

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sandra ČIVOVIĆ

**CITOTOKSIČNA AKTIVNOST EKSTRAKTOV
IZBRANIH ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. Stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sandra ČIVOVIĆ

**CITOTOKSIČNA AKTIVNOST EKSTRAKTOV IZBRANIH
ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**CYTOTOXIC ACTIVITY OF EXTRACTS FROM SELECTED
ANTARCTIC MARINE SPONGES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu za biofiziko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Toma Turka, za somentorico izr. prof. dr. Urško Batista in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčić.

Mentor: prof. dr. Tom Turk

Somentorica: izr. prof. dr. Urška Batista

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član : prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: izr. prof. dr. Urška BATISTA

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za Biofiziko

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: _____

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje magistrske naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Sandra Čivović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 593.4:547:9:57.083.36(043)= 163.6
KG morske spužve/antarktične morske spužve/naravni produkti/citotoksična aktivnost/celične linije/celična linija V-79-379A/celična linija CaCo-2/MTS-test
AV ČIVOVIĆ, Sandra, dipl. mikrobiol. (UN)
SA TURK, Tom (mentor)/BATISTA, Urška (somentorica)/SEPČIĆ, Kristina (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2014
IN CITOTOKSIČNA AKTIVNOST EKSTRAKTOV IZBRANIH ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XII, 59 str., 9 pregl., 12 sl., 1 pril., 111 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Morske spužve (*Porifera*) so zelo bogat vir različnih biološko aktivnih naravnih produktov. Spužve uporabljajo svoje sekundarne metabolite primarno za obrambo pred plenilci in za teritorialno kompeticijo. Iskanje novih in učinkovitih zdravil iz spužev je vodilo k osamitvi na stotine bioaktivnih spojin, ki so široko uporabne v farmacevtski industriji ter so glavni predmet raziskav na področju naravnih spojin morskega izvora. Zaradi pomanjkanja poročil o citotoksični aktivnosti polarnih spužev smo se odločili raziskati citotoksični potencial izvlečkov izbranih antarktičnih morskih spužev na V-79-379A in CaCo-2 celični liniji z uporabo MTS testa. Pet od 14 izvlečkov je kazalo citotoksično aktivnost; od teh sta dva vzorca pokazala statistično pomembno večji citotoksični vpliv pri normalni celični liniji V-79-379A, trije vzorci pa so bili bolj aktivni pri tumorski celični liniji CaCo-2. Najmočnejše citotoksično delovanje na obe vrsti celic smo opazili pri dveh izvlečkih iz rodu *Latrunculia* in pri vodnem izvlečku iz vrste *Isodictya toxophila*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 593.4:547:9:57.083.36(043)= 163.6
CX marine sponges/Antarctic marine sponges/natural products/cytotoxic activity/cell
lines/cell line V-79-379A/cell line CaCo-2/MTS assay
AU ČIVOVIĆ, Sandra
AA TURK, Tom (supervisor)/BATISTA, Urška (co-advisor)/SEPČIĆ, Kristina
(reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2014
TI CYTOTOXIC ACTIVITY OF EXTRACTS FROM SELECTED ANTARCTIC
MARINE SPONGES
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 59 p., 9 tab., 12 fig., 1 ann., 111 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Marine sponges (*Porifera*) are a very rich source of various biologically active natural products. Sponge secondary metabolites are primarily used as anti-predator defence and territorial competition. Seeking for new and efficient sponge-derived drugs led to the isolation of hundreds of bioactive compounds that are widely used in pharmaceutical industry and are the main object of marine natural products research. Due to the scarce reports on cytotoxic activity of polar sponges we decided to examine the cytotoxic potential of extracts from selected Antarctic marine sponges against V-79-379A and CaCo-2 cell lines, using the colorimetric MTS assay. Five out of 14 extracts showed cytotoxic activity, from which 2 of them showed significantly higher cytotoxic effect against V-79-379A normal cells and three extracts were more active against CaCo-2 tumor cell line. The most prominent cytotoxic activity on both cell lines was observed in two extracts from genus *Latrunculia* and aqueous extract from *Isodictya toxophila*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOAKTIVNE NARAVNE SPOJINE MORSKEGA IZVORA	3
2.2 ZGODOVINSKI PREGLED RAZISKAV NARAVNIH SPOJIN MORSKEGA IZVORA	4
2.3 SPUŽVE (<i>Porifera</i>) KOT VIR BIOAKTIVNIH NARAVNIH SPOJIN	4
2.4 ANATOMSKE IN MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI SPUŽEV.....	6
2.4.1 Glavni predstavniki biološko aktivnih spojin iz morskih spužev.....	10
2.4.1.1 Protivnetne snovi	10
2.4.1.2 Imunosupresivne snovi	10
2.4.1.3 Kardiovaskularni agensi	11
2.4.1.4 Nevrosupresivne snovi	11
2.4.1.5 Mišični relaksanti	11

2.4.1.6	Protimalarične snovi.....	11
2.4.1.7	Antibiotiki in fungicidi	12
2.4.1.8	Protivegetativne snovi	12
2.4.1.9	Protivirusne snovi.....	13
2.4.1.10	Protitumorske snovi.....	13
2.4.2	Polarne sružve	16
2.5	CELIČNE KULTURE	19
3	MATERIALI IN METODE	20
3.1	MATERIALI	20
3.1.1	Vzorci sružev	20
3.1.2	Celične kulture	22
3.1.2.1	Celična linija V-79-379A	22
3.1.2.2	Celična linija CaCo-2	22
3.1.3	Gojišča	23
3.1.4	Reagenti in raztopine	23
3.1.4.1	Tripsin.....	23
3.1.4.2	Fetalni telečji serum (FCS).....	23
3.1.4.3	MTS reagent	23
3.1.4.4	Etanol.....	24
3.1.5	Laboratorijski pribor in oprema	24
3.2	METODE	25
3.2.1	Priprava vzorcev sružev za etanolno ekstrakcijo	25
3.2.2	Priprava organskih izvlečkov	26
3.2.3	Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v etanolnih vzorcih	26
3.2.4	Tehtanje vzorcev za pripravo vodnih izvlečkov	27
3.2.5	Priprava vodnih ekstraktov	28
3.2.6	Izračun suhe teže ekstrahirane snovi v vodnem vzorcu	28

3.2.7 Testiranje citotoksične aktivnosti.....	28
3.2.7.1 Priprava celične linije	29
3.2.7.2 Tripsinizacija	29
3.2.7.3 Določanje koncentracije celic v celični suspenziji s štetjem v hemocitometru	30
3.2.7.4 Nasaditev na mikrotitreno ploščo.....	31
3.2.7.5 Priprava in dodajanje izbranih izvlečkov antarktičnih morskih spužev.....	31
3.2.7.6 MTS-test	32
3.2.8 Statistična analiza	33
4 REZULTATI.....	34
4.1 CITOTOKSIČNA AKTIVNOST NA V-79-379A CELIČNI LINIJI	34
4.2 CITOTOKSIČNA AKTIVNOST NA CaCo-2 CELIČNI LINIJI	34
4.3 PRIMERJAVA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI MED OBEMA CELIČNIMA LINIJAMA.....	35
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	38
5.1 RAZPRAVA	38
5.2 SKLEPI	45
6 VIRI	46

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Oznake vzorcev in vrste sružev.....	21
Preglednica 2: Uporabljene celične linije	22
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema.....	24
Preglednica 4: Uporabljeni laboratorijski pribor.	25
Preglednica 5: Suhe mase vzorcev sružev.	26
Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi v etanolnih izvlečkih sružev.	27
Preglednica 7: Masa in suha teža vzorca 51V ter volumen dodane deionizirane vode. .	28
Preglednica 8: Volumen posameznega vzorca ekstraktov sružev v MTS testu, potreben za doseganje končne koncentracije suhe snovi 0,1 mg/ml.	32
Preglednica 9: Viabilnost V-79-379A in CaCo-2 celic, tretiranih s 100 µg/ml izvlečka..	
.....	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Nove naravne spojine iz morskih nevretenčarjev (Leal in sod., 2012).	5
Slika 2: Distribucija novih spojin in število novih naravnih produktov, izoliranih iz morskih organizmov med leti 1985 in 2008 (Hu in sod., 2011).....	6
Slika 3: Zgradba enostavne sružve (Turk, 2011).	8
Slika 4: Glavne celice, ki gradijo telo sružve so hoanocite (Turk, 2011).	9
Slika 5: Oblike zgradb sružev (Turk, 2011).....	9
Slika 6: Domnevni mehanizem apoptoze, sprožen pri zdravljenju s pektenotoksinom-2 (Bahtnagar in Kim, 2010).	15
Slika 7: Shema predpriprave vzorcev antarktičnih morskih sružev.....	25
Slika 8: Shema poskusa.	29
Slika 9: Prikaz poskusa z nekaj izbranimi vzorci antarktičnih morskih sružev.	33
Slika 10: Vpliv izvlečkov antarktičnih morskih sružev (100 µg/ml) na viabilnost V-79-379A celične linije.	34
Slika 11: Vpliv izvlečkov antarktičnih morskih sružev (100 µg/ml) na vabilnost CaCo-2 celične linije.	35
Slika 12: Vpliv izvlečkov antarktičnih morskih sružev (100 µg/ml) na viabilnost V-79-379A in CaCo-2 celične linije.	36

KAZALO PRILOG

Priloga A: Iz literature zbrani podatki o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v organskih izvlečkih iz morskih sružev (Kosmina, 2012).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANDEEP - SYSTCO Antarctic deep - sea biodiversity: colonisation history and recent
community patterns - system coupling

Ara-A	1-β-D-arabinofuranozil adenin
Ara-C	1-β-D-arabinofuranozil citozin
Bax	Proapoptotična beljakovina
Bcl-xL	Transmembranski protein v mitohondriju z protiapoptoznim delovanjem (<i>angl.</i> B-cell lymphoma-extra large)
c-myc	Celični onkogen
DNA	Deoksiribonikleinska kislina
EC ₅₀	Srednja efektivna koncentracija
FCS	Fetalni telečji serum (<i>angl.</i> Fetal Calf Serum)
FDA	Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (<i>angl.</i> Food and Drug Administration)
HIF-1	S hipoksijo inducirani transkripcijski faktor 1
HIV	Humani imunodeficientni virus
hTERT	Humana telomerazna reverzna transkriptaza
IC ₅₀	Srednja inhibitorna koncentracija
IkB	Jedrni faktor kappa B, inhibitor celic B (<i>angl.</i> Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor)
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija (<i>angl.</i> Minimal Inhibitory Concentration)
MTS reagent	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4- sulfofenil)- 2H-tetrazolij

NF-kB	Jedrni faktor kapa B, aktivator celic B (<i>angl.</i> Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
PTX-2	Pektenotoksin-2
RKZ	Reaktivne kisikove zvrsti
Sp1	Transkripcijski faktor (<i>angl.</i> Specificity protein 1)
t-RNA	Prenašalna ribonukleinska kislina
VCAM-1	Celična adhezijska molekula žilnih celic (<i>angl.</i> Vascular Cell Adhesion Molecule 1)

1 UVOD

Narava nam nudi širok spekter strukturno raznolikih in farmakološko aktivnih spojin, ki služijo kot visoko aktivne in vodilne strukture za razvoj novih sintetičnih zdravil z namenom zdravljenja množice bolezni. Nekoč so kopenski organizmi, rastline in mikroorganizmi veljali za najbogatejši vir naravnih zdravil.

Oceani pokrivajo več kot 70 % zemljine površine in so nedvomno, s predstavniki 34 od 36 debel življenja, vir največje biološke in kemične biodiverzitete na svetu. Navdušenje nad raziskovanjem te raznolikosti, ki je vsekakor nepogrešljiv korak pri odkrivanju bioaktivnih molekul, se kaže v približno dvajsetih morskih derivatih v različnih fazah kliničnega preizkušanja. Zanimivo je, da v produkciji naravnih spojin morskega izvora močno prednjacijo morske živali, medtem ko na kopnem v produkciji naravnih metabolitov živali bistveno zaostajajo za rastlinami (Van Minh in sod., 2005; Putz, 2009; Murti in Agrawal, 2010).

Vsi organizmi imajo primarni metabolizem, vendar pa premorejo nekatere rastline, živali in mikroorganizmi tudi druge metabolične poti, ki niso vitalnega pomena za organizem. Te metabolične poti imenujemo sekundarni metabolizem, njihovi produkti pa so sekundarni metaboliti. Ekološki pritisk, ki vključuje kompeticijo za hrano in prostor, je vodil v evolucijo sekundarnih metabolitov z raznolikimi biološkimi aktivnostmi. Veliko sesilnih (pritrjenih) organizmov zaradi svojega načina življenja (na primer spužve, mahovnjaki...) težko preživijo v svojem okolju. Zato so razvili sposobnost sinteze toksičnih spojin za obrambo proti plenilcem ali za onesposabljanje svojega plena (Varoglu, 1996).

Med vsemi morskimi organizmi so se v produkciji biološko aktivnih snovi najbolj izkazale ravno spužve. Med približno 18000 odkritimi biološko aktivnimi spojinami morskega izvora jih 37 % izvira iz spužev. Tudi prva »morska« zdravila, ki so prišla na tržišče, so bila sintetizirana prav na osnovi spojin, izoliranih iz morskih spužev (Sepčić, 2008). Poleg tega so odgovorne za več kot 5300 različnih produktov in vsako leto za stotine na novo odkritih spojin. Od 10000 morskih spužev samo enajst rodov proizvaja bioaktivne molekule (Ravichandran in sod., 2007)

Morske sružve so prava zlata jama širokospikalnih bioaktivnih snovi, ki so kljub veliki znanstveni vnemi slabo raziskane. V pričakovanju, da bi v njih odkrili nove in za farmacevtsko industrijo uporabne snovi, smo se odločili raziskati nekaj vrst antarktičnih morskih sružev.

V naši raziskavi smo se osredotočili predvsem na testiranje citotoksične aktivnosti etanolnih izvlečkov (in enega vodnega izvlečka) izbranih antarktičnih morskih sružev na normalni in spremenjeni (transformirani) celični liniji.

1.1 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA

Cilji našega eksperimentalnega dela so bili: ugotoviti ali izbrani vzorci polarnih sružev vsebujejo citotoksične snovi; oceniti raven njihove potencialne citotoksične aktivnosti; ugotoviti razlike v citotoksičnosti med obema vrstama celic.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Delovne hipoteze magistrske naloge so bile naslednje:

- Izvlečki antarktičnih morskih sružev vsebujejo biološke učinkovine, ki kažejo citotoksično aktivnost;
- Med obema vrstama celic obstaja značilna razlika v citotoksični aktivnosti;
- Izvlečki polarnih sružev imajo različno/podobno citotoksično aktivnost kot izvlečki tropskih sružev;
- Obstaja korelacija med citotoksično in protibakterijsko učinkovitostjo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOAKTIVNE NARAVNE SPOJINE MORSKEGA IZVORA

Naravne spojine ali sekundarni metaboliti so biomolekule, ki ne igrajo neposredne vloge v razvoju, rasti ali reprodukciji organizmov. Ne proizvajajo jih vsi organizmi, zato so njihovi metaboliti vrstno specifični. Sekundarne metabolite uporabljajo za kontrolo ekoloških odnosov, ki vključujejo obrambo pred predatorji, parazitizmom in infekcijo, kompeticijo za hrano in prostor, znotrajvrstno komunikacijo za razmnoževanje/parjenje, lov ali bakterijsko medcelično signalizacijo (*angl. »quorum-sensing«*) ter za vzdrževanje mutualistične simbioze. Zaradi vrstne specifičnosti teh spojin je kemična raznolikost znotraj debla v korelaciji z vrstno diverziteto. Izjemno visoka vrstna raznolikost je prvi razlog velikega potenciala oceanov za odkrivanje novih zdravil. Drugi razlog je biološka vloga naravnih produktov – ti pomagajo organizmu pri soočanju z določenimi ekološkimi izzivi in vzdrževanju homeostaze v svojem okolju. Biokemijski mehanizem, odgovoren za zaželeno fiziološko aktivnost, navadno vključuje visoko specifično vezavo sekundarnega metabolita na tarčni receptor. Na srečo obstaja zadostna podobnost med molekularno strukturo tarčnih receptorjev morskih organizmov in človeškimi receptorji, zato veliko bioaktivnih snovi izraža visoko fiziološko aktivnost tudi pri ljudeh. Večino teh aktivnosti lahko opredelimo kot antibiotično, protivnetno, protivirusno, antioksidativno, antikoagulantno, analgetično, protitumorsko, protikonvulzivno, protiparazitsko in protidermatofitsko aktivnost (Kelman in sod., 2001; Selvin in Lipton, 2004; Orhan in sod., 2010; Dellai in sod., 2012; Dhayanithi in sod., 2012). Nenazadnje o pomenu sekundarnih metabolitov govorí tudi dejstvo, da 40 % vseh današnjih zdravil izvira iz naravnih učinkovin, na področju zdravil proti raku pa se ta številka povzpne na osupljivih 70 % (Sepčić, 2008). Glede na kemijsko strukturo uvrščamo naravne spojine v sedem razredov: terpenoide, steroide, alkaloide, etre, fenole, strigolaktone in peptide (Hu in sod., 2011).

