia plicifera</i>	9B	5,40
	9A	0,60
	9M	15,60
<i>Callyspongia plicifera</i>	67B	6,18
	67A	0,72
	67M	20,70
<i>Callyspongia plicifera</i>	103B	1,20
	103A	1,74
	103M	14,58
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48B	4,08
	48A	2,40
	48M	21,72
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66B	4,38
	66A	0,48
	66M	23,58
<i>Holopsamma helwigi</i>	5B	4,20
	5A	1,80
	5M	26,40
<i>Ircinia sp.</i>	107B	9,00
	107A	8,88
	107M	13,86
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132B	6,96
	132A	2,64
	132M	20,46
<i>Ircinia campana</i>	70B	6,60
	70A	6,60
	70M	28,20
<i>Ircinia felix</i>	59B	21,60
	59A	1,32
	59M	44,40
<i>Ircinia felix</i>	93B	11,28
	93A	7,20
	93M	32,40
<i>Ircinia strobilina</i>	56B	3,00
	56A	3,00
	56M	21,60

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Suhe teže (mg/ml)
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110B	20,04
	110A	12,48
	110M	32,88
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83B	3,18
	83A	0,72
	83M	6,84
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94B	2,22
	94A	1,14
	94M	13,32
<i>Panadaros acanthifouum</i>	76B	6,00
	76A	2,40
	76M	34,20
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2B	5,22
	2A	3,66
	2M	15,24
<i>Sphaciospongia vesparum</i>	45B	5,28
	45A	0,60
	45M	16,20
<i>Tridideum misolidum</i>	79B	7,74
	79A	3,24
	79M	17,52
<i>Verongula gigantea</i>	44B	4,26
	44A	5,40
	44M	13,80
<i>Verongula rigida</i>	38B	8,46
	38A	5,64
	38M	12,00
<i>Xestospongia muta</i>	95B	4,02
	95A	1,32
	95M	26,94
Neidentificirana spužva 1	21B	4,80
	21A	3,00
	21M	27,60
Neidentificirana spužva 2	32B	5,76
	32A	5,58
	32M	9,90

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Suhe teže (mg/ml)
<i>Neidentificirana spužva 3</i>	96B	4,02
	96A	1,08
	96M	7,14
<i>Neidentificirana spužva 4</i>	117B	7,80
	117A	1,92
	117M	21,66

4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

Hemolitično aktivnih je bilo 24 od 90 testiranih vzorcev. 12 vzorcev je kazalo šibko hemolizo, ki je potekla v času med 10 in 15 minut, osem vzorcev je bilo zmerno hemolitičnih (hemoliza je potekla v času med pet in 10 minut), medtem ko so štirje vzorci 110A, 59A, 59M in 59M (acetonski ekstrakti spužev *Lissodendoryx colombiensis*, *Ircinia felix* ter metanolni in butanolni ekstrakt spužve *Ircinia felix*) kazali močno hemolitično aktivnost, saj je bil polovični čas hemolize krajši od petih minut (Preglednica 5). Pri nadaljnjih redčitvah smo uporabili vzorce spužev *Lissodendoryx colombiensis* (110A), *Ircinia felix* (59A, 59B in 59M) *Ircinia sp.*(107A in 107B), *Ircinia campana* (70A in 70B), *Ircinia felix* (93A in 93M), *Ircinia sp. abseits* (132A in 132M), *Ircinia strobilina* (56A), *Pseudoceratina crassa* (2A), *Verongula gigantea* (44A) ter *Verongula rigida* (38B) (Preglednica 6). Vzorcem smo določili tudi t_{50} .

Kontrole niso kazale hemolitične aktivnosti. Od vseh testiranih vzorcev, ki smo jih dodatno redčili še v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000, so aktivnost pri redčitvi 1:10 kazali vsi ekstrakti spužve *Ircinia felix* (59A, 59B in 59M) ter acetonski ekstrakt spužve *Lissodendoryx colombiensis* (110A). Najhitrejši polovični čas hemolize pri redčitvi 1:10 je imel vzorec 59M in sicer 270 sekund. Večje redčitve niso bile aktivne.

Preglednica 5: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov testiranih spužev. Hemolitično aktivnost smo ovrednotili na naslednji način:

+++ → hemoliza potekla do 5 minut

++ → hemoliza potekla v času od 5 do 10 minut

+ → hemoliza potekla v času od 10 do 15 minut

- → hemoliza potekla po 15 minutah oz. ni potekla

A = acetonski ekstrakt

M = metanolni ekstrakt

B = butanolni ekstrakt

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Hemoliza (+++,++,+,-)
<i>Agelas conifera</i>	97B	0,10	-
	97A	0,77	-
	97M	2,68	-
<i>Agelas dispar</i>	88B	0,61	-
	88A	0,27	-
	88M	3,60	-
<i>Aplysina archeri</i>	40B	0,76	-
	40A	0,33	-
	40M	2,51	-
<i>Aplysina lacunosa</i>	112B	0,80	-
	112A	1,36	-
	112M	2,44	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	9B	0,49	-
	9A	0,05	-
	9M	1,42	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	67B	0,56	-
	67A	0,07	-
	67M	1,88	-
<i>Callyspongia plicifera</i>	103B	0,11	-
	103A	0,16	-
	103M	1,33	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48B	0,37	-
	48A	0,22	-
	48M	1,97	-
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66B	0,10	-
	66A	0,77	-
	66M	2,68	-

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Hemoliza (+++,++,+,-)
<i>Holopsamma helwigi</i>	5B	0,40	-
	5A	0,04	-
	5M	2,14	-
<i>Ircinia sp.</i>	107B	0,38	++
	107A	0,16	++
	107M	2,40	+
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132B	0,82	++
	132A	0,81	+
	132M	1,26	-
<i>Ircinia campana</i>	70B	0,63	+
	70A	0,24	+
	70M	1,86	-
<i>Ircinia felix</i>	59B	0,60	+++
	59A	0,60	+++
	59M	2,56	+++
<i>Ircinia felix</i>	93B	1,96	+
	93A	0,12	++
	93M	4,04	+
<i>Ircinia strobilina</i>	56B	1,03	+
	56A	0,65	++
	56M	2,95	-
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110B	0,27	-
	110A	0,27	+++
	110M	1,96	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83B	1,82	-
	83A	1,13	-
	83M	2,99	-
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94B	0,20	-
	94A	0,10	-
	94M	1,12	-
<i>Panadaros acanthifouum</i>	76B	0,55	-
	76A	0,22	-
	76M	3,11	-

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Hemoliza (+++,++,+,-)
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2B	0,47	-
	2A	0,33	++
	2M	1,39	-
<i>Sphaciospongia vesparum</i>	45B	0,48	-
	45A	0,05	-
	45M	1,47	-
<i>Tridideum misolidum</i>	79B	0,70	-
	79A	0,29	-
	79M	1,59	-
<i>Verongula gigantea</i>	44B	0,39	+
	44A	0,49	++
	44M	1,25	+
<i>Verongula rigida</i>	38B	0,77	++
	38A	0,51	+
	38M	1,09	+
<i>Xestospongia muta</i>	95B	0,37	-
	95A	0,12	-
	95M	2,45	-
Neidentificirana spužva 1	21B	0,44	-
	21A	0,27	-
	21M	2,51	-
Neidentificirana spužva 2	32B	0,52	+
	32A	0,51	-
	32M	0,90	-
Neidentificirana spužva 3	96B	0,37	-
	96A	0,10	-
	96M	0,65	-
Neidentificirana spužva 4	117B	0,71	-
	117A	0,17	-
	117M	1,97	-

Preglednica 6: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov spužev, ki so v preliminarnem testu povzročili hemolizo v manj kot petih minutah, ter izbrani vzorci, ki so hemolizo povzročili v petih do desetih minutah (107B, 107A, 70B, 70A, 93A, 93M, 132B, 132A, 56A, 2A, 44A ter 38B). Vzorci smo redčili z etanolom v različnih razmerjih, kot je prikazano v tabeli. Aktivnim vzorcem smo določili t_{50} , to je čas, v katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pri 650 nm pade za 50%.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Čas polovične hemolize (t_{50}) (s)
<i>Ircinia sp.</i>	107B	1:10	0,08	Ni aktivnosti
		1:100	0,008	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0008	Ni aktivnosti
	107A	1:10	0,08	Ni aktivnosti
		1:100	0,008	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0008	Ni aktivnosti
<i>Ircinia campana</i>	70B	1:10	0,06	Ni aktivnosti
		1:100	0,006	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0006	Ni aktivnosti
	70A	1:10	0,06	Ni aktivnosti
		1:100	0,006	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0006	Ni aktivnosti
<i>Ircinia felix</i>	93A	1:10	0,07	Ni aktivnosti
		1:100	0,007	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0007	Ni aktivnosti
	93M	1:10	0,30	Ni aktivnosti
		1:100	0,03	Ni aktivnosti
		1:1000	0,003	Ni aktivnosti
<i>Ircinia felix</i>	59B	1:10	0,20	660
		1:100	0,02	Ni aktivnosti
		1:1000	0,002	Ni aktivnosti
	59A	1:10	0,01	750
		1:100	0,001	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0001	Ni aktivnosti
	59M	1:10	0,40	270
		1:100	0,04	Ni aktivnosti
		1:1000	0,004	Ni aktivnosti

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Čas polovične hemolize (t₅₀) (s)
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132B	1:10	0,06	Ni aktivnosti
		1:100	0,006	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0006	Ni aktivnosti
	132A	1:10	0,02	Ni aktivnosti
		1:100	0,002	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0002	Ni aktivnosti
<i>Ircinia strobilina</i>	56A	1:10	0,03	Ni aktivnosti
		1:100	0,003	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0003	Ni aktivnosti
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110A	1:10	0,11	780
		1:100	0,011	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0011	Ni aktivnosti
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2A	1:10	0,03	Ni aktivnosti
		1:100	0,003	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0003	Ni aktivnosti
<i>Verongula gigantea</i>	44A	1:10	0,05	Ni aktivnosti
		1:100	0,005	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0005	Ni aktivnosti
<i>Verongula rigida</i>	38B	1:10	0,08	Ni aktivnosti
		1:100	0,008	Ni aktivnosti
		1:1000	0,0008	Ni aktivnosti

4.3 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Protibakterijsko aktivnost smo definirali kot širino inhibicijske cone, ki je enaka ali večja enem mm. Proti po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* je protibakterijsko aktivnost kazalo 36 od 90 testiranih vzorcev, medtem ko je bila protibakterijska aktivnost precej bolj izražena proti po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis*, saj so vsi vzorci kazali protibakterijsko aktivnost (preglednica 7). Najbolj aktivne vzorce smo dodatno redčili v razmerjih 1:10, 1:100, 1:1000 in ugotavljali približne MIK. Etanol (kontrola) ni kazal protibakterijske aktivnosti. Rezultate dodatnih redčenj prikazuje preglednica 8. Kontrole protibakterijske aktivnosti niso kazale.

Preglednica 7: Protibakterijska aktivnost organskih ekstraktov vzorcev spužev proti sevom *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>E. coli</i>)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>B. subtilis</i>)
<i>Agelas conifera</i>	97B	1,08	1	2
	97A	8,46	1,5	4
	97M	29,52	6	9
<i>Agelas dispar</i>	88B	6,66	-	2
	88A	3,00	-	2
	88M	39,60	-	3
<i>Aplysina archeri</i>	40B	8,40	1	5
	40A	3,60	2	3
	40M	27,60	1	4
<i>Aplysina lacunosa</i>	112B	8,76	-	3
	112A	14,94	-	3
	112M	26,82	-	2
<i>Callyspongia plicifera</i>	9B	5,40	-	1
	9A	0,60	-	2
	9M	15,60	-	2

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>E. coli</i>)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>B. subtilis</i>)
<i>Callyspongia plicifera</i>	67B	6,18	-	2
	67A	0,72	-	3
	67M	20,70	-	2
<i>Callyspongia plicifera</i>	103B	1,20	2	2
	103A	1,74	1	3
	103M	14,58	1	1
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48B	4,08	1	2
	48A	2,40	-	2
	48M	21,72	2	2
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66B	4,38	-	4
	66A	0,48	-	3
	66M	23,58	-	1
<i>Holopsamma helwigi</i>	5B	4,20	-	5
	5A	1,80	-	3
	5M	26,40	-	2
<i>Ircinia sp.</i>	107B	9,00	-	10
	107A	8,88	-	9
	107M	13,86	-	9
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132B	6,96	-	8
	132A	2,64	-	8
	132M	20,46	-	6
<i>Ircinia campana</i>	70B	6,60	-	5
	70A	6,60	-	7
	70M	28,20	-	6
<i>Ircinia felix</i>	59B	21,60	1	10
	59A	1,32	1	9
	59M	44,40	1	9
<i>Ircinia felix</i>	93B	11,28	3	12
	93A	7,20	1	13
	93M	32,40	1	9
<i>Ircinia strobilina</i>	56B	3,00	-	3
	56A	3,00	-	10
	56M	21,60	-	4

se nadaljuje

nadaljevanje

<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110B	20,04	-	3
	110A	12,48	1	4
	110M	32,88	-	5
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83B	3,18	-	3
	83A	0,72	-	3
	83M	6,84	1	3
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94B	2,22	-	4
	94A	1,14	2	4
	94M	13,32	1	3
<i>Panadaros acanthifouum</i>	76B	6,00	-	2
	76A	2,40	-	3
	76M	34,20	-	5
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2B	5,22	1	3
	2A	3,66	-	7
	2M	15,24	-	3
<i>Spheciospongia vesparum</i>	45B	5,28	-	2
	45A	0,60	1	2
	45M	16,20	1	2
<i>Tridideum misolidum</i>	79B	7,74	2	2
	79A	3,24	1	3
	79M	17,52	-	3
<i>Verongula gigantea</i>	44B	4,26	1	4
	44A	5,40	1	5
	44M	13,80	1	4
<i>Verongula rigida</i>	38B	8,46	1	6
	38A	5,64	1	6
	38M	12,00	-	6
<i>Xestospongia muta</i>	95B	4,02	-	6
	95A	1,32	-	4
	95M	26,94	-	5
<i>Neidentificirana spužva 1</i>	21B	4,80	1	2
	21A	3,00	1	2
	21M	27,60	-	3
<i>Neidentificirana spužva 2</i>	32B	5,76	1	4
	32A	5,58	1	4
	32M	9,90	1	3

se nadaljuje

nadaljevanje

<i>Neidentificirana spužva 3</i>	96B	4,02	-	3
	96A	1,08	-	2
	96M	7,14	-	2
<i>Neidentificirana spužva 4</i>	117B	7,80	-	3
	117A	1,92	-	3
	117M	21,66	-	2

Preglednica 8: Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) vzorcev, ki so pred redčenjem kazali najmočnejšo inhibicijo rasti bakterij *E. coli* in/ali *B. subtilis*.