2.2 ZGODOVINSKI PREGLED RAZISKAV NARAVNIH SPOJIN MORSKEGA IZVORA

Prvi izoliran sekundarni metabolit je bil 6,6'-dibromoindigotin (indigo) iz morskega mehkužca. 6,6'-dibromoindigotin, identificiran leta 1901, je bil prva naravna spojina morskega izvora, ki so jo uporabljali komercialno (Park, 2004). Njegova glavna aktivnost, barvanje tkanin, se je ohranila še iz antičnih časov in se ga še danes v sintetični obliki uporablja za barvanje oblačil (Cooksey, 2001).

Koncept kemije naravnih snovi morskega izvora je bil zasnovan prelomnega leta 1951, ko sta pionirja tovrstnih raziskav Bergmann in Feeny poročala o izolaciji nenavadnih nukleozidov spongouridina in spongotimidina iz spužve *Cryptotethya crypta* (Hu in sod., 2011). To monumentalno odkritje je vodilo do razvoja protivirusnega zdravila Ara-A in protitumorskega zdravila Ara-C (Park, 2004). Po več kot enem desetletju je sledilo vzporedno odkritje prostaglandinov v karibski korali *Plexaura homomalla* in njihovega pomena v človeškem telesu, kar je še dodatno botrovalo mrzličnemu iskanju novih zdravil iz morja. Pomemben mejnik, ki se je zgodil leta 1967 na Rhode Islandu v ZDA, je simboliziral rojstvo kemije naravnih spojin. To je bilo namreč prvo akademsko srečanje na temo odkrivanja zdravil iz naravnih spojin morskega izvora. V 80-ih letih prejšnjega stoletja so prizadevanja na področju kemije naravnih spojin končno obrodila sadove in hkrati označevala obdobje njene adolescence, ko so raziskave za širok spekter farmakoloških aktivnosti padle na zelo plodna tla (Gordaliza, 2010; Hu in sod., 2011).

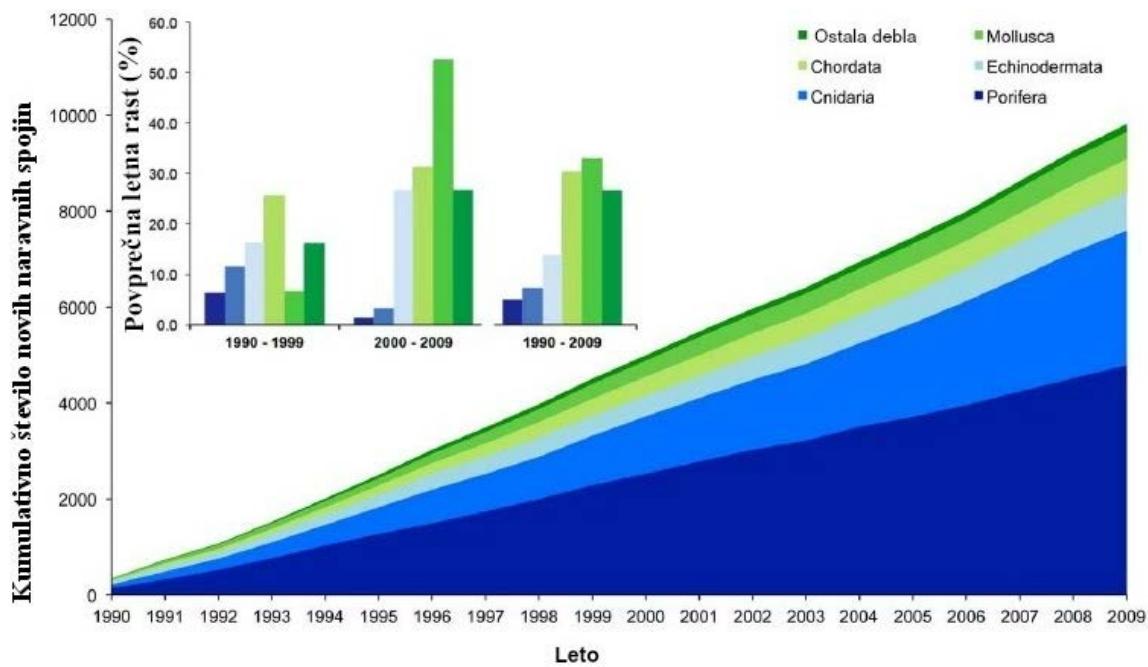
Skokovit razvoj preučevanja morskih naravnih produktov je v naslednjih petnajstih letih vodil v odkritje velikega števila novih kemijskih struktur, ki nimajo ustreznih analogov med strukturami »kopenskega« izvora, o njihovih farmakoloških ter toksikoloških aktivnostih pa vemo le malo (Selvin in Lipton, 2004).

2.3 SPUŽVE (*Porifera*) KOT VIR BIOAKTIVNIH NARAVNIH SPOJIN

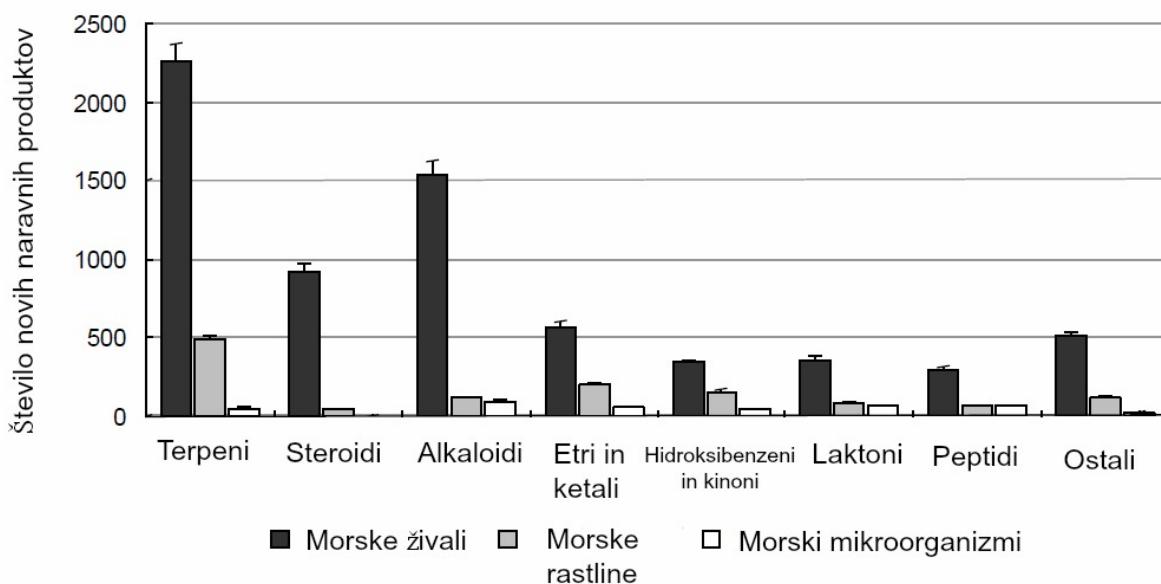
Dandanes približno četrtnino celotne farmacevtske prodaje predstavljajo derivati rastlinskih naravnih produktov, 12 % delež si lastijo zdravila na osnovi mikrobnih naravnih spojin in njihovi derivati, preostanek pa pokrivajo polsintetični derivati ter mimetiki naravnih snovi (Carté, 1996). Več kot 60 % do sedaj odkritih potencialno

uporabnih bioaktivnih spojin izhaja iz morske favne, od tega kar pomenljivih 70 % iz sružev. Do sedaj so opisali okrog 15000 različnih vrst sružev, a je le 17 vrst komercialno uporabnih (Purushottama in sod., 2009; Kumar in Rawat, 2011).

Morske sružve so prava zakladnica biološko aktivnih sekundarnih metabolitov z novimi kemijskimi strukturami (Joseph in Sujatha, 2011). V 90-ih letih prejšnjega stoletja so bile skupaj z ožigalkarji (*Cnidaria*) najpomembnejši vir naravnih morskih učinkovin (Slika 1) (Leal in sod., 2012). Da so morski organizmi vodilni proizvajalci naravnih spojin, priča slika 2 (Slika 2), ki jasno kaže na njihovo proizvodno premoč v vseh sedmih strukturnih razredih naravnih spojin (Hu in sod., 2011).



Slika 1: Nove naravne spojine pri morskih nevretenčarjih. Kumulativno število novih naravnih spojin, odkritih v različnih deblih morskih nevretenčarjev od 1990 do 2009 (Skupina »Ostala debla« vključuje Annelida, Arthropoda, Brachiopoda, Hemichordata, Platyhelminthes in Bryozoa). Vstavek: Letna rast števila novih naravnih snovi iz različnih debel morskih nevretenčarjev med leti 1990 in 1999, 2000 in 2009 ter v obeh desetletjih (Leal in sod., 2012).



Slika 2: Distribucija novih spojin in število novih naravnih produktov, izoliranih iz morskih organizmov med leti 1985 in 2008 (Hu in sod., 2011).

V spužvah pogosto domujejo različni endo- in eksosimbionti, ki lahko predstavljajo tudi do 40 % suhe teže gostitelja. Simbiontske funkcije, ki jih pripisujejo mikrobnim populacijam, vključujejo privzemanje hrani, stabilizacijo skeleta spužve, procesiranje odpadnih presnovkov in produkcijo sekundarnih metabolitov. S proučevanjem heterogenih mikrobnih združb z molekularnimi metodami so ugotovili, da s spužvami povezane bakterijske združbe tvori vsaj deset bakterijskih debel (na primer Proteobacteria, Nitrospira, Cyanobacteria, Bacteriodetes). Druge, a nič manj pomembne mikrobne združbe so glive, mikroalge, arheje, kriptofiti, dinoflagelati in diatomeje. Čeprav so virusom podobne delce opazili v celičnem jedru spužve *Aplysina cavernicola*, je o prisotnosti virusov v spužvah malo znanega (Lee in sod., 2001; Belarbi in sod., 2003; Tresa in sod., 2010).

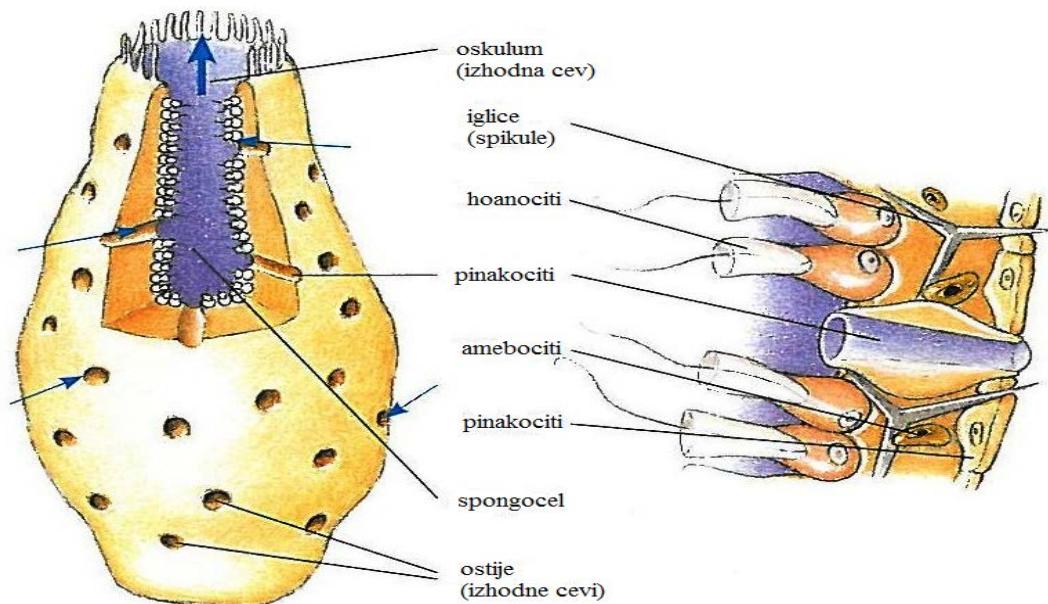
2.4 ANATOMSKE IN MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI SPUŽEV

Spužve, evolucijsko starodavni metazoji, so najbolj primitivne večcelične živali, ki obstajajo že 700-800 milijonov let. Z izjemo predstavnikov ene družine so izključno morske živali, ki ne naseljujejo zgolj tropskih morij, temveč so v velikem številu prisotne tudi v zmerno toplih ter polarnih morjih, v zelo majhnem deležu tudi v sladkih vodah. Morske spužve so razširjene od bibavičnih con (plitvega infralitorala) pa vse do na tisoče metrov globokih morskih prostranstev. So preprosti nevretenčarji, pritrjeni na

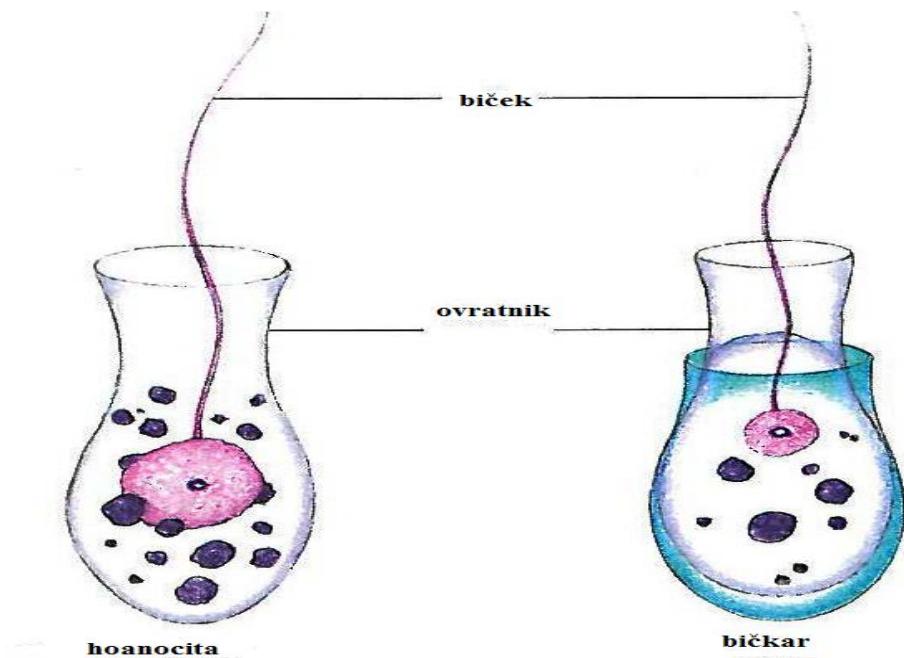
trdne substrate v bentoških habitatih. Sružve so s prehranskega vidika filtratorji s številnimi majhnimi porami na njihovi površini, ki omogočajo vstop in cirkulacijo vode preko številnih kanalov v sružvi, kjer se filtrirajo mikroorganizmi in organski delci. Uvrščamo jih v tri glavne razrede: Calcarea (apnene sružve), Demospongiae (roženjače in kremenaste sružve) in Hexactinellida (steklenjače). Večina vrst pripada razredu Demospongiae (Sabdoni in Radjasa, 2008; Tresa in sod., 2010; Turk, 2011).