Oznaka vzorca	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>E. coli</i>)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>B. subtilis</i>)	MIK <i>E. coli</i> (mg/ml)	MIK <i>B. subtilis</i> (mg/ml)
97M	1:10	2,952	-	4	/	0,02952
	1:100	0,2952	-	2		
	1:1000	0,02952	-	1		
	1:10000	0,002952	/	-		
40B	1:10	0,84	/	3	/	0,084
	1:100	0,084	/	2		
	1:1000	0,0084	/	-		
40A	1:10	0,36	/	1	/	0,36
	1:100	0,036	/	-		
	1:1000	0,0036	/	-		
40M	1:10	2,76	/	2	/	0,276
	1:100	0,276	/	1		
	1:1000	0,0276	/	-		
66B	1:10	0,438	/	2	/	0,0438
	1:100	0,0438	/	1		
	1:1000	0,00438	/	-		
103B	1:10	0,12	-	/	1,20	/
	1:100	0,012	-	/		
	1:1000	0,0012	-	/		
5B	1:10	0,42	/	2	/	0,0042
	1:100	0,042	/	1		
	1:1000	0,0042	/	1		
	1:10000	0,00042	/	-		
107B	1:10	0,9	/	8	/	0,009
	1:100	0,09	/	5		
	1:1000	0,009	/	2		
	1:10000	0,0009	/	-		
107A	1:10	0,888	/	7	/	0,00888
	1:100	0,0888	/	5		
	1:1000	0,00888	/	3		
	1:10000	0,000888	/	-		

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka vzorca	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>E. coli</i>)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>B. subtilis</i>)	MIK <i>E. coli</i> (mg/ml)	MIK <i>B. subtilis</i> (mg/ml)
107M	1:10	1,386	/	6	/	0,001386
	1:100	0,1386	/	4		
	1:1000	0,01386	/	2		
	1:10000	0,001386	/	1		
132B	1:10	0,696	/	7	/	0,00696
	1:100	0,0696	/	4		
	1:1000	0,00696	/	2		
	1:1000	0,000696	/	-		
132A	1:10	0,264	/	7	/	0,00264
	1:100	0,0264	/	4		
	1:1000	0,00264	/	2		
	1:10000	0,000264	/	-		
132M	1:10	2,046	/	6	/	0,02046
	1:100	0,2046	/	3		
	1:1000	0,02046	/	2		
	1:10000	0,002046	/	-		
70B	1:10	0,66	/	3	/	0,066
	1:100	0,066	/	1		
	1:1000	0,0066	/	-		
70A	1:10	0,66	/	3	/	0,0066
	1:100	0,066	/	1		
	1:1000	0,0066	/	0,5		
70M	1:10	2,82	/	3	/	0,0282
	1:100	0,282	/	2		
	1:1000	0,0282	/	1		
	1:10000	0,00282	/	-		
59B	1:10	2,16	/	11	/	0,0216
	1:100	0,216	/	8		
	1:1000	0,0216	/	2		
	1:10000	0,00216	/	-		

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka vzorca	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>E. coli</i>)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>B. subtilis</i>)	MIK <i>E. coli</i> (mg/ml)	MIK <i>B. subtilis</i> (mg/ml)
59A	1:10	0,132	/	9	/	0,00132
	1:100	0,0132	/	6		
	1:1000	0,00132	/	1		
	1:10000	0,000132	/	-		
59M	1:10	4,44	/	12	/	0,00444
	1:100	0,444	/	11		
	1:1000	0,0444	/	7		
	1:10000	0,00444	/	1		
	1:100000	0,000444	/	-		
93B	1:10	1,128	/	3	/	0,01128
	1:100	0,1128	/	1,5		
	1:1000	0,01128	/	1		
	1:10000	0,001128	/	-		
93A	1:10	0,72	/	6	/	0,0072
	1:100	0,072	/	2		
	1:1000	0,0072	/	1		
	1:10000	0,00072	/	-		
93M	1:10	3,24	/	6	/	0,324
	1:100	0,324	/	2		
	1:1000	0,0324	/	-		
56B	1:10	0,30	/	3	/	0,0003
	1:100	0,03	/	2		
	1:1000	0,003	/	1		
	1:10000	0,0003	/	0,5		
94B	1:10	0,222	/	2	/	0,0222
	1:100	0,0222	/	0,5		
	1:1000	0,00222	/	-		
94A	1:10	0,114	-	2	1,14	0,00114
	1:100	0,0114	-	1		
	1:1000	0,00114	-	1		

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka vzorca	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>E. coli</i>)	Širina inhibicijske cone (mm) (<i>B. subtilis</i>)	MIK <i>E. coli</i> (mg/ml)	MIK <i>B. subtilis</i> (mg/ml)
2A	1:10	0,366	/	2	/	0,00366
	1:100	0,0366	/	2		
	1:1000	0,00366	/	1		
	1:10000	0,000366	/	-		
44B	1:10	0,426	/	3	/	0,000426
	1:100	0,0426	/	2		
	1:1000	0,00426	/	1		
	1:10000	0,000426	/	-		
44A	1:10	0,54	/	3	/	0,00054
	1:100	0,054	/	2		
	1:1000	0,0054	/	1		
	1:10000	0,00054	/	0,5		
38B	1:10	0,846	/	3	/	0,000846
	1:100	0,0846	/	2		
	1:1000	0,00846	/	1		
	1:10000	0,000846	/	1		
38A	1:10	0,564	/	5	/	0,00564
	1:100	0,0564	/	2		
	1:1000	0,00564	/	1		
	1:10000	0,000564	/	-		
38M	1:10	1,20	/	6	/	0,012
	1:100	0,12	/	3		
	1:1000	0,012	/	1		
	1:10000	0,0012	/	-		
32B	1:10	0,576	/	2	/	0,0576
	1:100	0,0576	/	1		
	1:1000	0,00576	/	-		
32A	1:10	0,558	/	3	/	0,0558
	1:100	0,0558	/	2		
	1:1000	0,00558	/	-		

4.4 ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST

Po prvem testu je pet vzorcev (metanolni ekstrakti vrst *Agelas conifera*, *Aplysinia archeri*, *Aplysinia lacunosa*, *Ircinia felix* in neidentificirane spužve 1) kazalo antiacetilholinesterazno aktivnost (preglednica 9), zato smo jih naknadno redčili v razmerjih 1:10 in 1:100. Rezultate teh redčenj prikazuje preglednica 10.

Rezultati kažejo, da imajo skoraj vsi izbrani vzorci pri deset- in stokratnem redčenju še vedno sposobnost inhibicije AChE. Najbolj aktiven je bil vzorec 97M (desetkratna redčitev še vedno povzroča 22.78% inhibicijo AChE).

Preglednica 9: Antiacetilholinesterazna aktivnost testiranih vzorcev spužev glede na kontrolo (18 mOD/min).

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnosti AChE glede na kontrolo (%)
<i>Agelas conifera</i>	97B	0,011	99,44
	97A	0,088	83,33
	97M	0,308	11,11
<i>Agelas dispar</i>	88B	0,069	72,22
	88A	0,031	83,33
	88M	0,413	38,89
<i>Aplysinia archeri</i>	40B	0,088	83,33
	40A	0,038	88,89
	40M	0,288	50
<i>Aplysinia lacunosa</i>	112B	0,091	83,33
	112A	0,156	83,33
	112M	0,279	38,89
<i>Callyspongia plicifera</i>	9B	0,056	94,44
	9A	0,006	100
	9M	0,163	88,89

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnosti AChE glede na kontrolo (%)
<i>Callyspongia plicifera</i>	67B	0,064	94,44
	67A	0,008	100
	67M	0,216	88,89
<i>Callyspongia plicifera</i>	103B	0,013	94,44
	103A	0,018	94,44
	103M	0,152	88,89
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48B	0,043	100
	48A	0,025	100
	48M	0,226	88,89
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66B	0,046	88,89
	66A	0,005	83,33
	66M	0,246	77,78
<i>Holopsamma helwigi</i>	5B	0,044	94,44
	5A	0,019	100
	5M	0,275	88,89
<i>Ircinia sp.</i>	107B	0,094	83,33
	107A	0,093	77,78
	107M	0,144	88,89
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132B	0,073	88,89
	132A	0,028	83,33
	132M	0,213	83,33
<i>Ircinia campana</i>	70B	0,069	88,89
	70A	0,069	88,89
	70M	0,294	77,78
<i>Ircinia felix</i>	59B	0,225	72,22
	59A	0,014	66,67
	59M	0,463	55,56
<i>Ircinia felix</i>	93B	0,118	72,22
	93A	0,075	77,78
	93M	0,338	50
<i>Ircinia strobilina</i>	56B	0,031	100
	56A	0,031	88,89
	56M	0,225	83,33

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnosti AChE glede na kontrolo (%)
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110B	0,209	77,78
	110A	0,130	72,22
	110M	0,343	55,56
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83B	0,033	94,44
	83A	0,008	100
	83M	0,071	94,44
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94B	0,023	88,89
	94A	0,012	94,44
	94M	0,139	77,78
<i>Panadaros acanthifouum</i>	76B	0,063	88,89
	76A	0,025	88,89
	76M	0,356	77,78
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2B	0,054	83,33
	2A	0,038	77,78
	2M	0,159	72,22
<i>Spheciospongia vesparum</i>	45B	0,055	94,44
	45A	0,006	94,44
	45M	0,169	72,22
<i>Tridideum misolidum</i>	79B	0,081	94,44
	79A	0,034	94,44
	79M	0,183	94,44
<i>Verongula gigantea</i>	44B	0,044	83,33
	44A	0,056	83,33
	44M	0,144	66,67
<i>Verongula rigida</i>	38B	0,088	72,22
	38A	0,059	77,78
	38M	0,125	72,22
<i>Xestospongia muta</i>	95B	0,042	88,89
	95A	0,014	94,44
	95M	0,281	83,33
<i>Neidentificirana spužva 1</i>	21B	0,050	77,78
	21A	0,031	83,33
	21M	0,288	38,89

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnosti AChE glede na kontrolo (%)
<i>Neidentificirana spužva 2</i>	32B	0,060	72,22
	32A	0,058	83,33
	32M	0,103	55,56
<i>Neidentificirana spužva 3</i>	96B	0,042	83,33
	96A	0,011	94,44
	96M	0,074	61,11
<i>Neidentificirana spužva 4</i>	117B	0,081	88,89
	117A	0,020	88,89
	117M	0,226	83,33

Preglednica 10: Dodatna redčenja vzorcev spužev, ki so v preliminarnem testu pokazali močno inhibicijo acetilholinesteraze.

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnosti AChE glede na kontrolo (%)
<i>Neidentificirana spužva 1</i>	21M	1:10	0,0288	83,33
		1:100	0,00288	100,00
<i>Aplysina lacunosa</i>	112M	1:10	0,0279	83,33
		1:100	0,00279	94,44
<i>Ircinia felix</i>	93M	1:10	0,0338	83,33
		1:100	0,00338	94,44
<i>Aplysina archeri</i>	40M	1:10	0,0288	88,89
		1:100	0,00288	100,00
<i>Agelas conifera</i>	97M	1:10	0,0308	72,22
		1:100	0,00308	94,44

4.5 INHIBICIJA PROTEINSKE FOSFATAZE 1

Preglednica 11 prikazuje test inhibicije PP1. 11 od 90 vzorcev je močno inhibiralo PP1 (40B, 40A, 40M, 103M, 48M, 93M, 83B, 83M, 21B, 21A in 21M). Zaradi pomanjkanja encima nadaljnjih redčenj nismo izvedli.

Preglednica 11: Test inhibicije proteinske fosfataze 1 z vzorci spužev. Stopnja aktivnosti encima PP1 je izražena glede na kontrolo (3 mOD/min).

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnost PP1 glede na kontrolo (%)
<i>Agelas conifera</i>	97B	0,026	0,67
	97A	0,206	0,67
	97M	0,720	100
<i>Agelas dispar</i>	88B	0,162	0,33
	88A	0,073	0,67
	88M	0,966	0,67
<i>Aplysina archeri</i>	40B	0,205	0
	40A	0,088	0
	40M	0,673	0
<i>Aplysina lacunosa</i>	112B	0,214	0,33
	112A	0,364	0,33
	112M	0,654	100
<i>Callyspongia plicifera</i>	9B	0,132	0,33
	9A	0,015	0,33
	9M	0,380	0,67
<i>Callyspongia plicifera</i>	67B	0,151	0,33
	67A	0,018	0,67
	67M	0,505	0,67

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnost PP1 glede na kontrolo (%)
<i>Callyspongia plicifera</i>	103B	0,029	0,33
	103A	0,042	0,67
	103M	0,356	0
<i>Callyspongia vaginalis</i>	48B	0,100	0,67
	48A	0,059	0,33
	48M	0,530	0
<i>Callyspongia vaginalis</i>	66B	0,107	0,67
	66A	0,012	0,67
	66M	0,575	0,67
<i>Holopsamma helwigi</i>	5B	0,102	0,33
	5A	0,044	0,33
	5M	0,644	0,33
<i>Ircinia sp.</i>	107B	0,220	0,33
	107A	0,217	0,33
	107M	0,338	0,67
<i>Ircinia sp. abseits</i>	132B	0,170	0,33
	132A	0,064	0,67
	132M	0,499	0,67
<i>Ircinia campana</i>	70B	0,161	0,67
	70A	0,161	0,33
	70M	0,688	0,67
<i>Ircinia felix</i>	59B	0,527	0,33
	59A	0,032	0,67
	59M	1,083	0,33
<i>Ircinia felix</i>	93B	0,275	0,33
	93A	0,176	0,67
	93M	0,790	0
<i>Ircinia strobilina</i>	56B	0,073	0,67
	56A	0,073	0,67
	56M	0,527	0,67
<i>Lissodendoryx colombiensis</i>	110B	0,489	100
	110A	0,304	0,67
	110M	0,802	0,33