Telesna zgradba morskih sružev je zelo enostavna, saj nimajo ne organov ne tkiv (**Slika 3**). Celice niso strogo specializirane kot pri pravih večceličnih organizmih, a so funkcionalno zelo prilagodljive. Večina sružev nima izražene oblike ali vidne simetrije telesa. Rast in oblika sružve sta odvisni tako od lastnosti podlage, na kateri so pričvrščene, kot od vodnih tokov v njihovi neposredni okolici. Velikost posameznih vrst sružev je v razponu od nekaj milimetrov pa do več kakor enega metra. Njihov razvoj je odvisen predvsem od vodnih tokov, ki jim prinašajo vso potrebno hrano in kisik ter odnašajo spolne celice. Osnovna značilnost vseh sružev so odprtine na njihovi površini. Majhne in številne odprtine predstavljajo vstopne kanale, skozi katere priteka voda, ki kasneje prefiltrirana zapusti telo sružve skozi maloštevilne odprtine- odtekalke. Sistem kanalov in komor je v njihovih telesih mestoma obložen s posebnim slojem celic opremljenih z bički – hoanocitov (**Slika 5**). Glede na zgradbo teh sestavov, razlikujemo tri oblike sružev: askon, sikon in leukon (**Slika 4**). Askon je najenostavnnejša oblika zgradbe. Take sružve so običajno majhne in nimajo kanalov ali komor, ampak enotno notranjo votlino (spongocel), obkroženo s hoanociti. Pri sružvah, ki pripadajo obliki sikon ali leukon, je notranjost bolj razvezjana. Na ta način se poveča površina, preko katere se sružve oskrbujejo s hrano in kisikom. Vstopne cevi so prekrite s porociti, ki imajo sposobnost prebavljanja hrane, medtem ko odrasle leukonoidne in sikonoidne sružve teh celic nimajo. Pod epidermalnimi celicami leži mezenhim, sestavljen iz želatinaste osnove (mezogleje), gibljivih celic (amebocitov) in skeleta. Ena od oblik amebocitov so skleroblasti, ki gradijo skelet sružve. Ta je lahko sestavljen iz apnenca, kremena ali beljakovine spongina. Osnovni skelet je sestavljen iz iglic (spikul) različnih oblik, med katerimi razlikujemo megasklere in mikrosklere. Prve gradijo mrežasti skelet in so pri nekaterih vrstah medsebojno povezane s sponginom, mikrosklere pa so najpogosteje razpršene v površinskem sloju in le redko povezane. Skelet je glavni

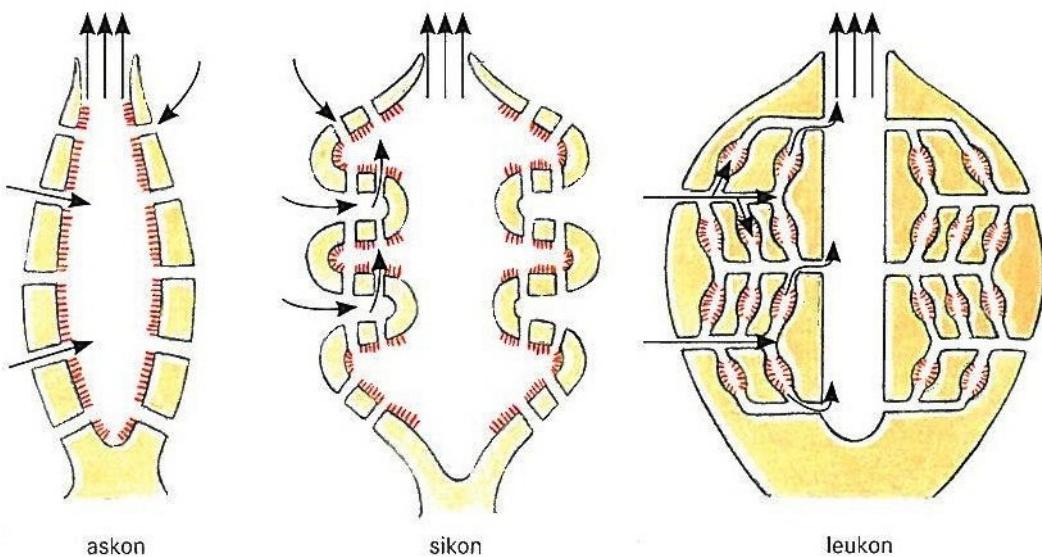
taksonomski znak, s pomočjo katerega strokovnjaki določijo vrsto sružve. Sružve se hranijo s filtriranjem vode. Hrana sružvam so mrtve ali žive planktonske živali, diatomeje, bakterije in organske snovi, ki se prebavlajo v hoanocitih in prenašajo z amebociti. Živijo le v čisti, s kisikom bogati vodi, ki ima malo anorganskih delcev. Zato so svojevrsten pokazatelj čistosti vode. So slepa veja razvoja, saj se iz njih ni razvila nobena nova oblika življenja. Zaradi tega jih zoologi razlikujejo od drugih večceličnih živali (*Eumetazoa*) in jih uvrščajo v posebno skupino *Parazoa* (Newbold in sod., 1999; Lutta in sod., 2008; Laport in sod., 2009; Turk, 2011).



Slika 3: Zgradba enostavne sružve (Turk, 2011).



Slika 4: Glavne celice, ki gradijo telo sružve so hoanocite. Podobne so enostavnim bickarjem, kar nakazuje na dejstvo, da so se sružve razvile ravno s povezovanjem enostavnih enoceličnih organizmov (Turk, 2011).



Slika 5: Oblike zgradb sružev. Puščice prikazujejo pretok vode skozi telo (Turk, 2011).

2.4.1 Glavni predstavniki biološko aktivnih spojin iz morskih sružev

V **prilogi A** je preglednica objavljenih raziskav in predstavlja iz literature zbrane podatke o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v organskih izvlečkih iz morskih sružev (Kosmina, 2012).

2.4.1.1 Protivnetne snovi

Protivnetne spojine iz morskih sružev so selektivni inhibitorji specifičnih encimov pri širokem spektru bolezni kot sta psoriaza ali revmatoidni artritis. Protivnetno delovanje temelji na irreverzibilni inhibiciji sproščanja arahidonske kisline iz membranskih fosfolipidov s preprečevanjem vezave encima fosfolipaze A₂ na membrane. Povečana znotrajcelična koncentracija arahidonske kisline vodi v povečano sintezo vnetnih mediatorjev, na primer prostaglandinov in levkotrienov. Protivnetno aktivnost so do sedaj izkazali sesterterpeni iz sružev reda Dictyoceratida in bis-indolni alkaloidi (na primer topsentin) iz reda Halichondrida. Le redki terpenoidi, na primer iz reda Astrophorida in Verongida, so pokazali učinkovito inhibicijo encima lipoksigenaze, ki je ravno tako vpletен pri vnetnem odzivu (Kuramoto in sod., 2004; Sipkema in sod., 2005; Ebada in sod., 2010).

2.4.1.2 Imunosupresivne snovi

Zaviranje imunskega odziva je zaželeno v primeru hipersenzibilnosti na določene antigene (na primer alergene) ali pri transplantaciji organov. Številne nove molekule z imunosupresivno aktivnostjo so odkrili v morskih sružvah. Trije polioksigenirani steroli iz sružve *Dysidea* sp. so selektivni imunosupresivi in inhibirajo vezavo intelekvina-8 – citokina, ki privablja nevtrofilce na mesto poškodbe – na IL-8 receptor. Simpleksidi iz sružve *Plaktoxis simplex* so skupina imunosupresivnih glikolipidov, ki inhibirajo proliferacijo aktiviranih celic T z necitotoksičnim mehanizmom. Kontignasterol iz sružve *Petrosia contignata* inhibira *in vitro* sproščanje histamina iz podganjih mastocitov in iz pljučnega tkiva morskega prašička (Sipkema in sod., 2005).

2.4.1.3 Kardiovaskularni agensi

Poleg regulacije števila belih krvnih celic imajo številne aktivne učinkovine iz sružev sposobnost delovanja tudi pri drugih krvnih boleznih kot so tromboza, ateroskleroza in diabetes. Prvi primer tovrstnega delovanja predstavlja cikloteonamid A iz sružve *Theonella* sp., ki pripada neobičajnemu razredu inhibitorjev serinskih proteaz in je potencialno zdravilo za trombozo. Erilozid F iz sružve *Eryltus formosus* je močan antagonist trombinskega receptorja, katerega aktivacija igra ključno vlogo pri arterijski trombozi in aterosklerozi. Haliklorin iz sružve *Halichondria okadai* z mehanizmom inhibicije ekspresije molekule VCAM-1 zavira aterogenezo (Sipkema in sod., 2005).

2.4.1.4 Nevrosupresivne snovi

Keramidin (iz sružev reda Agelasida), antagonist serotonergičnih receptorjev, blokira s serotoninom posredovano komunikacijo med nevroni. Takšni antagonisti so uporabni proti trombozi, krčenju gladkih mišic, bruhanju in depresiji (Sipkema in sod., 2005).

2.4.1.5 Mišični relaksanti

Mišične relaksante se najpogosteje daje med intubacijo, pred operacijo in za lajšanje možganske kapi. Ksestospongin C iz sružve roda *Xestospongia* je močan inhibitor inozitol 1,4,5-trifosfatnih receptorjev in kalcijevih črpalk v endoplazemskem retiklu. Poleg tega so agonisti β -adrenoreceptorjev (tak primer je benzotiazolni derivat S1319 iz sružve *Dysidea* sp.) široko razširjeni protiastmatiki, ki pa imajo lahko hude stranske učinke zaradi majhne selektivnosti (Sipkema in sod., 2005).

2.4.1.6 Protimalarične snovi

Nova protimalarična zdravila morajo biti učinkovita proti naraščajočemu številu povzročiteljev malarije - večkratno odpornim sevom plazmodijev. Kalihinol A iz sružve *Acanthella* sp. in številni manzaminski alkaloidi, kot so terpenoidni izocianati iz sružev reda Haplosclerida, izotiocianati iz sružve *Cymbastela hooperi* in izonitrili iz reda Halichondrida, kažejo selektivno *in vitro* protimalarično aktivnost proti parazitu *Plasmodium falciparum* (Sipkema in sod., 2005; Fattorusso in Taglialatela-Scafati, 2009).

2.4.1.7 Antibiotiki in fungicidi

Vsako leto odkrijejo veliko novih snovi z antibiotičnim delovanjem, a pri morskih sružvah je njihova ubikvitarnost izjemna. Dodano vrednost nekaterih, iz sružev pridobljenih antibiotikov, so dokazali z inhibitornim učinkom arenosklerinov A-C iz sružve *Arenosclera brasiliensis* na dvanajst, proti antibiotikom odpornih bolnišničnih sevov. Iz nekaterih sružev so znanstveniki izolirali učinkovine s protituberkulozno aktivnostjo, ki pa so žal bolj ali manj toksične.

Uporaba fungicidov je veliko bolj omejena zaradi toksičnih učinkov na človeka, živali in rastline. Poleg naravnih spojin velja omeniti še perforinu podoben protein iz sružve *S. domuncula*, ki ima protimikrobne lastnosti. Iz iste sružve so izolirali tudi tahilektin, protibakterijsko molekulo, ki se skupaj z imunskim odzivom zoperstavlja bakterijskim vsiljivcem. Kljub velikemu potencialu uporabe, zaenkrat še nobena od naštetih antibiotičnih substanc iz sružev ni dosegla faze kliničnega preverjanja (Bhakuni in Rawat, 2005; Sipkema in sod., 2005; Marinho in sod., 2008).

2.4.1.8 Protivegetativne snovi

Sredstva proti obraščanju niso povezana z razvojem novih zdravil, a so zato zelo dobra in okolju prijazna alternativa večinoma toksičnim kemičnim sredstvom, ki se danes uporablajo v protivegetativnih premazih. Dolgoročna uporaba kemičnih sredstev proti obraščanju ima namreč za posledico povečano mortaliteto in spremišanje spola netarčnih organizmov (te snovi namreč delujejo kot hormonski motilci). Protivegetativne spojine iz sružev (najbolj znan primer je *Acanthella cavernosa*) preprečujejo kolonizacijo ličinkam rakov vitičnjakov, obraščanje z makroalgami in delujejo kot repellent za školjko klapavico (Sipkema in sod., 2005; Raveendran in Limna Mol, 2009). V to skupino spojin uvrščamo polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (iz sružve *Reniera sarai*), ki z netoksičnim in reverzibilnim mehanizmom zavirajo pritrjanje ličink (ciprisov) raka vitičnjaka vrste *Balanus amphitrite* (Eleršek in sod., 2008).

2.4.1.9 Protivirusne snovi

Številna prizadevanja na področju raziskav zdravljenja okužbe z virusom HIV so vodila v odkritje številnih spojin, katerih mehanizem delovanja je za zdaj še slabo poznan. Pomembna izjema je avarol, katerega mehanizem delovanja je bolj ali manj raziskan. Avarol iz spužve *Dysidea avara* inhibira virus HIV s skoraj popolno blokado sinteze tRNA. Že pri zelo nizkih koncentracijah povzroči 50 % inhibicijo virusnega sproščanja iz okužene celice, medtem ko so zdrave celice proti njem odporne. Adenin arabinozid (Ara-A), znan pod komercialnim imenom Vidarabin je sintetični purinski nukleozid. Razvili so ga iz nukleozida spongouridina iz spužve *Cryptotethya crypta*, trenutno pa ga pridobivajo iz bakterije *Streptomyces antibioticus*. Ara-A inhibira virusno DNA polimerazo in DNA sintezo virusa herpesa, virusa črnih koz in varicella-zoster virusov. To zdravilo si je utrlo pot na farmacevtski trg daljnega leta 1976, ko je FDA izdala dovoljenje za njegovo uporabo. Kasneje so njegovo prodajo ustavili zaradi ugotovitve o njegovi primerjalno slabši učinkovitosti in večji toksičnosti z novim zdravilom aciklovirjem (Sipkema in sod., 2005; Mayer in sod., 2010; Sagar in sod., 2010; Dhivya in sod., 2012).

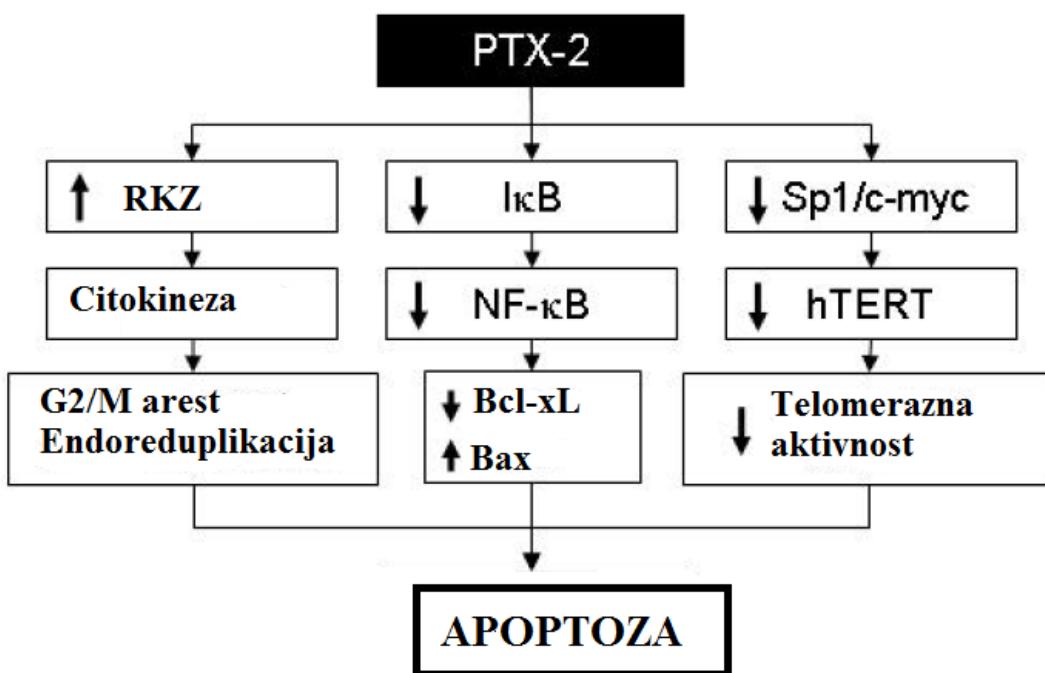
2.4.1.10 Protitumorske snovi

Rakava obolenja kljub medicinskim napredkom ostajajo vodilni vzrok smrti v svetu. Med novejšimi zdravili, ki vplivajo na regulacijo mehanizma rasti tumorskih celic, so naravni produkti pritegnili pozornost kot potencialno pomembni viri kemoterapevtikov in novih kemičnih ter struktturnih modelov za razvoj novih spojin (Rabelo in sod., 2012). Sodobno odkrivanje zdravil temelji na iskanju tarčno usmerjenih spojin z malo stranskimi učinki, katerim lahko z remodeliranjem izboljšajo učinkovitost in razširijo terapevtsko okno (Miller in sod., 2010).