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnost PP1 glede na kontrolo (%)
<i>Neofibularia nolitangere</i>	83B	0,078	0
	83A	0,018	0,33
	83M	0,167	0
<i>Neofibularia nolitangere</i>	94B	0,054	0,67
	94A	0,028	0,67
	94M	0,325	0,67
<i>Panadaros acanthifouum</i>	76B	0,146	0,67
	76A	0,059	0,33
	76M	0,834	0,67
<i>Pseudoceratina crassa</i>	2B	0,127	0,67
	2A	0,089	100
	2M	0,372	0,33
<i>Spheciospongia vesparum</i>	45B	0,129	0,67
	45A	0,015	0,67
	45M	0,395	100
<i>Tridideum misolidum</i>	79B	0,189	0,33
	79A	0,079	0,33
	79M	0,427	0,33
<i>Verongula gigantea</i>	44B	0,104	0,33
	44A	0,132	0,67
	44M	0,337	0,67
<i>Verongula rigida</i>	38B	0,206	0,67
	38A	0,138	0,67
	38M	0,293	0,67
<i>Xestospongia muta</i>	95B	0,098	0,33
	95A	0,032	0,67
	95M	0,657	0,33
<i>Neidentificirana spužva 1</i>	21B	0,117	0
	21A	0,073	0
	21M	0,673	0
<i>Neidentificirana spužva 2</i>	32B	0,140	0,33
	32A	0,136	0,33
	32M	0,241	0,33

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnost PP1 glede na kontrolo (%)
<i>Neidentificirana spužva 3</i>	96B	0,098	0,67
	96A	0,026	0,67
	96M	0,174	0,33
<i>Neidentificirana spužva 4</i>	117B	0,190	0,67
	117A	0,047	0,67
	117M	0,528	0,67

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Zaradi sesilnega načina življenja vsebujejo morske spužve veliko količino edinstvenih spojin (Fu in sod., 1988). Odkrivanje in raziskovanje potencialne komercialne uporabe le-teh, je konec dvajsetega in začetek enaindvajsetega stoletja dobilo na pomenu zlasti v farmakološki, v malo manjšem obsegu pa tudi v drugih industrijah. V zadnjih desetletjih so tako iz morskih spužev izolirali vrsto novih spojin z različnimi biološkimi aktivnostmi, katere s pridom izkorišča farmacevtska industrija. To sta npr. 16-bromo-7,11,15-heksadekatrien-5,1-diinoična ter 18-bromo-9,13,17-oktadekatrien-5,7,15-triinoična kislina, ki sta bromirani poliacetilenski kislini najdeni v spužvi *Xestospongia muta* s sposobnostjo inhibicije HIV-1 proteaze (Patil in sod., 1992). Steroid kot je aragusterol A, ravno tako najden pri rodu *Xestospongia*, inhibira razmnoževanja KB celic ter kaže citotoksičnost za L1210 mišje rakave celice (Mitome in sod., 2003). Namen naloge je bil testirati organske ekstrakte morskih spužev na hemolitično in protibakterijsko aktivnost ter na sposobnost inhibicije encimov acetilholinesteraze in proteinske fosfataze 1.

Tri organska topila z različno polarnostjo in sicer aceton, butanol in metanol, smo uporabili za ekstrakcijo potencialno zanimivih biološko aktivnih spojin iz 30 tropskih morskih spužev. Ekstrakte smo testirali na sposobnost hemolize, protimikrobne aktivnosti proti po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam ter učinkovitost inhibicije encimov acetilholinesteraze in proteinske fosfataze 1.

Hemolitično aktivnost je kazalo le 24 od kar 90 testiranih vzorcev spužev: acetonski, butanolni in metanolni ekstrakti spužev *Ircinia sp.*, *Ircinia felix*, *Verongula gigantea* in *Verongula rigida*, butanolni in acetonski ekstrakti spužev *Ircinia campana*, *Ircinia sp. abseits* in *Ircinia strobilina*, acetonski ekstrakti spužev *Lissodendoryx colombiensis* in *Pseudoceratina crassa* ter butanolni ekstrakt neidentificirane spužve 2. Za dodatna

redčenja smo se odločili le pri 16 najbolj aktivnih ekstraktih spužev izmed katerih so le štirje kazali hemolitično učinkovitost pri desetkratnem redčenju, pri drugih pa konkretnije hemolitične aktivnosti nismo zasledili.

Rezultati niso bili presenetljivi, saj se spužve prehranjujejo s filtracijo in zaradi tega ne potrebujejo specializiranih strupnih aparatov, kot nekatere druge sesilne morske živali, predvsem morske vetrnice (Sepčić in sod., 1997). Zanimivo je tudi dejstvo, da je ena izmed dveh spužev vrste *Ircinia felix* kazala izredno hemolitično aktivnost, druga in njej sorodne vrste iz istega rodu, pa niso kazale močne hemolitične učinkovitosti.

V literaturi ni bila hemolitična aktivnost pri naših spužvah nikoli posebej omenjena, našli pa smo poročila o citotoksičnosti, ki bi lahko bila posledica membranske aktivnosti snovi prisotnih v preučevanih spužvah. Spužve, ki so v literaturi bile opisane kot citotoksične so *Agelas sp.* (Fu in sod., 1998), *Aplysina sp.* (Evan in sod., 2001; Kondo in sod., 1994), *Callyspongia sp.* (Toth in Schmitz., 1994; Youssef in sod., 2003a), *Callyspongia vaginalis.* (Layne in Tinto, 2006), *Ircinia sp.* (Chevallier in sod., 2006; Isa in sod., 2003; Kondo in sod., 1992), *Verongula sp.* (Ciminiello in sod., 1994), ter *Xestospongia sp.* (Langlois, 2001; Quirion in sod., 1992; Mitome in sod., 2003).

Vseh 90 vzorcev spužev smo prav tako testirali v protibakterijskem testu. Proti po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* je dalo pozitiven rezultat, oz. je inhibiralo bakterijsko rast 36 vzorcev. Rezultat je bil precej drugačen pri testu proti po Gramu pozitivni bakteriji *Bacillus subtilis*, kjer so vsi vzorci inhibirali bakterijsko rast. Rezultati so pričakovani, saj smo v literaturi zasledili veliko objav, kjer so prav tako navajali protibakterijsko aktivnost organskih ekstraktov spužev. Glede na to, da je bila inhibicija rasti bolj prisotna pri po Gramu pozitivnih bakterijah, lahko sklepamo na dokaj selektivno delovanje ekstrahiranih učinkovin spužev (Keifer in sod., 1991; Richelle-Maurer in sod., 2003; Shen in sod., 1998; Cafieri in sod., 1998; Fu in sod., 1998; Evan in sod., 2001; Qian in sod., 2006; Martinez in sod., 1997a; Martinez in sod., 1997b; Pawlik in sod., 2002; Duque in sod., 2001; Ciminiello in sod., 1994; Langlois, 2001).

Zaradi tako številnih pozitivnih rezultatov smo 3 vzorce, ki so najbolj učinkovito inhibirali bakterijsko rast *E. coli* ter 32 najbolj aktivnih vzorcev, ki so inhibirale bakterijsko rast *B. subtilis* še dodatno redčili v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000 ter ugotavljali minimalno inhibitorno koncentracijo za posamezen vzorec. Tiste vzorce, ki so po teh redčenjih še vedno kazali inhibicijo rasti, smo dodatno redčili v razmerju 1:10000 ter 1:100000. Spužva *Agelas conifera*, katere dodatno redčen metanolni ekstrakt smo testirali tako na *E. coli* ter *B. subtilis*, je inhibirala rast le *B. subtilis*. V dosedanjih raziskavah je bilo že ugotovljeno, da učinkovine iz spužve *A. conifera* inhibirajo bakterijsko rast, vendar so bile te raziskave organskih ekstraktov narejene predvsem proti po Gramu pozitivnim bakterijam, kot je npr. *Staphylococcus aureus* (Cafieri in sod., 1998b).

Predvsem pomemben pa je rezultat delovanja ne le enega, temveč vseh ekstraktov rodu *Ircinia*, kar je v skladu s pregledanimi objavami (Martinez in sod., 1997a; Martinez in sod., 1997b; Pawlik in sod., 2002). Redčeni ekstrakti so zadržali svojo protimikrobno aktivnost v zelo nizkih koncentracijah (najnižjo koncentracijo smo zabeležili pri butanolnem ekstraktu spužve *Ircinia strobilina* in sicer 0,00003 mg/ml).

V literaturi podatkov o inhibiciji rasti testiranih bakterij nismo našli za spužve, ki v našem testu niso inhibirale rasti ter pri spužvah *Verongula giganturea*, *Verongula rigida* ter *Neofibularia nolitangere*. (Ciminiello in sod., 2000; Mierzwa in sod., 1994; Gunasekera in sod., 1989).

Acetonski ekstrakt spužve *Verongula gigantea* je imel najmanjšo minimalno inhibitorno koncentracijo pri inhibiciji bakterije *B. subtilis*.

Vse spužve smo testirali glede na njihovo sposobnost inhibicije encima acetilholinesteraza (AChE). Izmed vseh testiranih vzorcev jih je le pet inhibiralo encim, zato smo jih nadalje redčili v razmerjih 1:10 in 1:100. Vsi vzorci so kazali šibko inhibicijo encima v razmerju 1:10, pri redčitvi 1:100 pa dva vzorca (metanolni ekstrakt neidentificirane spužve 1 ter metanolni ekstrakt spužve *Aplysina archeri*) nista kazala inhibicijske aktivnosti. Metanolni ekstrakt spužve *Agelas conifera* je kazal najmočnejšo anti-AChE aktivnost, saj je tudi pri desetkratni razredčitvi inhibiral 22.78% encimske aktivnosti.

V zadnjem encimskem testu smo preverjali inhibitorno aktivnost ekstraktov vzorcev spužev na encim proteinsko fosfatazo 1 (PP1). Proteinsko fosfatazo 1 je inhibiralo 11 vzorcev (vsi ekstrakti spužev *Aplysinia archeri* in neidentificirane spužve 1, butanolni in metanolni ekstrakt spužve *Neofibularia nolitangere* ter metanolni ekstrakti spužev *Callyspongia pilcifera*, *Callyspongia vaginalis* in *Ircinia felix*), vendar jih zaradi pomanjkanja encima nismo mogli dodatno redčiti. Kljub temu, da je metanolni ekstrakt spužve *Ircinia felix* inhibiral proteinsko fosfatazo 1, je izmed vseh vzorcev imel najvišjo koncentracijo suhe snovi v testu.

Po opravljenem testiranju vseh 30 vzorcev spužev smo ugotovili, da po bioloških aktivnostih najbolj izstopa vrsta *Ircinia felix*, ki je kazala tako hemolitično kot protibakterijsko aktivnost, ter je delovala inhibitorno proti obema encimoma. Z nadaljnjimi raziskavami ima ta spužva velik potencial za uporabo tako v industriji barv, saj ima protivegetativno aktivnost (Duque in sod., 2001), kot v farmacevtski industriji, saj mnoge raziskave kažejo na njeno močno protimikrobno aktivnost (Duque in sod., 2001; Martinez in sod., 1997a; Martinez in sod., 1997b; Pawlik in sod., 2002).

5.2 SKLEPI

- hemolitično aktivnost je kazalo 24 ekstraktov desetih vrst in sicer *Ircinia sp.*, *Ircinia sp. abseits*, *Ircinia campana*, *Ircinia felix*, *Ircinia strobilina*, *Lissodendoryx colombiensis*, *Pseudoceratina crassa*, *Verongula gigantea*, *Verongula rigida* in Neidentificirana spužva 2
- po dodatnih redčenjih so imeli le vsi ekstrakti spužve *Ircinia felix* ter acetonski ekstrakt *Lissodendoryx colombiensis* močno hemolitično aktivnost
- zaradi močnega protibakterijskega delovanja (vsi vzorci so inhibirali rast *B. subtilis* in 36 vzorcev je inhibiralo rast *E. coli*), smo 33 vzorcev naknadno redčili. Izpostavili bomo le pet najbolj aktivnih in sicer *Verongula rigida*, *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Ircinia sp.* in *Ircinia strobilina*

- proti encimu acetilholinesterazi je po dodatnih redčenjih petih spužev (neidentificirana spužva 1, *Aplysina lacunosa*, *Ircinia felix*, *Aplysina archeri* in *Agelas conifera*), najbolj inhibitorno deloval le še vzorec vrste *Agelas conifera*
- 11 vzorcev (vsi ekstrakti spužev *Aplysina archeri* in neidentificirane spužve 1, butanolni in metanolni ekstrakt spužve *Neofibularia nolitangere* ter metanolni ekstrakti spužev *Callyspongia pilcifera*, *Callyspongia vaginalis* in *Ircinia felix*) je inhibiralo delovanje encima proteinska fosfataza 1
- organski ekstrakti spužev delujejo predvsem hemolitično in protibakterijsko
- potrdili smo v literaturi zasledeno močno protibakterijsko aktivnost rodu *Ircinia*

6 POVZETEK

Zaradi sesilnega načina življenja morajo morske spužve proizvajati vrsto biološko aktivnih snovi, ki jim služijo ali kot obramba pred plenilci, ali kot pomoč pri lovu hrane. Ravno zaradi številnih raznolikih biološko aktivnih spojin so potencialno zanimive tako za farmacevtsko kot druge industrije. 30 tropskih spužev, od katerih je 28 spužev bilo iz otoka Curacao v Nizozemskih Antilih v Karibskem morju, 2 spužvi pa z otoka Lizard, ki je del koralnega grebena ob obali Queenslanda v Avstraliji smo testirali s štirimi različnimi testi. Z organskimi ekstrakti (acetonski, butanolni in metanolni ekstrakti) smo iskali hemolitično in protibakterijsko aktivnost ter inhibicijo delovanja encimov acetilholinesteraze in proteinske fosfataze 1. Glede na literaturo, v kateri smo zasledili predvsem protibakterijske aktivnosti, smo odkrili veliko novosti, predvsem pa bi izpostavil dve spužvi in sicer *Aplysina archeri* ter *Ircinia felix* katerih ekstrakti so pri skoraj vseh poskusih dali rezultate in bi potencialno lahko bili zanimivi za farmakologijo. Dobljeni rezultati kažejo na veliko možnost potencialne uporabe spužve *Ircinia felix* v farmakološki industriji, saj so njeni organski ekstrakti reagirali pozitivno v največjem številu bioloških testov.