Arabinozil citozin (Ara-C) je trenutno edino protitumorsko zdravilo morskega izvora, ki je namenjeno rutinskemu zdravljenju bolnikov z levkemijo in limfomom (Mayer, 1999). Enega od njegovih fluoriniranih derivatov so odobrili za uporabo pri pacientih z rakom trebušne slinavke, dojke, mehurja in pljuč (Conte da Frota Junior in sod., 2012).

Halihondrine so prvič izolirali iz japonske spužve *Halichondria okadai* (Simmons in sod., 2005). Halihondrin B je kot potencialni makrolidni kemoterapevtik napredoval do predkliničnih raziskav, a so zaradi omejenih zalog te spojine kasneje sintetizirali njegov derivat E7389 (eribulin mezilat), ki ga je FDA odobrila za zdravljenje napredovanega raka dojke (Sepčić, 2008; Jain in Vahdat, 2011). Halihondrin B, spongistatin 1 (*Spongia* sp.), diskodermolid (*Discodermia dissolute*), laulimalid (*Cacospongia mycofljiensis*), peloruzid A (*Mycdle hentschett*) in diktostatin (*Corallistidae* sp.) so primeri zdravil, ki preko stabilizacije mikrotubulov preprečujejo delitev celic. Celično delitev lahko zaustavi tudi inhibicija od ciklina odvisne kinaze 4 ali inhibicija sinteze proteinov (Sipkema in sod., 2005).

Metabolita latrunkulin A (*Latrunculia magnifica*) in svinholid A (*Theonella swinhoei*) povzročata depolimerizacijo aktina, ki je ključni element mikrofilamentov. Takšnemu mehanizmu se pridružuje še pektenotoksin-2 (PTX-2), proizvod dinoflagelatnih simbiontov morskih spužev, ki s svojim izredno močnim citotoksičnim delovanjem predstavlja grožnjo tako transformiranim kot normalnim (na primer hepatocite) celičnim linijam. Zato so njegove biološke mehanizme pod drobnogled vzeli znanstveniki in odkrili, da pektenotoksin zavira zadnjo fazo mitoze, tako da sproži depolimerizacijo aktina (**Slika 6**). Razvoj tumorjev se lahko prepreči tudi z blokado encima topoizomeraze II, vpletenega pri podvojevanju DNA (Sipkema in sod., 2005; Espiña in sod., 2008; Kim in sod., 2011).



Slika 4: Domnevni mehanizem apoptoze, sprožen pri zdravljenju s pektenotoksinom-2 (PTX-2). PTX-2 inducira apoptizo rakavih celic preko povečanega nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ), inaktivacije NF-κB signalne poti in inhibicije telomerazne aktivnosti (Bhatnagar in Kim, 2010b).

Lektini iz sružev so razred široko razširjenih proteinov in so potencialni aktivatorji celične smrti preko sproženja apoptotske signalne kaskade v tumorjih (Rabelo in sod., 2012).

O izolaciji bromotirozinskega metabolita psamaplina A iz različnih sružev žveplenjač so leta 1987 simultano poročale nekatere raziskovalne skupine (Simmons in sod., 2005). Odtlej so se neumorno vrstile raziskave, ki so se od odkritja citotoksičnega delovanja na levkemične celice vse bolj osredotočale na genetski nivo delovanja. S testiranjem psamplinskih metabolitov za DNA metil transferazno in histon deacetilazno inhibicijo so potrdili njihovo dvojno inhibitorno učinkovanje ter se s tem, v luči potencialnega odnosa med DNA metiltransferazo in histonsko deacetilazo kot epigenetska modifikatorja aktivnosti tumor supresorskih genov, dokopali do pomembnega odkritja. To »zgodbo o uspehu« je prekinila fiziološka nestabilnost psamplizinov in s tem onemogočila njihov klinični razvoj. Vendar pa je zgodba vendarle dobila epilog, saj so

bili začetni naporji navdih za razvoj analogne substance NVP-LAQ824, ki je dobila zeleno luč za vstop v prvo fazo kliničnega preizkušanja pri bolnikih z levkemijo ali trdnimi tumorji (Catley in sod., 2003; Atadja in sod., 2004; Simmons in sod., 2005).

V zadnjem času potekajo izčrpne raziskave, v katerih se ukvarjajo z nizkomolekularni inhibitorji hipoksične signalizacije v tumorskih tkivih. Te molekule so ciljno usmerjene v zaviranje s hipoksijo aktiviranega transkripcijskega faktorja HIF-1, ključnega regulatorja kisikove homeostaze, ki je negativni faktor pri postavljanju prognoze. Poleg tega so induktorji apoptoze preko večtarčnih mehanizmov, vstevši inhibicijo topoizomeraze I, interakcijo z DNA in neposredni učinek na mitohondrije. Inhibicija slednjih pomeni ne le zaviranje tumorske rasti, ampak tudi izboljšanje učinkovitosti kemo- in radioterapije (Nagle in Zhou, 2009; Sima in Vetticka, 2011). Nujno popraševanje po modernih protitumorskih zdravilih zahteva skupne znanstvene pristope, ki bi s poglobljenim proučevanjem in pojasnjevanjem molekularnih mehanizmov tumorigeneze znatno pripomogli k hitrejšemu razvoju specifičnih kemoterapevtikov (Bhatnagar in Kim, 2010a).

2.4.2 Polarne sružve

Potencial polarnih in globokomorskih sružev je bil glede sekundarnih metabolitov v primerjavi s tropskimi sružvami dolgo časa prezrt. Poleg tega so še pred nekaj desetletji prepričljivo zagovarjali stališče, da je zaradi ekstremnih okoljskih razmer biodiverziteta polarnih sružev neprimerno manjša ter, da je kompetitivni pritisk za razvoj kemične obrambe zelo nizek ali celo ničen. Tako so bile tovrstne sružve spregledane vse dokler ni človeška radovednost pričela kljubovati neizprosnim delovnim razmeram in slabi dostopnosti polarnih ter globokomorskih predelov. Z aktivnim raziskovanjem teh območij se je nekdanje prepričanje kaj kmalu prevesilo v spoznanje, da je biološka raznolikost polarnih in globokomorskih sružev zelo velika in so tudi te vrste pomemben vir biološko pomembnih sekundarnih metabolitov (Abbas in sod., 2011).

Sružve so dominantni makronevretenčarji v mnogih polarnih bentoskih združbah in igrajo pomembno vlogo v ekologiji teh okolij. Zaradi njihove sposobnosti produkcije naravnih metabolitov in velike biomase so sružve postale glavna tarča raziskav. Dayton

in sodelavci (1974) so bili med prvimi, ki so namigovali na kemično obrambo antarktičnih spužev. Primarni plenilci antarktičnih spužev so morske zvezde, ki so sposobne kemične orientacije proti svojemu plenu. Spongivorna morska zvezda *Perkinaster fuscus* je prehrambeni specialist, ki se hrani izključno s hitro rastočo in prostorsko prevladujočo spužvo *Mycale acerata* (Avila in sod., 2008).

Do danes so opisali okrog 280 antarktičnih vrst spužev, a je od teh le 55 vsaj omejeno kemično preučenih. Po dostopnih podatkih te vrste izdelujejo diterpene, sterole, halogenirane spojine, alkaloide in mikrosporinom podobne aminokisline. Veliko teh snovi je bioaktivnih, a ne vedno tudi ekološko pomembnih.

Tako kot mezofilne so tudi psihrofilne spužve pomemben vir kemijsko in biološko zanimivih spojin iz hladnih voda. Trenutno poznamo 71 metabolitov iz spužev polarnih voda. Kljub novim spojinam, pa jih od vseh morskih naravnih produktov le slabe 3 % izvira iz organizmov polarnih okolij (Baker in sod., 1994; Amsler in sod., 2001; Avila in sod., 2008; Abbas in sod., 2011).

Alkaloid diskorabdin R, ki kaže protibakterijske lastnosti tako proti po Gramu pozitivnim kot po Gramu negativnim bakterijam, so leta 2000 ekstrahirali iz neidentificiranih antarktičnih vrst spužev iz rodu *Lantrunculia* (Abbas in sod., 2011). V antarktični spužvi *Latrunculia apicalis* sta diskorabdina C in G porazdeljena v linearjem gradientu, ki pada proti centru sferično simetrične spužve. Takšna porazdeljenost omogoča optimalno kemično obrambo proti morski zvezdi *Perknaster fuscus*. Diskorabdine in sorodne pigmente so izolirali tudi iz tropskih spužev iz rodov *Latrunculia*, *Prianos*, *Zyzya* in *Batzella*. Poleg tega je bil leta 1986 diskorabdin C, za katerega so značilne protitumorske lastnosti, prvi izolirani diskorabdin. Leta 2009 pa so iz neidentificiranih arktičnih vrst iz rodu *Latrunculia* izolirali še dihidrodiskorabdin B in diskorabdin Y, ki izkazujeta protimalarično in protibakterijsko aktivnost ter delovanje proti virusu hepatitis C (Perry in sod., 1988; Gunasekera in sod., 2003; Lebar in sod., 2007; El-Naggar in Capon, 2009; Wada in sod., 2010; Abbas in sod., 2011).

Dendrilla membranosa je svetlorumena antarktična spužva, ki se zaradi pomanjkljive fizične obrambe (nima spikul) kemično brani pred morskimi polži in že omenjeno morsko zvezdo. Zato proizvaja specifične diterpene-membranolide. Membranolida C in

D sta aktivna proti po Gramu negativnim bakterijam in glivam (Lebar in sod., 2007; Gonzalez, 2007).

Dva nova 3-alkiltetrahidropiridinska alkaloida, haliklamin C in D so izolirali iz arktične spužve *Haliclona viscosa*, ki izdeluje tudi viskozamin in viskozalin. Oba haliklamina močno inhibirata rast dveh simpatričnih bakterijskih sevov (Lebar in sod., 2007; Timm in sod., 2010).

V norveški spužvi *Polymastia boletiformis* so odkrili serijo novih konjugatov iz steroidne in aminokislinske komponente, polimastiamide, ki so *in vitro* protimikrobnno aktivni, delujejo tudi proti nekaterim patogenom (Lebar in sod., 2007).

Geodia barretti je spužva iz Severnega morja, ki vsebuje dva protivegetativna brominirana diketopiperazina. Oba metabolita preprečujeta kolonizacijo ličinkam rakov vitičnjakov in delujeta tudi kot selektivna liganda serotonininskega receptorja (Lebar in sod., 2007).

Norveška spužva *Plaktoris simplex* proizvaja dva ciklična peroksida, ki sta v nizu testiranj za bioaktivnost izkazala zmerno *in vitro* aktivnost proti šestim človeškim tumorskim celičnim linijam (Lebar in sod., 2007).

Kirkpatrickia varialosa je svetlordeča spužva, ki naseljuje morsko dno okrog Antarktike. Te spužve so najbolj znane po produkciji pigmentov variolinov, ki kažejo močno citotoksično delovanje proti levkemičnim celicam, raku jajčnikov in črevesnim malignomom. Mehanizem delovanja je inhibicija od ciklina odvisne kinaze oziroma močna aktivacija apoptoze. Zaradi unikatne strukture in močne bioaktivnosti teh spojin, so postale zanimive za kemijsko sintezo. Glavna spojina je variolin B, ki je tudi najaktivnejši analog iz družine teh spojin. Od leta 2001, ko so prvič poročali o prvi popolni sintezi variolina B, so se pričele pojavljati tudi druge, nove sintetične poti (Lebar in sod., 2007). Z različnimi strategijami sinteze jedra variolina B so poskušali narediti različne derivate, za katere se je po preizkušanju na človeških tumorskih celičnih linijah izkazalo, da niso bolj aktivni od naravne oblike. Drug sintetični analog, PMO1218, je kazal močno rastno inhibicijo proti različnim človeškim tumorskim

celičnim linijam. Da bi natančneje raziskali njegovo aktivnost, so razvili visoko občutljivo metodo za kvantitativno analizo zdravil in mišje ter podganje plazme z uporabo HPLC-ESI-MS tandemske masne spektrometrije (Dembitsky in sod., 2005; Lebar in sod., 2007; Bettayeb in sod., 2007; Tohme in sod., 2011).

2.5 CELIČNE KULTURE

Celična kultura je homogena populacija celic, ki živijo in se razmnožujejo v gojišču, v razmerah *in vitro*. Uporaba celičnih kultur omogoča lažjo dostopnost za opazovanje in eksperimentiranje. Prednost pred organizmom je lažje zagotavljanje enakih in točno določenih razmer poskusa za vse celice in lažje spremeljanje njihovih odzivov. Imajo pa celične kulture tudi slabo plat, ki se odraža v izgubi specifičnih lastnosti celic, proliferaciji, izgubi se tridimenzionalna struktura tkiva, zaradi katere se prekinejo interakcije med celicami in medceličnino, manjka živčni in endokrini sistem, zaradi spremembe okolja lahko pride do izgub specifičnih celičnih funkcij.

Z velikim razmahom gojenja različnih celičnih kultur v razmerah *in vitro* se je testiranje toksičnih učinkov različnih substanc preneslo na preučevanje direktnega vpliva učinkovin na posamezne celice v kulturi, t.i. citotoksičnost. Citotoksičnost je le eden izmed izrazov, ki se uporablajo za opredelitev obsega celične viabilnosti (»živosti«). Razvili so mnogo vrst testov za merjenje citotoksičnosti, ki so poceni, dobro ponovljivi in se jih da enostavno ovrednotiti. Med tovrstne teste prištevamo merjenje integritete celične membrane (na primer barvanje z vitalnimi barvili), funkcionalne analize metabolnih komponent (MTT test, merjenje nivojev celične energije), morfološko analizo in analize razmnoževanja celic (test preživetja *in vitro/in vivo* in določanje hitrosti rasti). Katerega od testov torej izbrati? Preprostega odgovora ni, vendar velja pravilo, da v primeru preizkušanja velikega števila učinkovin v čim krajšem času, uporabimo MTT-test. Za čim boljše razumevanje citotoksičnega delovanja določene snovi pa je najbolje uporabiti več metod (Batista, 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Uporabili smo izbrane, že predhodno pripravljene organske izvlečke antarktičnih spužev, ki jih je pri svoji diplomski nalogi pripravil Rok Kosmina (Kosmina, 2012). V podpoglavlju 3.2 je opisan postopek priprave organskih izvlečkov in enega vodnega izvlečka, ki ga je pripravil Miha Rajh v svoji individualni raziskovalni nalogi (Rajh, 2012).

3.1.1 Vzorci sružev

Izdelava pričujočega magistrskega dela ne bi bila mogoča brez posredovanja prof. dr. Dietricha Mebsa iz Frankfurta na Majni, ki nam je priskrbel vzorce antarktičnih morskih sružev. Te so nabrali v antarktični odpravi, imenovani ANDEEP – SYSTCO (ANtarctic Deep - sea biodiversity: colonisation history and recent community patterns – SYStem COUpling) v letih 2007 in 2008. Odprava je odšla na Antarktiko s ciljem, da bi globlje preučili biološko raznolikost Antarktike in potencialen izvor nekaterih vrst, ki so se po predvidevanjih razširile iz teh območij. Po nabiranju so vzorce sružev nemudoma zamrznili pri -20 °C in v tem stanju prenesli v laboratorij, kjer so jih še taksonomsko razvrstili in nato liofilizirali (Kosmina, 2012).