7 VIRI

Arreguin R., Arreguin B., Soriano-García M., Hernández-Arana A., Rodríguez-Romero A. 1993. Isolation and characterization of a protease from the marine sponge *Spheciospongia 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

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

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

Cafieri F., Carnuccio R., Fattorusso E., Tagliatalata-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

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

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., 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. 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

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

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

Emura C., Higuchi R., Miyamoto T. 2006. Irciniasulfonic acid B, a novel taurine conjugated fatty acid derivative from a Japanese marine sponge, *Ircinia* sp. *Tetrahedron*, 62: 5682- 5685

Epifanio R. 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

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

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. Dihydroxyaerotherionin and aerophobin 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

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

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

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. Ircinials A and B from the Okinawan Marine Sponge *Ircinia* sp.: Plausible Biogenetic Precursors of Manzamine Alkaloids. *Journal of Organic Chemistry*, 57, 8: 2480-2483

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

Martinez A., Duque C., Sato N., Fujimoto Y. 1997a. (8*Z*,13*Z*,20*Z*)-Strobilinin 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

Martinez A., Duque C., Fujimoto Y. 1997b. Novel Fatty Acid Esters of (7*E*, 12*E*, 18*R*, 20*Z*) – Variabilin from the Marine Sponge *Ircinia felix*. *Lipids*, 32, 5: 565 – 569

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

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

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

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

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., 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tubaro A., Florio C., Luxic E., Sosa S., Dellaloggia R., Yatsumoto T. 1996. A protein Phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadic acid contamination in mussels. *Toxicon*, 34: 743-752

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

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

ZAHVALA

Ob zaključku svoje študijske poti bi se z nekaj stavki rad zahvalil vsem ljudem, ki so mi na takšen ali drugačen način pomagali na moji študijski poti.

Mentorici prof. dr. Kristini Sepčić, ki me je naučila ogromno o delu v laboratoriju, spoštovanju, življenju in premagovanju težav z nasmehom. Vesel sem, da sem imel čast spoznati in se učiti od tako dobrosrčne osebe.

Staršema, ki sta mi vsa leta stala ob strani in sta me podpirala pri vseh odločitvah življenju, čeprav se jima včasih niso zdele smiselne ali logične. Vem da nisem vedno bil vzoren sin in da sta z mano včasih imela težave, zato vama iz srca hvala na potrpljenju, podpori in ljubezni.

Kot zadnji pa bi se rad zahvalil svoji teti Ilijani, ki mi je bolj prijateljica in sestra, kot teta. Hvala ti za sve savjete, dobre riječi i ljubav, koju mi pružaš.

PRILOGE

Priloga A: Pregled objav

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ORG.FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Agelas conferva</i>	Skeptrin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol / diklorometan	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami	Assmann in sod., 2000
	Dibromoskeptrin					
	Bromoageliferin					
	Dibromoageliferin					
	Ageliferin					
	Bromoskeptrin					
	Bromoageliferin					
Dibromoageliferin		Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol / diklorometan	Zmanjšanje napetostno odvisnega vdora Ca^{2+} v PC12 celice	Bickmeyer, 2005

	Skeptrin diacetat	Bromopirolovi	Organska faza	metanol / toluen	Protivirusna aktivnost	Keifer in sod., 1991
	Bromopiroli (1,3-8)	metaboliti		(3:1)	Protibakterijska aktivnost	
	Oroidin	Bromopirolovi	Organska faza	metanol	Vpliv na vedenje korale <i>Madracis mirabilis</i> , zapiranje in vpoteg polipov	Richelle-Maurer in sod., 2003
	Skeptrin	alkaloidi			Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Stegastis partitus</i>	
	Debromoskeptrin	(Bromo)pirolovi	Organska faza	etanol	Protimikrobna aktivnost	
	Analogi pirola	alkaloidi			Protiglivna aktivnost	
					Nizka protimikrobna aktivnost proti bakteriji <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Shen in sod., 1998

<i>Agelas dispar</i>	Aminozooanemonin	Betain alkaloidi	Organska faza	metanol	Zmerna protibakterijska aktivnost	Caferi in sod., 1998
	Piridinbetain A					
	Piridinbetain B					
	Longamid B	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Protibakterijska aktivnost proti Gram+ bakterijam (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>)	Caferi in sod., 1998b
	Klatramid C					
	Klatramid D					
	Keramadin	Steroli			Protiglivna aktivnost proti plesni <i>Aspergillus niger</i>	
	Ekdisteron					
	Ajuga steron C					
	Dispirin	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol		Pina in sod., 2007
<i>Agelas sp.</i>	dibromoagelaspingin metil eter					
	4,5-dibromopirolo-2-karbonsilna kislina	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Zmanjšanje napetostno odvisnega vdora Ca ²⁺ v PC12 celice	Bickmeyer, 2005
	Dispakamid	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Protihistaminska aktivnost na ileumu morskoga prašička	Caferi in sod., 1996
	Monobromovi derivati					

	Dispakamid C	Bromopirolovi alkaloidi	Organska faza	metanol	Protihistaminska aktivnost na ileumu morskega prašička	Cafieri in sod., 1997
	Dispakamid D					
	Agelazin H	Diterpeni	Organska faza	metanol	Citotoksičnost	Fu in sod., 1998
	Agelazin I			metanol / diklorometan	Protimikrobna aktivnost Inhibicija Na ⁺ /K ⁺ ATP-aze	
	Dibromoskeptrin	Alkaloidi			Nevrotoksična aktivnost	Rivera Rentas in sod., 1994
	Klatrodin					
	Monobromoizofakelin	Bromopirolovi	Organska faza	diklorometan / metanol	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Thalassoma bifasciatum</i>	Assmann in Köck, 2002
	Dibromoizofakelin	alkaloidi		(1:1)		
	Monobromofakelin					
	Dibromofakelin					
<i>Aplysina archeri</i>		Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1) kloroform	Protiglivna aktivnost proti protiglivi <i>Cryptococcus neoformans</i>	Ciminiello in sod., 1996

Fistularin 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
	Derivat bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1) kloroform	Protihistaminska aktivnost na ileumu morskoga prašička	Čiminiello in sod., 2001
<i>Aplysina sp.</i>	Derivati dibromotirozina	Organska faza	etil acetat etil acetat / metanol (1:1)	Citotoksičnost Protimikrobna aktivnost	Evan in sod., 2001
	Izoplizin A	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za L1210 mišje in KB človeške rakave celice	Kondo in sod., 1994
	D-6-bromohipaforin Aplizinopsin	Organska faza	metanol		