Vse oznake vzorcev in vrste sružev, ki smo jih testirali za citotoksično aktivnost, so navedene v **Preglednici 1**. Večina sružev je taksonomsko razvrščenih le do rodu, redke do vrste, ena pa je ostala taksonomsko neuvrščena.

Preglednica 1: Oznake vzorcev in vrste spužev.

Oznaka spužve	Vrsta spužve
8	<i>Bathydorus cf. spinosus</i>
10	Neidentificirana sružva 1
27	<i>Chinachyra cf. barbata</i>
34	<i>Rossella</i> sp.
37/L	<i>Latrunculia cf. Lendenfeldi</i>
41	<i>Microcionidae</i> spp.
45-H	<i>Halichondria osculum</i>
46	<i>Lantrunculia cf. bogacei</i>
48/1	<i>Xestospongia</i> sp.
51	<i>Isodictya toxophila</i>
51V	<i>Isodictya toxophila</i>
55	<i>Tetillia leptoderma</i>
124	<i>Demospongia</i> sp.
167	<i>Rossella cf. racovitzae</i>

V-vodni vzorec

3.1.2 Celične kulture

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili celični liniji V-79-379A (V-79) (*angl. Diploid lung fibroblasts from Chinese hamster*) in CaCo-2 (*angl. Human colon adenocarcinoma*).

Preglednica 2: Uporabljene celične linije.

Vrsta celične linije	Vrsta tkiva	Vir
V-79-379A	Pljučno tkivo	Samec kitajskega hrčka
CaCo-2	Tumor	72-letni pacient

3.1.2.1 Celična linija V-79-379A

Celična linija V-79 je normalna celična linija pljučnih fibroblastov kitajskega hrčka, ki sta jo izolirala Ford in Yerganian leta 1958 in je bila prvotno poimenovana Sev V (*angl. Strain V*). Istega leta jo je Elkind preimenoval v celično linijo V-79. Gre za celično linijo, ki je široko uporabna predvsem v genetiki somatskih celic in študijah mutageneze (Simi in sod., 1999; Liskay, 1977).

Celice V-79-379A smo gojili v gojišču advanced Eagle's minimal essential medium (EMEM), obogatenem s 5 % fetalnim telečjim serumom (FCS), 2 mmol/L L-glutaminom, 100 U/ml penicilinom in 100 µg/ml streptomicinom.

3.1.2.2 Celična linija CaCo-2

Celice CaCo-2 so transformirana celična linija črevesnih epitelnih celic, pridobljenih iz kolorektalnega adenokarcinoma 72-letnega pacienta. Te celice, gojene v razmerah *in vitro*, se diferencirajo v celice, ki izražajo tako strukturne kot funkcionalne lastnosti epitelnih celic tankega črevesja (Fajdiga, 2006).

CaCo-2 celice smo gojili v gojišču advanced RPMI 1640 z dodanim 5 % FCS, 2 mmol/L L-glutaminom, 100 U/ml penicilinom in 100 µg/ml streptomicinom.

3.1.3 Gojišča

Za gojenje, presajanje in poskuse smo uporabljali dve vrsti gojišč (Gibco®, Invitrogen, Velika Britanija): advanced EMEM (*angl.* Eagle's minimal essential medium) ter advanced RPMI 1640 (*angl.* Roswell Park Memorial Institute). Tako EMEM kot RPMI 1640 sta bila obogatena s 5 % FCS, 2 mmol/L L-glutaminom, 100 U/ml penicilinom in 100 µg/ml streptomycinom. Obe gojišči smo pred uporabo segreli v vodni kopeli na 37 °C, po uporabi pa shranjevali v hladilniku.

3.1.4 Reagenti in raztopine

3.1.4.1 Trypsin

Za postopek tripsinizacije oziroma odlepljanja celic smo uporabljali komercialno pripravljen tripsinu podoben rekombinantni encim (TrypLE™ Select; Gibco®, Invitrogen, Velika Britanija), ki cepi peptidne vezi na C-terminalnem koncu lizina in arginina. Pred uporabo smo ga v vodni kopeli segreli na 37 °C in po uporabi shranjevali v hladilniku.

3.1.4.2 Fetalni telečji serum (FCS)

Za kultivacijo celic smo uporabljali komercialno pripravljen FCS (Gibco®, Invitrogen, Velika Britanija), ki celicam omogoča pritrditev, rast in delitev. Dodali smo ga gojišču do končne koncentracije 5 %.

3.1.4.3 MTS reagent

Za ugotavljanje viabilnosti celic smo uporabljali komercialno pripravljen MTS reagent (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol; Promega, ZDA), ki je bil do uporabe shranjen v hladilniku, zaščiten z aluminijasto folijo.

3.1.4.4 Etanol

Za pripravo pozitivne kontrole smo uporabljali komercialno pripravljen 96 % etanol (Merck, Nemčija).

3.1.5 Laboratorijski pribor in oprema

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema.

Naziv	Oznaka modela	Proizvajalec
Hladilnik		Zanussi Končar, Italija
Zamrzovalnik		Gorenje, Slovenija
Večkanalni spektrofotometer		Bio-Tek Instruments Inc., ZDA
Laminarij		The Baker Company, ZDA
Vodna kopel		Julabo, Nemčija
Rotacijski stresalnik	IKA Lab Dencer	IKA, ZDA
Avtomatske pipete		Brand, Nemčija
Avtomatski pipetor		Brand, Nemčija
Plastične pipete		TPP, Švica
CO ₂ inkubator	I-CO ₂ -185	Kambič, Slovenija
Invertni mikroskop	Televal 31	Carl Zeiss, Nemčija
Multikanalna pipeta		Costar, ZDA
Stresalnik	Vibromix	Tehnica, Slovenija
Centrifuga	Sigma 3K 30	SciQuip, VB

Preglednica 4: Uporabljeni laboratorijski pribor.

Naziv	Proizvajalec
Mikrotiterne plošče	Costar, ZDA
Plastične posodice (25 cm^2)	TPP, Švica
Hemocitometer	Brand, Nemčija
Nastavki za pipete	Brand, Nemčija
Mikrocentrifugirke	SARSTEDT, Nemčija

3.2 METODE**Slika 5:** Shema predpriprave vzorcev antarktičnih morskih spužev.**3.2.1 Priprava vzorcev spužev za etanolno ekstrakcijo**

Rok Kosmina (2012) je določil suho maso vzorcev sružev in jo razdelil na dva dela, saj je eno tretjino mase shranil, drugi dve tretjini pa strl v terilnici in ju uporabil kot izhodni vzorec.

Preglednica 5: Suhe mase vzorcev sružev.

Vrsta sružve	Oznaka sružve	Masa vzorca (g)
<i>Bathydorus cf. spinosus</i>	8	0,43
Neidentificirana sružva 1	10	0,37
<i>Chinachyra cf. barbata</i>	27	0,78
<i>Rossella</i> sp.	34	0,72
<i>Latrunculia cf. Lendenfeldi</i>	37/L	0,79
Microcionidae spp.	41	1,23
<i>Halichondria osculum</i>	45-H	0,19
<i>Lantrunculia cf. bocagei</i>	46	1,92
<i>Xestospongia</i> sp.	48/1	1,44
<i>Isodictya toxophila</i>	51	2,16
<i>Tetillia leptoderma</i>	55	1,65
Demospongia sp.	124	1,06
<i>Rossella cf. Racovitzae</i>	167	0,93

3.2.2 Priprava organskih izvlečkov

Zatehtani vzorec je s škarjami narezal na majhne, nekaj mm³ velike koščke, jih prenesel v veliko centrifugirko ter ekstrahiral s približno 10 ml 96 % etanola. To je dosegel tako, da je v centrifugirke dodal primerno količino topila, ki je vzorec sružve prekrilo za približno 1 cm. Centrifugirke je zamašil s plastičnimi zamaški, jih vstavil v stresalnik in pustil, da se stresajo čez noč pri sobni temperaturi in 600 obratih/min. Naslednji dan je vzorec prefiltriral skozi filtrirne papirje ter filtrate shranil v mikrocentrifugirke, ki jih je označil, oblepil s parafilmom in jih shranil v hladilniku na 4 °C.

3.2.3 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v etanolnih vzorcih

Suho težo je ugotavljal s sušenjem 500 µl vzorca na stehtanem in označenem urnem stekelcu. Sušenje je potekalo v sterilizatorju 10 min na 120 °C. Po sušenju je stekelca

ponovno stehtal in preračunal suhe teže v mg/ml. Suhe teže vzorcev sružev (mg/ml) prikazuje **Preglednica 6** (Kosmina, 2012).

Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi v etanolnih izvlečkih sružev.

Vrsta sružve	Oznaka sružve	Suha teža (mg/ml)
<i>Bathydorus cf. spinosus</i>	8	3,60
Neidentificirana sružva 1	10	3,34
<i>Chinachyra cf. barbata</i>	27	3,46
<i>Rossella</i> sp.	34	6,50
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37/L	8,96
Microcionidae spp.	41	4,46
<i>Halichondria osculum</i>	45-H	3,06
<i>Lantrunculia cf. bocagei</i>	46	7,16
<i>Xestospongia</i> sp.	48/1	3,96
<i>Isodictya toxophila</i>	51	4,28
<i>Tetillia leptoderma</i>	55	4,24
Demospongia sp.	124	4,96
<i>Rossella cf. racovitzae</i>	167	3,84

3.2.4 Tehtanje vzorcev za pripravo vodnih izvlečkov

Miha Rajh je določil maso vzorcev sružev in jo razdelil na dva dela. Prvo polovico je uporabil za pripravo vodnih izvlečkov, drugo pa je shranil za nadaljnjo etanolno ekstrakcijo. Prvo polovico je razrezal, strl v terilnici in stehtal maso vzorca (Rajh, 2012). Za testiranje citotoksične aktivnosti smo med vzoreci za vodno ekstrakcijo izbrali le vzorec z oznako 51 (*Isodictya toxophila*), ki smo ga v nadaljevanju označevali kot 51V (V-vodni vzorec). Masa tega vzorca je navedena v **Preglednici 7**.

Preglednica 7: Masa in suha teža vzorca 51V ter volumen dodane deionizirane vode.

Masa vzorca (g)	Suha teža (mg/ml)	Volumen deionizirane vode (ml)
3,782	11,40	25

3.2.5 Priprava vodnih ekstraktov

Miha Rajh je homogenizirano maso ekstrahiral z deionizirano vodo, katere volumen je bil odvisen od mase vzorca in njegove voluminoznosti. Volumen dodane deionizirane vode za izbrani vodni vzorec prikazuje **Preglednica 7**.

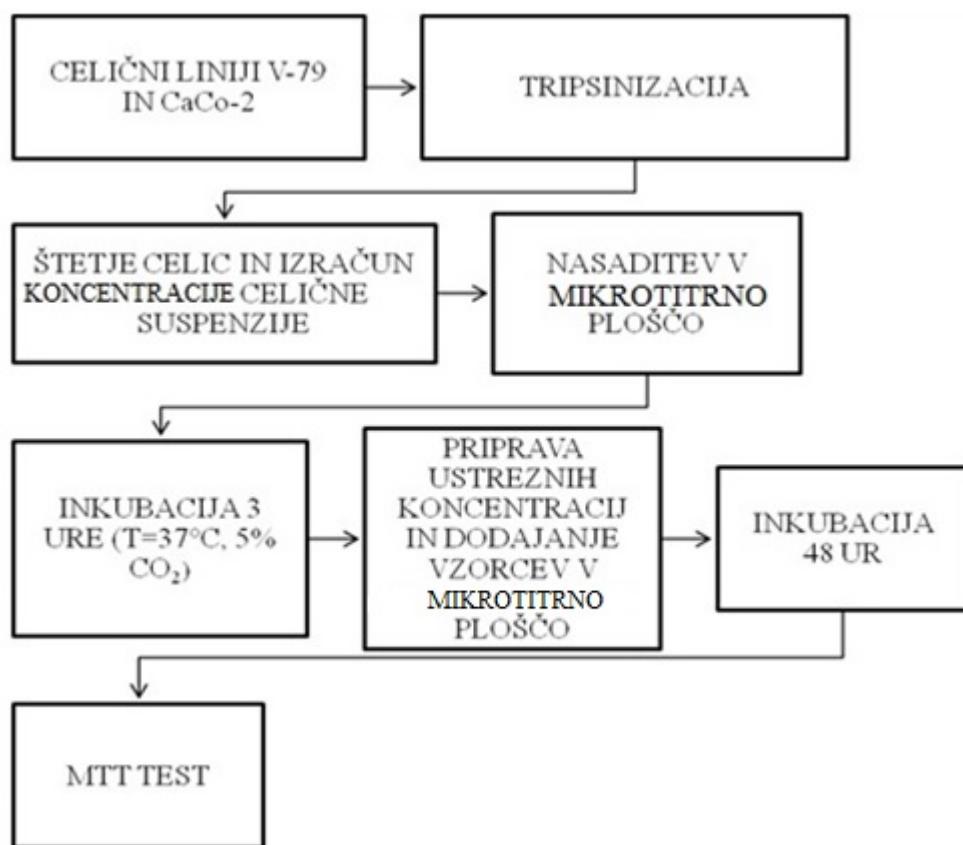
Ekstrakcija je potekala 24 ur na stresalniku s 600 obrati/minuto pri 4 °C. Izvlečke je naslednji dan centrifugiral 15 minut s 15000 obrati/minuto pri 4 °C. Supernatant je odpipetiral v čašo in nato v 2 ml mikrocentrifugirke, ki jih je shranil na -20 °C.

3.2.6 Izračun suhe teže ekstrahirane snovi v vodnem vzorcu

Miha Rajh je suho težo ugotavljal tako, da je 500 µl vzorca odpipetiral na stehtano in označeno urno steklo, ki ga je nato ponovno stehtal. Sušenje je potekalo v sterilizatorju 15 minut na 100 °C. Po sušenju je urno stekelce s posušenim vzorcem ponovno stehtal in preračunal suho težo v mg/ml. Suho težo izbranega testnega vzorca 51V prikazuje **Preglednica 7** (Rajh, 2012).

3.2.7 Testiranje citotoksične aktivnosti

Za boljšo preglednost postopka testiranja citotoksičnosti smo pripravili shemo poskusa (**Slika 8**).



Slika 6: Shema poskusa.

3.2.7.1 Priprava celične linije

Obe celični liniji, tako V-79-379A kot tudi CaCo-2, sta bili pred uporabo zamrznjeni v tekočem dušiku na -180 °C. Celice smo odmrznili v vodni kopeli z enominutnim segrevanjem na 37°C. Nato smo jih prenesli v ustrezno gojišče z dodanim FCS. Sledila je 3-urna inkubacija v CO₂ inkubatorju (5% CO₂, 37 °C, 100 % vlažnost), po kateri smo celicam zamenjali sveže gojišče in jih gojili vse dokler niso dosegli konfluentne rasti. Gostoto celic smo preverjali z invertnim mikroskopom.

3.2.7.2 Tripsinizacija

Ko je bila gostota celic dovolj visoka, smo odstranili gojišče s serumom in dodali 2 ml encima TripLE™ Select ter pustili delovati 1 minuto. V nadaljevanju smo encim odstranili in plastično posodico položili v CO₂ inkubator za 8 minut. Nato smo dodali 5 ml gojišča brez FCS, celice resuspendirali in jih presadili v novo pasažo tako, da smo

nekaj kapljic celične suspenzije odpipetirali v novo plastično posodico s svežim gojiščem, obogatenem s FCS ter jih gojili v CO₂ inkubatorju.

3.2.7.3 Določanje koncentracije celic v celični suspenziji s štetjem v hemocitometru

Po postopku tripsinizacije smo eno kapljico celične suspenzije nanesli pod pričvrščeno krovno stekelce na hemocitometru ter prešteli celice v znanem volumnu (10^{-4} mililitra) z invertnim mikroskopom. Prešteli smo osem kvadratkov (površina enega kvadratka je 1mm^2). Koncentracijo celic na mililiter suspenzije smo izračunali po enačbi:

$$\text{Število celic/ml} = \text{Število preštetih celic}/8 \times 10^4 \quad \dots(1)$$

V poskusih s celicami V-79-379A smo potrebovali končno koncentracijo 5×10^3 celic v $100 \mu\text{l}$ gojišča/vdolbinico mikrotitrne plošče, zato smo izračunali koliko celične suspenzije moramo prenesti v takšno količino gojišča, da bo zadostovala za poskus in bo hkrati dosežena končna koncentracija celic. Spodaj je naveden primer izračuna potrebnega volumna celične suspenzije:

Izračun koncentracije celic na mililiter: $176 \text{ celic}/8 \times 10^4 = 22 \times 10^4 \text{ celic/ml}$

Izračun števila celic na skupni volumen 9 ml gojišča s celično suspenzijo: $5 \times 10^3 \times 9000 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l} = 4,5 \times 10^5$

Izračun volumna celične suspenzije za prenos v končni volumen 9 ml (gojišče s celično suspenzijo): $4,5 \times 10^5 \text{ celic} / 22 \times 10^4 \text{ celic} = 2,045 \text{ ml}$

Volumen gojišča, v katerega smo prenesli 2,045 ml celične suspenzije: 9 ml skupnega volumna - 2,045 ml celične suspenzije = 6,955 ml gojišča s serumom.

Ko smo celično suspenzijo prenesli v izračunani volumen gojišča, smo vse skupaj dobro resuspendirali zaradi potencialnih celičnih agregatov.

Pri poskusih s celicami CaCo-2 je bil postopek izračuna enak, le končna koncentracija je bila drugačna – 10^4 celic na 100 μl gojišča.

3.2.7.4 Nasaditev na mikrotitrno ploščo

Po zgoraj navedenih izračunih smo pripravili skupni volumen 9 ml gojišča s celično suspenzijo, ki smo jo z večkanalno pipeto prenesli na mikrotitrno ploščo (100 $\mu\text{l}/\text{vdolbinico}$; 5×10^3 celic). Da bi se celice pritrdile na dno mikrotitrne plošče smo jih 3 ure inkubirali v CO_2 inkubatorju.

3.2.7.5 Priprava in dodajanje izbranih izvlečkov antarktičnih morskih spužev

Med inkubacijo celic smo pripravili ustrezne volumne posameznih vzorcev in jih odpipetirali v predhodno označene mikrocentrifugirke. Izračunane volumne posamičnih vzorcev prikazuje **Preglednica 8**. Za vsak vzorec smo pripravili 1 ml gojišča in ga nato odvzeli toliko, kolikor je bil izračunani volumen vzorca. Odvzeti volumen smo nadomestili z izračunanim volumnom vzorca in tako dobili končno koncentracijo vzorca (0,1 mg/ml). Po inkubaciji smo z invertnim mikroskopom preverili pritrjenost celic. Odstranili smo gojišče in nato v vsako vdolbinico pripadajočega stolpca (osem paralelk) mikrotitrne plošče (100 $\mu\text{l}/\text{vdolbinico}$) dodali še gojišče z vzorcem. Poleg tega smo pripravili še dve kontroli. Pozitivno kontrolo je predstavljalo 970 μl gojišča in 30 μl 96 % etanola (končna koncentracija 0,1 mg/ml; 100 $\mu\text{l}/\text{vdolbinico}$), medtem ko smo za negativno kontrolo uporabili le 1 ml gojišča (100 $\mu\text{l}/\text{vdolbinico}$). Sledila je 48-urna inkubacija mikrotitrne plošče v CO_2 inkubatorju.

Preglednica 8: Volumen posameznega vzorca ekstraktov sružev v MTS testu, potreben za doseganje končne koncentracije suhe snovi 0,1 mg/ml.

Oznaka sružve	Začetna koncentracija (mg/ml)	Volumen vzorca (μ l)
8	3,60	27,78
10	3,34	29,94
27	3,46	28,90
34	6,50	15,38
37/L	8,96	11,16
41	4,46	22,42
45-H	3,06	32,68
46	7,16	13,97
48/1	3,96	25,25
51	4,28	23,36
55	4,24	23,58
124	4,96	20,16
167	3,84	26,04
51V	2,798	35,74

3.2.7.6 MTS-test

Pri kolorimetričnem MTS-testu (ugotavljanje viabilnosti celic) metil tetrazolijeva sol (MTS reagent) služi kot akceptor vodika, ki ga mitohondrijske dehidrogenaze v metabolno aktivnih celicah pretvorijo vobarvan in topen formazan. Količino formazana nato merimo spektrofotometrično pri 490 nm z večkanalnim spektrofotometrom. Količina nastalega formazana je direktno proporcionalna številu živih celic v celični kulturi (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, 2012; Batista, 2005). Po 48-urni inkubaciji smo odstranili gojišče in dodali sveže gojišče brez dodanega FCS (100 μ l/vdolbinico). Poleg tega smo dodali MTS reagent (20 μ l/vdolbinico) in v prosti stolpec mikrotitrne plošče (kjer niso bile nasajene celice) še slepo kontrolo (100 μ l gojišča brez seruma in z 20 μ l MTS reagenta/vdolbinico). Ploščo smo inkubirali 1 uro v CO_2 inkubatorju in nato s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 490 nm. Da bi potrdili ponovljivost rezultatov smo z obema vrstama celic izvedli 3 ločene poskuse in 8 ponovitev. **Slika 9** prikazuje primer poskusa z izbranimi vzorci antarktičnih morskih sružev.

	S	K	K1	8	10	27	41	124	51V			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

S - Splea kontrola;

K- Negativna kontrola;

K1- Pozitivna kontrola;

8, 10, 27, 41, 124, 51V- Izvlečki antarktičnih morskih spužev.

Slika 7: Prikaz poskusa z nekaj izbranimi vzorci antarktičnih morskih spužev.

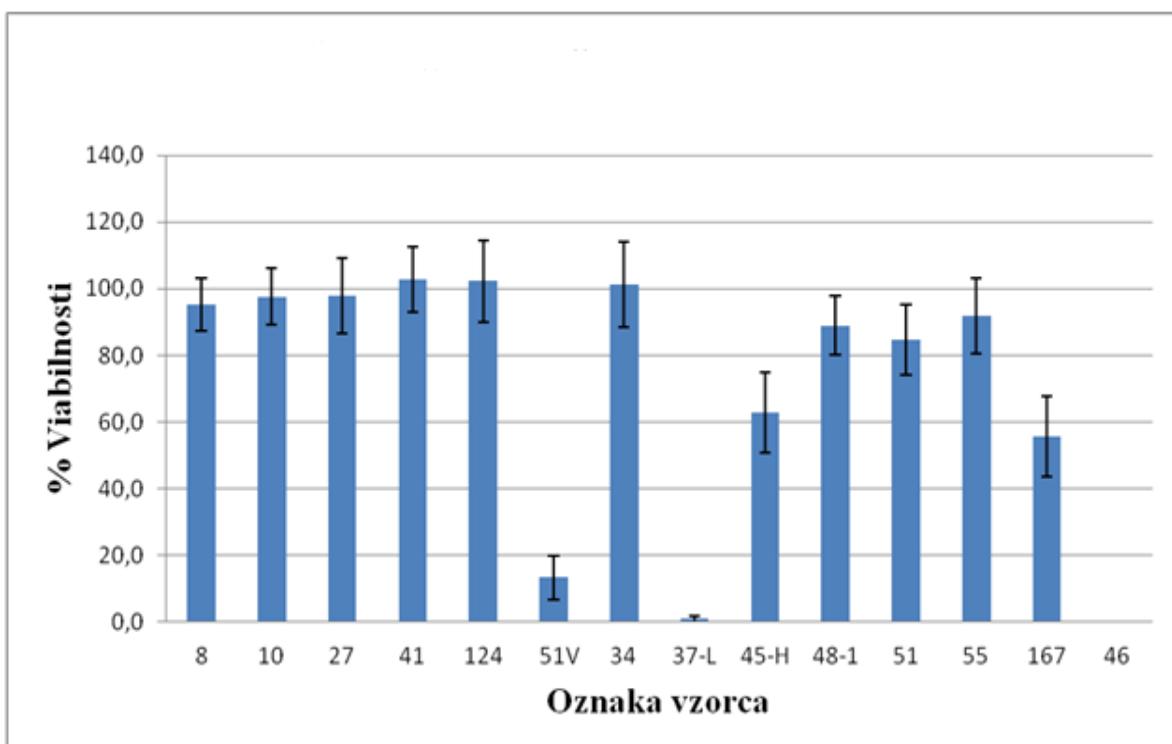
3.2.8 Statistična analiza

Rezultati spektrofotometričnega merjenja so v poglavju Rezultati prikazani grafično v obliki stolpičnih grafikonov kot % viabilnosti. Od izmerjene absorbance vsake paralelke posameznega vzorca smo odšteli povprečno vrednost slepe kontrole. Tako smo vse rezultate prikazali kot % od pozitivne kontrole. Nato smo izračunali povprečne vrednosti in standardne odklone za vsak vzorec ter primerjali odstopanja med obema celičnima linijama. S t-testom (Studentova t-analiza) smo ugotavljali ali obstajajo statistično značilne razlike v citotoksični aktivnosti med obema vrstama celic (*p< 0,05; **p< 0,01).

4 REZULTATI

4.1 CITOTOKSIČNA AKTIVNOST NA V-79-379A CELIČNI LINIJI

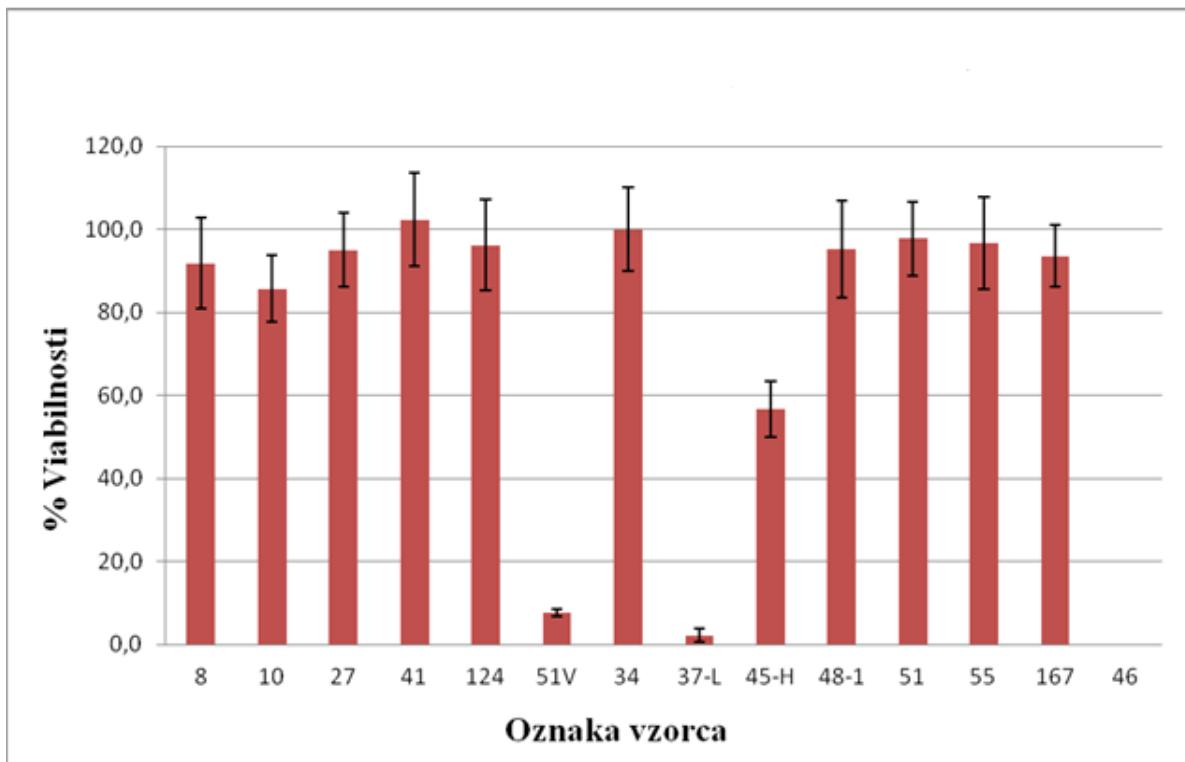
Pet od štirinajst testiranih vzorcev je kazalo citotoksičen vpliv (< 80 % viabilnost). Zelo močno citotoksično aktivnost smo opazili pri vzorcih z oznako 37-L in 46 (0 % viabilnost) ter pri vodnem vozorcu 51V (13,4 % viabilnost). Citotoksična sta bila tudi vzorca 167 (55,7 % viabilnost) in 45-H (62,9 % viabilnost) (**Slika 10**).



Slika 8: Vpliv izvlečkov antarktičnih morskih spužev (100 µg/ml) na viabilnost V-79-379A celične linije.

4.2 CITOTOKSIČNA AKTIVNOST NA CaCo-2 CELIČNI LINIJI

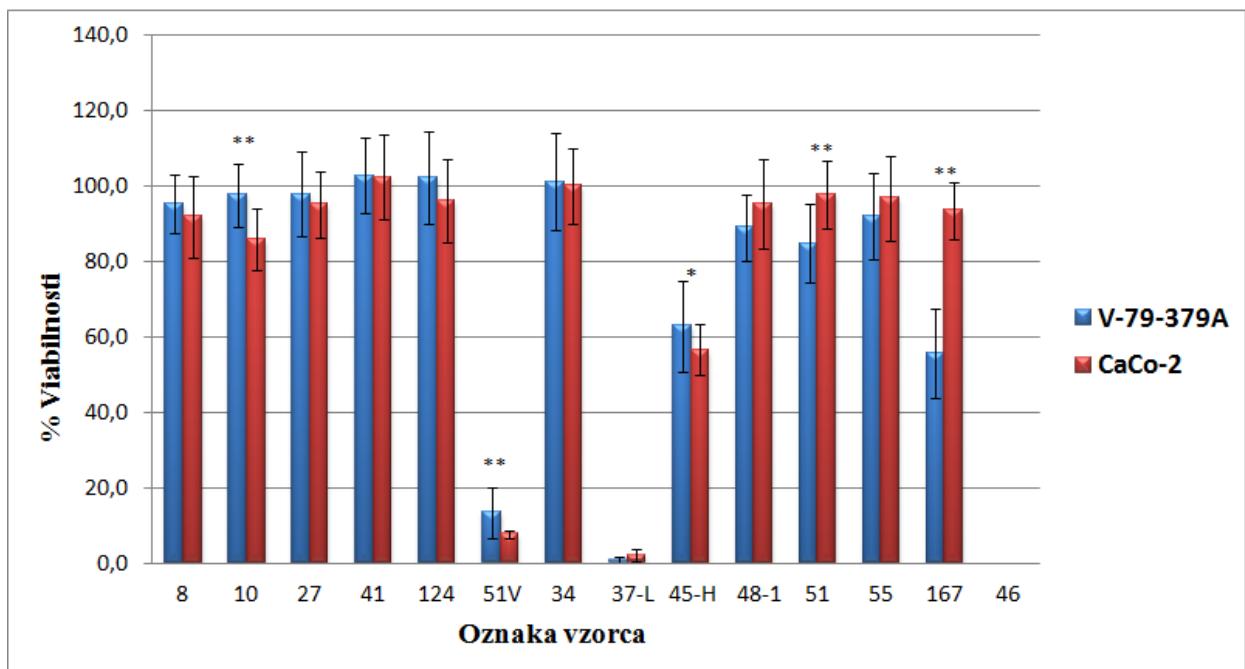
Štirje od štirinajst testiranih vzorcev so pokazali citotoksično aktivnost. Enako kot pri V-79-379A celični liniji so tudi pri CaCo-2 celični liniji vodilni vzorci 37-L, 46 (0 % viabilnost) in vodni izvleček 51V (7,6 % viabilnost). Citotoksičen vpliv je izkazal tudi vzorec 45-H (56,6 % viabilnost). Pri vseh ostalih vzorcih ni bilo moč opaziti citotoksične aktivnosti (**Slika 11**).



Slika 9: Vpliv izvlečkov antarktičnih morskih sružev (100 µg/ml) na vabilnost CaCo-2 celične linije.