<i>Callispongia plicifera</i>	Ekstrakt		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>Callispongia sp.</i>	Ilhabelanol	Bisulfatni meroterpenoidi	Organska faza	etanol	Inhibicija adenozin fosforibozil transferaze	Gray in sod., 2006
	Ilhabren			metanol		
	Izoakaterpin	Mastobne 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	Protivegetativna aktivnost	Wang in sod., 1996						
						Kalispongenol A Kalispongenol B Kalispongenol C	Sekundarni metaboliti	Organska faza	metanol / diklorometan (1:1)	Zmerna citotoksičnost za P388 in HeLa rakave celice	Youssef in sod., 2003a
						Dehidroizofonohalinol					
<i>Callyspongia vaginalis</i>	Sekundarni metabolit	Organska faza	aceton	Citotoksičnost za človeške rakave celice Inhibicija α - glukozidaze Protivegetativna aktivnost Inhibicija oploditve pri morskih zvezdah	Layne in Tinto, 2006						
						Butenolid					
<i>Ircinia campana</i>	Furanozester- terpenske tetronske kislinae	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997a						
	(8Z,13Z,20Z)-strobilinin (7Z,13Z,20Z)-feliksinin										

	(7E,12E,18R,20Z)-variabilin	Furanozesterpen	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997b
	Dimetil sulfid	Dušikovi in žveplovi metaboliti	Organska faza	metanol	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Thalassoma bifasciatum</i>	Pawlik in sod., 2002
	Metil izocijanid			diklorometan / metanol		
	Metil izotiocianat			(1:1)		
<i>Ircinia felix</i>		Furanosester-terpenske tetronske kisline			Protimikrobna aktivnost	
	Tiobismetan	Hidrokarboni		plin dušik	Inhibicija Ca ²⁺ transporta	
	Metil izocijanid				Protibakterijska aktivnost proti bakterijam: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Duque in sod., 2001
	Metil izotiocianat				Kemijska obramba pred plenilci in epibionti	

<i>Ircinia sp.</i>	(8Z,13Z,20Z)-strobilimin	Furanosester-terpenske tetronske kisline	Organska faza	Metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997a
	(7Z,13Z,20Z)-feliksinin	Furanosesterterpen	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997b
	(7E,12E,18R,20Z)-variabilin	Dušikovi in žveplovi metaboliti	Organska faza	metanol	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Thalassoma bifasciatum</i>	Pawlik in sod., 2002
	Dimetil sulfid	Furanosester-terpenske tetronske kisline	Organska faza	diklorometan / metanol	Protimikrobna aktivnost	
	Metil izocijanid			(1:1)		
	Metil izotiocianat					
Tedanolid C	Sekundarni metaboliti	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za HCT-116 celične linije	Chevallier in sod., 2006	
Irciniasulfonska kislina B	Sesterterpeni	Organska faza	etanol	Prekinitiv rezistence KB/VJ300 celic na vinkristin	Emura in sod., 2006	
		Organska faza	aceton	Zmerna citotoksičnost za KB celice	Issa in sod., 2003	

	Ircinial A		β -karbolin alkaloidi	Organska faza	metanol	Citotoksičnost za L1210 miše in KB človeške rakave celice	Kondo in sod., 1992
	Ircinial B						
	Cikloteonamid E4		Ciklični pentapeptidi	Organska faza	metanol	Inhibitorji človeške triptaze	Murakami in sod., 2002
	Cikloteonamid E5				kloroform		
	Sulfircin		Sesterpen sulfat	Organska faza	metanol	Protiglivna aktivnost	Wright, 1989
<i>Ircinia strobilina</i>	(8Z,13Z,20Z)-strobilin		Furanosester-terpenske tetronske kisline	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997a
	(7Z,13Z,20Z)-feliksinin						
	(7E,12E,18R,20Z)-variabilin		Furanosesterpen	Organska faza	metanol	Protimikrobna aktivnost	Martinez in sod., 1997b
	Variabilin		Furanosesterpen	Organska faza	etanol	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami	Epifanio in sod., 1999
					metanol / diklorometan (6:4)		
	Dimetil sulfid		Dušikovi in žveplovi metaboliti	Organska faza	metanol	Kemijska obramba pred plenilskimi ribami vrste <i>Thalassoma bifasciatum</i>	Pawlik in sod., 2002
	Metil izocijanid				diklorometan / metanol (1:1)		
	Metil izotiocianat						

<i>Lissodendrorhynchus</i> sp.	Halihondrin B Homohalichondrin B Izohomohalichondrin B Norhalichondrin 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</i> vaccine virus)	Litaudon in sod., 1997
<i>Pseudocercaria crassa</i>	Bromometoksifenilacetoni-tril 1,1-dimetil-2-karboksi-2H-indole Kraseridi 1a-1f	Bromirani metaboliti Glikolipidni analogi	Organska faza Organska faza	metanol metanol / toluen (3:1) kloroform	Kemijaska obramba pred plenilskimi ribami	Ciminiello in sod., 1995 Constantino in sod., 1994

<i>Spherospongia 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>Verongula gigantea</i>	Aeroplizinin 1		Derivati bromotirozina	Organska faza	metanol / toluen (3:1)		Ciminiello in sod., 2000
	Aeroplizinin 2				kloroform		
	5,6-dibromo- <i>N,N</i> -dimetiltryptamini						
<i>Verongula rigida</i>	Verongamin		Derivati bromotirozina	Organska faza	etanol	Antagonist histamina-H3	Mierzwa in sod., 1994
	Dihidroksiaerotionin Aerofobin I		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>Xestosporgia muta</i>	Ksestosterol		Steroli	Organska faza	metanol	Stabilizacija celične membrane	Kokke in sod., 1979
	Ksestostanol		Bromirane poliacetilenske kisline	Organska faza	etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	16-bromo-7,11,15-heksadekatrien-5,1-diiinoična kislina						
	18-bromo-9,13,17-oktadekatrien-5,7,15-triinoična kislina						
	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</i> <i>sp.</i>	Halenakvinon	Derivati ksetokvinona	Organska faza	metanol	Inhibicija Cdc25B fosfataze	Cao in sod., 2005
	Adociakvinon A					
	Adociakvinon B					
	3-ketoadoociakvinon A					
	3-ketoadoociakvinon B					
	Tetrahidrohalenakvinon A					
	Tetrahidrohalenakvinon B					
	13-O-metil ksetokvinol sulfat					
	2-amino- tetradeka-5,7-dien-3-ol 1	Amino alkoholi	Organska faza	metanol	Protiglivna aktivnost proti glivi <i>Candida</i> <i>albicans</i>	Langlois, 2001
	2-amino- tetradeka-5,7-dien-3-ol 2				Protimikrobna aktivnost Citotoksičnost	

	Demetilsestospongin B Derivat tetrahidrokarbolina Ksestospongin B Ksestospongin D Araguspongin F Aragusterol A	Alkaloidi	Organska faza	etil acetat	Citotoksičnost za KB celice	Quirion in sod., 1992
		Steroid	Organska faza	metanol	Inhibicija razmnoževanja KB celic Citotoksičnost za L1210 mišje rakave celice	Mitome in sod., 2003

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Bojan MARTINŠEK

**BIOLOŠKA AKTIVNOST V ORGANSKIH
EKSTRAKTIH NEKATERIH TROPSKIH MORSKIH
SPUŽEV (*Porifera, Demospongia*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010