4.3 PRIMERJAVA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI MED OBEMA CELIČNIMA LINIJAMA

Pri obeh vrstah celic sta vzorca 37-L in 46 celice pomorila v celoti. Trije vzorci (10, 45-H in 51V) so kazali značilno višjo citotoksično aktivnost pri CaCo-2 celični liniji, dva vzorca (51 in 167) pa statistično značilno višjo citotoksičnost pri V-79-379A celični liniji (**Slika 12**). Značilno statistično razliko v citotoksični aktivnosti med obema vrstama celic prikazuje **Preglednica 9**.



Slika 10: Vpliv izvlečkov antarktičnih morskih spužev (100 µg/ml) na viabilnost V-79-379A in CaCo-2 celične linije.

Preglednica 9: Viabilnost V-79-379A in CaCo-2 celic, izpostavljenih 100 µg/ml izvlečka. Viabilnost je izražena kot % od kontrole. Značilna razlika v citotoksični aktivnosti med obema vrstama celic je označena s simbolom * ($p < 0.05$) ali ** ($p < 0.01$).

Oznaka spužve	Vrsta spužve	Citotoksična aktivnost V-79-379A	Citotoksična aktivnost CaCo-2
8	<i>Bathydorus cf. spinosus</i>	95.2 ± 7.7	91.8 ± 10.9
10	Neidentificirana spužva 1	97.6 ± 8.5	85.7 ± 8.1 **
27	<i>Chinachyra cf. barbata</i>	97.9 ± 11.2	95.0 ± 8.9
34	<i>Rossella</i> sp.	101.1 ± 12.9	100.0 ± 10.0
37/L	<i>Latrunculia cf. Lendenfeldi</i>	0	2.1 ± 1.6
41	<i>Microcionidae</i> spp.	102.8 ± 9.9	102.3 ± 11.2
45h	<i>Halichondria osculum</i>	62.9 ± 11.9	56.6 ± 6.7 *
46	<i>Lantrunculia cf. bocagei</i>	0	0
48/1	<i>Xestospongia</i> sp.	89.0 ± 8.7	95.2 ± 11.7
51	<i>Isodictya toxophila</i>	84.7 ± 10.4 **	97.7 ± 8.9
51V	<i>Isodictya toxophila</i>	13.4 ± 6.7	7.6 ± 0.9 **
55	<i>Tetillia leptoderma</i>	91.9 ± 11.4	96.7 ± 11.1
124	<i>Demospongia</i> sp.	102.2 ± 12.2	96.2 ± 11.0
167	<i>Rossella cf. racovitzae</i>	55.7 ± 11.9 **	93.5 ± 7.5

Opomba: Simbol V smo uporabili za oznako vodnega vzorca 51.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Tuberkuloza, gripa, AIDS, malarija in rak so zastrašjujoče bolezni, s katerimi si znanstvena skupnost že desetletja beli glave zaradi nenehnega pojavljanja odpornosti proti splošno uveljavljenim zdravilom. Zaradi neizogibne potrebe po novih in učinkovitih spojinah vodnicah so se raziskovalci, začudenici nad skoraj nedoumljivo stopnjo biodiverzitete, oprli na največji ekosistem našega planeta, oceane. Ti so se izkazali kot rešilna bilka za mnoge težave, ki pestijo človeško civilizacijo. Proces odkrivanja spojin vodnic se začne z zbiranjem tako kopenskih kot morskih organizmov in testiranjem bioloških aktivnosti njihovih izvlečkov. To je najpomembnejši korak, ki priskrbi informacije za osamitev in čiščenje aktivnih spojin. Med morskimi organizmi so od leta 1965 največ izoliranih sekundarnih metabolitov prispevale morske spužve, ki so primarni vir biološko aktivnih molekul. Glavni biološki aktivnosti teh metabolitov sta citotoksičnost in protimikrobnno delovanje, medtem ko so druge aktivnosti bolj ali manj omejene. Prav zaradi tega je večina raziskav na tem področju osredotočenih na vrednotenje farmakološkega potenciala protitumorskih in protimikrobnih učinkovin. Najbolj intenzivno raziskane so spužve iz Kitajskega morja, Japonske, zahodnega Pacifika in Indijskega oceana (Pedbradab in sod., 2010; Almeida in sod., 2010).

Po dolgotrajnem izčrpavanju obljudenih tropskih in zmerno topnih voda se je vsaj nekaj raziskovalcev preusmerilo na težje dostopna in posledično slabo preučena polarna območja. Polarno podnebje je odločilno vplivalo na biološko raznolikost organizmov, saj se njihova ekologija lahko znatno razlikuje od organizmov v toplejših vodah. Organizmi, ki uspevajo v tako neusmiljenem okolju, so zelo zanimivi zaradi še neodkritih substanc, ki so del njihove kemične obrambe (Landolfa, 2011).

Unikatna in presenetljivo velika biološka raznovrstnost antarktičnih spužev nas je navdušila za iskanje novih bioaktivnih spojin s citotoksičnim delovanjem. Za testiranje citotoksičnosti izvlečkov izbranih vrst antarktičnih morskih spužev smo se odločili ugotavljati viabilnost tako normalnih kot transformiranih celic z MTS testom.

Citotoksično aktivnih je bilo 5 od 14 testiranih izvlečkov. Najbolj izrazito citotoksično aktivnost sta izkazala vzorca 37-L iz vrste *Latrunculia cf. lendenfeldi* in 46 iz vrste *Latrunculia cf. bocagei*. Ta ugotovitev je popolnoma v skladu s pričakovanji, saj spužve iz rodu *Latrunculia* vsebujejo zelo citotoksične diskorabdine - piroloiminokinone, katerih citotoksična mehanizma sta inhibicija topoizomeraze II ter vrivanje v DNA (Copp in sod., 1994; Martins Antunes, 2003). Poleg diskorabdinov sta omembe vredna tudi latrunkulina A in B, ki močno vplivata na organizacijo mikrofilamentov v celici. Konishi in sodelavci (Konishi in sod., 2009) so raziskovali protitumorski učinek latrunkulina A in s testi *in vitro* ugotavljali od doze odvisno citotoksičnost latrunkulina A na dveh celičnih linijah človeškega želodčnega karcinoma. Prišli so do zaključka, da je citotoksičnost tega metabolita močno odvisna od koncentracije ter nadaljevali z *in vivo* testom na miših. Celice omenjenih celičnih linij so inokulirali v gole miši in intraperitonealno aplicirali latrunkulin A. Ugotovili so, da se je stopnja preživetja bistveno izboljšala brez hujših stranskih učinkov (Coué in sod., 1987; Peterson in Mitchison, 2002; Allingham in sod., 2006; Konishi in sod., 2009). Izvlečka 46 in 37-L sta v našem primeru delovala enako na obe izbrani celični liniji (0 % viabilnost).

Značilno višjo citotoksičnost je imel za CaCo-2 celice tudi vodni izvleček 51V iz vrste *Isodictya toxophila*. Informacije o tej vrsti spužve so skope, saj se v literaturi pojavlja večinoma le v ekoloških in biogeografskih temah. Edina farmakološka raziskava, ki odgovarja na vprašanje, ali ima ta vrsta spužve protitumorske lastnosti tudi proti drugim celičnim linijam, je bila objavljena leta 2010 v reviji Antarctic Science. Taboada in sodelavci (Taboada in sod., 2010) so v obsežni raziskavi, v kateri so raziskovali protitumorske lastnosti vodnih in diklorometan/metanolnih izvlečkov (v koncentracijah 50, 15 in 5 µg/ml) antarktičnih in sub-antarktičnih bentoskih organizmov, med drugim odkrili, da *Isodictya toxophila* nima protitumorske aktivnosti proti naslednjim tumorskim celičnim linijam: HT-29 (ATCC HTB-38; kolorektalni adenokarcinom), A-549 (ATCC CCL 185; pljučni karcinom) in MDA-MB 231 (ATCC HTB-26; adenokarcinom dojke) (Taboada in sod., 2010). V našem primeru pa smo ugotovili, da je bila viabilnost celic značilno manjša pri CaCo-2 celični liniji. Takšne razlike, ki se pojavljajo med našo raziskavo in opisano študijo, so najverjetnejše posledica uporabe višje koncentracije izvlečka (100 µg/ml), selektivne citotoksičnosti in točno določenih molekularnih tarč ali pa uporabe drugačnih ekstrakcijskih topil. Zaradi tega bi bilo

potrebno opraviti še nadaljnje raziskave z nižjimi koncentracijami tega vzorca ter izolirati in identificirati potencialne citotoksične učinkovine. Poleg tega bi bilo smotrno izvesti testiranja še na nekaterih drugih celičnih linijah in poiskati molekularne tarče citotoksično aktivnih spojin. V primeru, da bi se vzorec tudi v nadalnjih testiranjih dobro odrezal, bi lahko bila rešitev tega problema kemijska modifikacija, s katero bi morda dosegli sprejemljiv nivo delovanja proti zdravim celicam.

Pri etanolnem izvlečku 51 iz iste vrste spužve v nasprotju z vodnim ni bilo opaziti citotoksičnega učinka, kar je najverjetneje posledica polarnosti citotoksičnih substanc, ki se v nepolarnem etanolu ne topijo in se posledično ne ekstrahirajo. Podatkov o bioloških aktivnostih pri spužvi *Isodictya toxophila* v do sedaj objavljeni literaturi nismo zasledili. V raziskavi, kjer so testirali purinske in nukleozidne metabolite iz antarktične spužve *Isodictya erinacea*, so med drugim testirali tudi citotoksično aktivnost enega od metabolitov – erinaceana. Ugotovili so, da je – v nasprotju s šibkim protibakterijskim – erinacean deloval citotoksično proti L5178Y mišjim limfoblastoidnim celicam pri koncentraciji EC₅₀ 50 µg/ml (Moon in sod., 1998).

Pri vzorcu 167 iz vrste *Rossella* cf. *racovitzae* smo zasledili značilno razliko v citotoksični aktivnosti, saj je ta izvleček deloval le proti normalnim celicam V-79-379A. Tudi v tem primeru lahko ugotovljeno razliko razložimo s specifičnimi molekularnimi tarčami. Dobleni rezultat ni ravno vzpodbuden, saj je citotoksična aktivnost proti normalnim celicam nezaželena. Kljub temu bi bilo potrebno opraviti nadaljnje raziskave s spužvami iz tega rodu na drugih tako normalnih kot tudi tumorskih celičnih linijah, s čimer bi morda izključili splošno toksično delovanje proti normalnim celicam.

Pri vzorcu 34 iz spužve rodu *Rossella* sp. v poskusih nismo zasledili citotoksične aktivnosti, kar je zelo zanimivo, saj so v isti raziskavi, omenjeni pri vodnem izvlečku 51V (Taboada in sod., 2010), odkrili citotoksično delovanje pri dveh neidentificiranih vrstah iz rodu *Rossella* proti HT-29 (ATCC HTB-38; kolorektalni adenokarcinom), A-549 (ATCC CCL 185; pljučni karcinom) in MDA-MB 231 (ATCC HTB-26; adenokarcinom dojke) celičnim linijam. To lahko nakazuje na selektivno ozziroma ciljno usmerjeno delovanje, ki je za potencialna antineoplastična zdravila zelo dobrodošla

lastnost, ali pa na dejstvo, da so bile v raziskavah uporabljene različne sružve istega rodu.

Tudi pri vzorcu 27 iz vrste *Cinachyra cf. barbata* nismo opazili citotoksičnega vpliva, kar težko komentiramo, saj podatkov o bioaktivnosti te vrste sružve v obstoječi literaturi skorajda ni. Edina pogojna uporabna študija iz leta 1993 je poročala o zelo citotoksičnem makrolidu – cinachyrolidu A – iz rodu *Cinachyra*, ki je bil izjemno citotoksičen za L1210 mišje levkemične celice pri IC₅₀ koncentraciji nižji od 0,6 ng/ml (Fusetani in sod., 1993).

Vzorec 45-H iz vrste *Halichondria osculum* je pokazal citotoksičnost na obeh celičnih linijah z značilno večjim citotoksičnim vplivom na CaCo-2 celice. Sorodne sružve tega rodu iz zmerno topnih voda vsebujejo citotoksične depsipeptide, steroide in halihondrine, ki kažejo močno citotoksično aktivnost pri nanomolarnih koncentracijah (Hirata in Uemura, 1986; Pettit in sod., 1991; Li in sod., 1995; Zhang in sod., 2007).

Vzorec 41 iz družine Microcionidae spp. ni kazal citotoksičnega učinka. V literaturi smo zasledili objavo (Woo in sod., 2013), v kateri so raziskovali strukturo gombamida, cikličnega tiopeptida iz sružve *Clathria gombawuiensis*, ki pripada družini Microcionidae. V raziskavi so testirali tudi citotoksičnost proti dvema celičnim linijama. Ugotovili so, da organski izvleček te vrste sružve izkazuje šibko citotoksično delovanje proti celičnim linijama A549 (alveolarne bazalne epitelne celice človeškega adenokarcinoma; Ye in sod., 2011) in K562 (nesmrtnе mielogenske levkemične celice; Lozzio in Lozzio, 1975) ter ima zmeren vpliv na preživetje solinskih rakcev (Woo in sod., 2013). Poleg tega so iz vrste *Clathria (Thalysias) abietina* izolirali dva citotoksična in protituberkulozna peptida, mikrocionamide A in B, ki sta v eni izmed raziskav izkazala citotoksičen vpliv proti dvema različnima celičnim linijama iz tumorja dojke (MCF-7 in SKBR-3). Oba mikrocionamide sta inhibitorno delovala že v nanomolarnih koncentracijah. Z morfološkimi testi so med raziskavo ugotovili tudi, da oba peptida povzročita apoptozo celic MCF-7 v 24 urah po izpostavitvi celic koncentraciji 5,7 µM (Davis in sod., 2004). Iz karibske sružve *Pandaros acanthifolium* so izolirali steroidne glukozide (pandarozide A-D) in njihove metilne estre. Pri teh so ugotovili, da imajo protiparazitsko delovanje in citotoksično aktivnost proti L6 celični

liniji (celice podganjih skeletnih mišic). Presenečenje so predstavljeni določeni izolati, saj so za red spužev Poecilosclerida značilni zelo raznoliki kompleksni bioaktivni gvanidinski alkaloidi (Regalado in sod., 2010). Spužvo, iz katere smo dobili vzorec, bi bilo potrebno taksonomsko uvrstiti do vrste in jo testirati še na drugih celičnih linijah, saj smo iz literature ugotovili, da ima ogromno spužev iz te družine farmakološko aktivne spojine in smo na tem mestu navedli le nekaj primerov iz literature. Antarktične predstavnice te družine so slabo raziskane in se v literaturi ne pojavljajo.

Vzorec 48/1 iz rodu *Xestospongia* sp. v naši raziskavi ni pokazal citotoksičnega učinka. To je zelo nenavadno, saj so tropске spužve iz tega rodu bogat vir raznolikih bioaktivnih sekundarnih metabolitov kot so alkaloidi (ksestospongini, araguspongini, aaptamini, manzamini, ingenamini in renieramicini), policiklični kinoni in hidrokinoni, poliacetilenski derivati, aminoalkoholi, heterociklične spojine in steroli (aragusterol). Nekatere od teh spojin izkazujejo značilno citotoksično, protimikrobnno, protiplazmodijsko ali vazodilatorno aktivnost. Poleg tega so iz tega rodu izolirali tirozin kinazne inhibitorje, na primer policiklične kinone in hidrokinone iz razreda halenakinonov (Laurent in sod., 2006). Novejše raziskave navajajo še nekaj nenavadnih alkaloidov kot so hachijodini A-G, ksestozin A, amfimedin in sorodne derivate, ki so inhibitorji topoizomeraze II (Calcul in sod., 2003; Joseph in Sujatha, 2011). V eni izmed raziskav so poročali o motuporaminih, antiangiogenskih in antiinvazijskih alkaloidih, izoliranih iz spužve *Xestospongia exigua* (Williams in sod., 1998). Leta 1996 so objavili raziskavo, ki je poročala o izolaciji izokinolin kinonov iz še neopisane filipinske morske spužve iz rodu *Xestospongia*. Zasledili so insekticidno, protiglivno in protimikrobnno delovanje izoliranih spojin (Edrada in sod., 1996a). Citotoksični manzaminski alkaloidi iz spužve *X. aschmorica* so proti celicam mišjega limfoma delovali v koncentracijskem območju ED₅₀ 1,6-25 µg/ml (Edrada in sod., 1996b). Če primerjamo koncentracijsko območje citotoksičnega delovanja prej omenjenih manzaminov in hibridnega renieramicina T iz neznane tajske spužve, ki spada v rod *Xestospongia* in kaže močno citotoksično delovanje proti različnim tumorskim celičnim linijam v nanomolarnih koncentracijah (IC₅₀ 4,7-98 nM), lahko sklepamo, da je jakost citotoksičnega vpliva odvisna od odnosa med strukturo in funkcijo metabolita (Daikuhara in sod., 2009). Našo domnevo o pomembnosti odnosa med strukturo in funkcijo lahko podkrepimo z raziskavo Nakamure in sod., v kateri so proučevali

korelacijo med citotoksično in protiglivno aktivnostjo v odvisnosti od prisotnosti funkcionalnih skupin na C3 poziciji v halenakinonskemu tipu spojin (Nakamura in sod., 2005). Izsledki raziskave kažejo, da karbonilna skupina na C3 poziciji neugodno vpliva na citotoksično aktivnost. Na kratko povzeto, ketonska skupina na C3 poziciji ojača protiglivno aktivnost proti rastlinskemu patogenu *Phytophtora capsici*, medtem ko citotoksično aktivnost proti dvema tumorskim celičnim linijama (človeške rakave skvamozne celice A431 in celična linija rakavih skvamoznih celic Nakata) drastično zmanjša (Nakamura in sod., 2005).

V pričujočem magistrskem delu smo vse vzorce testirali le pri eni koncentraciji (100 µg/ml), zato primerjava naših ugotovitev z navedbami iz literature ni na mestu iz več razlogov: prvi in najpomembnejši je koncentracija izvlečkov. V večini objavljenih raziskav so namreč izvlečke testirali v širšem koncentracijskem območju, od nekaj mikrogramov pa vse do enega grama na mililiter. Rezultate bi lahko primerjali le v primeru, da bi najbolj aktivne vzorce iz naše raziskave testirali pri še nižjih koncentracijah. Poleg tega težavo predstavlja izbor vzorcev sružev, ki so slabo (ali sploh ne) raziskane in v literaturi ni podatkov o njihovih aktivnostih, ki bi omogočile verodostojno primerjavo. Težava se skriva tudi v izboru celičnih kultur in neznani farmakološki naravi potencialno aktivnih spojin, ki imajo lahko splošen ali selektiven citotoksični učinek.

Za vse visoko aktivne vzorce iz naše raziskave bi bile potrebne še nadaljnje raziskave, s katerimi bi izvlečke testirali s testom *in vitro* še pri nižjih koncentracijah. Slediti bi jim morali še *in vivo* poskusi na sesalskih živalskih modelih, na primer miših, podganah ali trenutno zelo popularnih ribah – cebricah (*angl. zebrafish*). Cebrice (*Danio rerio*) so postale zelo pomemben modelni organizem za preučevanje razvoja, genetike, imunosti, rakavih obolenj in vrsto drugih bolezni. Cebrice se ne uporablajo le za ugotavljanje bioaktivnosti, toksičnosti in stranskih učinkov vodilnih spojin, ampak tudi za validacijo tarč novih zdravil in za modifikacijo strukture medicinsko pomembnih učinkovin ter optimizacijo zdravil (Li in sod., 2012). Ta metoda je enostavna, zanesljiva in zelo učinkovita ter se uporablja za dopolnitev MTS testa. Obe metodi dajeta zelo podobne rezultate, a so ugotovili, da je metoda s cebrico bolj občutljiva za nekatere spojine. Poleg tega pri MTS testu lahko ugotavljamo citotoksičnost, proliferacijo in aktivacijo le

na posameznih celičnih linijah, medtem ko je pri cebrici možno opazovati bioaktivnost v njenem celotnem organizmu. Prednost metode je, da omogoča ugotavljanje učinkovitosti, absorbcije, distribucije, metabolizma, ekskrecije in toksičnosti potencialnih zdravil. Slabosti uporabe cebric kot modelnih organizmov so odsotnost nekaterih sesalskih organov (pljuča, prostate, dojka), koža cebric ne vsebuje nekaterih specifičnih celičnih komponent, značilnih za človeka, odrasle cebrice so zaradi svoje velikosti neprimerne za veliko število testiranj, jetrni (metabolni) encimi niso popolnoma okarakterizirani in je zato njihova vloga v metabolizmu zdravil nepoznana (Rubinstein, 2006; Lieschke in Currie, 2007; Delvecchio in sod., 2011; Li in sod., 2012; Salati in sod., 2013).

Izvlečki 8, 10, 55 in 124 niso kazali citotoksične aktivnosti. Tudi v dostopni literaturi nismo zasledili objav o bioloških aktivnostih teh vzorcev.

V primerjavi s spužvami iz zmerno toplih in tropskih voda, imajo antarktične spužve manjše število protimikrobnih sekundarnih metabolitov, ki na splošno kažejo šibkejše aktivnosti. Izvlečki iz spužev *Halichondria osculum* (oznaka 45-H) in *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* (oznaka 37-L) so bili aktivni proti večini testiranih bakterijskih sevov, z izrazitim delovanjem proti po Gramu pozitivnim bakterijam. Največjo aktivnost z najnižjo minimalno inhibitorno koncentracijo ($MIC = 15 \mu\text{g/mL}$ proti *Staphylococcus aureus* (MRSA) S-943) je kazal vzorec *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*. Protibakterijska aktivnost izvlečka iz spužve *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* je morda povezana s prisotnostjo naravnih produktov, značilnih za rod *Latrunculia*, ki imajo inhibitoren potencial proti različnim po Gramu negativnim in po Gramu pozitivnim bakterijam in jih uvrščamo med diskorabdine ter trunkuline. Seskviterpenoidni halihonadini in galaktozid-specifični lektin iz spužev rodu *Halichondria* imajo protibakterijske in protiglivne učinke. Nadaljnje analize protibakterijskega potenciala izvlečkov antarktičnih morskih spužev so pokazale značilno večjo aktivnost proti po Gramu negativnim bakterijskim sevom, izoliranih iz morske vode in arktičnega ledu (Turk in sod., 2013). Na podlagi rezultatov protibakterijskih testov (Turk in sod., 2013) in naših rezultatov lahko zaključimo, da protibakterijska aktivnost korelira s citotoksičnim delovanjem, saj oba testirana izvlečka kažeta tako citotoksično kot protibakterijsko aktivnost.

5.2 SKLEPI

Z uporabo MTS testa smo testirali 14 izvlečkov antarktičnih morskih spužev na normalni (V-79-379A) in transformirani celični liniji (CaCo-2).

Citotoksičen vpliv je izkazalo 5 vzorcev, in sicer spužve iz vrst *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* (37-L), *Latrunculia* cf. *bocagei* (46), *Isodictya toxophila* (vodni vzorec 51V), *Rossella* cf. *racovitzae* (167) in *Halichondria osculum* (45-H). Izjemno citotoksičnost smo opazili pri izvlečkih iz vrst *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, *Latrunculia* cf. *bocagei* in *Isodictya toxophila* (vodni vzorec). Vsi trije izvlečki so povzročili 0 % preživetje pri obeh vrstah celic. Glede na dobljene rezultate torej lahko potrdimo hipotezo, ki je trdila, da antarktične morske spužve vsebujejo citotoksične snovi.

Značilno razliko v citotoksični aktivnosti med obema vrstama celic smo ugotovili pri petih vzorcih, trije izvlečki spužev iz vrst *Isodictya toxophila* (vodni vzorec 51V), *Halichondria osculum* (45-H) in pri neidentificirani spužvi 1 (10) pa so kazali značilno večjo citotoksičnost pri CaCo-2 celični liniji. Na podlagi tega lahko potrdimo drugo hipotezo, ki pravi, da obstajajo značilne razlike v citotoksični aktivnosti izvlečkov na obe vrsti uporabljenih celičnih linij.

Našo tretjo hipotezo, da izvlečki polarnih spužev izražajo podobno citotoksično aktivnost, težko ovržemo ali potrdimo, saj smo vse izvlečke testirali le pri eni koncentraciji. Zaradi tega jakost citotoksičnega delovanja težko primerjamo s tropskimi spužvami, ki so veliko bolj preučene od polarnih. Za bolj verodostojno primerjavo citotoksične aktivnosti bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

Primerjava naših rezultatov z rezultati protibakterijskega testiranja, ki so ga opravili Turk in sod. (2013) je pokazala korelacijo med citotoksično in protibakterijsko aktivnostjo ter s tem potrdila našo zadnjo hipotezo.

6 VIRI

Abbas S., Kelly M., Bowling J., Sims J., Waters A., Hemann M. 2011. Advancement into the Arctic region for bioactive sponge secondary metabolites. *Marine Drugs*, 9, 11: 2423-2437.

Allingham S.J., Klenchin A.V., Rayment I. 2006. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 18: 2119-2134.

Almeida A.P., Dethoup T., Singburaudom N., Lima R., Vasconcelos M.H., Pinto M., Kijjoa A. 2010. The *in vitro* anticancer activity of the crude extract of the sponge-associated fungus *Eurotium cristatum* and its secondary metabolites. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 1, 1: 25-29.

Amsler D.C., McClintock B.J., Baker J.B. 2001. Secondary metabolites as mediators of trophic interactions among Antarctic marine organisms. *American Zoologist*, 41, 1: 17-26.

Atadja P., Gao L., Kwon P., Trogani N., Walker H., Hsu M., Yeleswarapu L., Chandramouli N., Perez L., Versace R., Wu A., Sambucetti L., Lassota P., Cohen D., Bair K., Wood A., Remiszewski S. 2004. Selective growth inhibition of tumor cells by a novel histone deacetylase inhibitor, NVP-LAQ824. *Cancer Research*, 64, 2: 689-695.

Avila C., Taboada S., Núñez-Pons L. 2008. Antactic marine chemical ecology: what is next? *Marine Ecology*, 29, 1: 1-71.

Baker J.B., Yoshida Y.W. 1994. Chemical constituents of four antarctic sponges in McMurdo Sound, Antarctica. *Antarctic Journal of the United States*, 29, 5: 153-155.

Batista U. 2005. Gojenje sesalskih celic v *in vitro* pogojih. Ljubljana, Študentska založba: 65 str.

Belarbi E.H., Contreras Gómez A., Chisti Y., García Camacho F., Molina Grima E. 2003. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances*, 21, 7: 585-598.

Bettayeb K., Tirado M.O., Marionneau-Lambot S., Ferandin Y., Lozach O., Morris C.J., Mateo-Lozano S., Druelles P., Schächtele C., Kubbutat H.G.M., Liger F., Marquet B., Joseph B., Echalier A., Endicott A.J., Notario V., Meijer L. 2007. Meriolins, a new class of cell death–inducing kinase inhibitors with enhanced selectivity for cyclin-dependent kinases. *Cancer Research*, 67, 17: 8325-8334.

Bhakuni D.S., Rawat D.S. 2005. Bioactive marine natural products. New Delhi, Anamaya Publishers: 365 str.

Bhatnagar I., Kim S.K. 2010a. Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. *Marine Drugs*, 8, 10: 2673-2701.

Bhatnagar I., Kim S.K. 2010b. Marine antitumor drugs: Status, shortfalls and strategies. *Marine Drugs*, 8, 10: 2702-2720.

Calcul L., Longeon A., Mourabit A.A., Guyot M., Bourguet-Kondracki M.L. 2003. Novel alkaloids of the aaptamine class from an Indonesian marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Tetrahedron*, 59, 34: 6539-6544.

Carté B.K. 1996. Biomedical potencial of marine natural products. *BioScience*, 46, 4: 271-286.

Catley L., Weisberg E., Tai Y.T., Atadja P., Remiszewski S., Hideshima T., Mitsiades N., Shringarpure R., LeBlanc R., Chauhan D., Munshi N.C., Schlossman R., Richardson P., Griffin J., Anderson K.C. 2003. NVP-LAQ824 is a potent novel

histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. Blood Journal, 102, 7: 2615-2622.

CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. 2012. Madison, Promega Corporation : 14 str.

<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-nonradioactive-cell-proliferation-assay-protocol/> (19.6.2013).

Conte da Frota Junior M.L., Biegelmeyer da Silva R., Mothes B., Teresinha Henriques A., Fonseca Moreira J.C. 2012. Current status on natural products with antitumor activity from Brazilian marine sponges. Current Pharmaceutical Biotechnology, 13, 1: 235-244.

Cooksey J.C. 2001. Tyrian Purple: 6,6' -Dibromoindigo and related compounds. Molecules, 6, 9: 736-769.

Copp R.B., Fulton F.K., Perry B.N., Blunt W.J., Munro G.H.M. 1994. Natural and synthetic derivatives of discorhabdin C, a cytotoxic pigment from the New Zealand sponge *Latrunculia cf. bocagei*. Journal of Organic Chemistry, 59, 26: 8233-8238.

Coué M., Brenner L.S., Spector I., Korn D.E. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. FEBS Letters, 213, 2: 316-318.

Daikuhara N., Tada Y., Yamaki S., Charupant K., Amnuoypol S., Suwanborirux K., Saito N. 2009. Chemistry of renieramycins. Part 7: Renieramycins T and U, novel renieramycin-ecteinascidin hybrid marine natural products from Thai sponge *Xestospongia* sp. Tetrahedron, 50, 29: 4276-4278.

Davis A.R., Mangalindan C.G., Bojo P.Z., Antemano R.R., Rodriguez O.N., Concepcion P.G., Samson C.S., de Guzman D., Cruz J.L., Tasdemir D., Harper K.M., Feng X., Carter T.G., Ireland M.C. 2004. Microcionamides A and B,

- bioactive peptides from the Philippine sponge *Clathria (Thalysias) abietina*. Journal of Organic Chemistry, 69, 12: 4170-4176.
- Dellai A., Mansour H.B., Clary-Laroche A., Deghrihue M., Bouraoui A. 2012. Anticonvulsant and analgesic activities of crude extract and its fractions of the defensive secretion from the Mediterranean sponge, *Spongia officinalis*. Cancer Cell International, 12 : 15, doi:10.1186/1475-2867-12-15: 5 str.
- Delvecchio C., Tiefenbach J., Krause M.H. 2011. The zebrafish: A powerful platform for *in vivo*, HTS drug discovery. ASSAY and Drug Development Technologies, 9, 4: 354-361.
- Dembitsky M.V., Gloriozova A.T., Poroikov V.V. 2005. Novel antitumor agents: Marine sponge alkaloids, their synthetic analogs and derivatives. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 5, 3: 319-336.
- Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kalaiselvam M., Balasubramanian T., Sivakumar N. 2012. Anti-dermatophytic activity of marine sponge, *Sigmadocia carnosa* (Dendy) on clinically isolated fungi. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2, 8: 635-639.
- Dhivya D., Alekhy K., Nagajyothi C., Ashok P. 2012. Marine organism: Lead compounds and as a source of new antiviral agents. International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences, 2, 1: 10-15.
- Ebada S.S., Lin W.H., Proksh P. 2010. Bioactive sesterterpenes and triterpenes from marine sponges: Occurrence and pharmacological significance. Marine Drugs, 8, 2: 313-346.
- Edrada A.R., Proksh P., Wray V., Christ R., Witte L., Van Soest R.W.M. 1996a. Bioactive isoquinoline quinone from an undescribed Philippine marine sponge of the genus *Xestospongia*. Journal of Natural Products, 59, 10: 973-976.

Edrada A.R., Proksh P., Wray V., Witte L., Muller W.E.G., Van Soest R.W.M. 1996b.

Four new bioactive manzamine-type alkaloids from the Philippine marine sponge *Xestospongia ashmorica*. Journal of Natural Products, 59, 11: 1056-1060.

Eleršek T., Kosi G., Turk T., Pohleven F., Sepčić K. 2008. Influence of polymeric 3-alkylpyridinium salts from the marine sponge *Reniera sarai* on the growth of algae and wood decay fungi. Biofouling, 24, 2: 137-143.

El-Naggar M., Capon J.R. 2009. Discorhabdins revisited: Cytotoxic Alkaloids from Southern Australian marine sponges of the genera *Higginsia* and *Spongisorites*. Journal of Natural Products, 72, 3: 460-464.

Espiña B., Louzao M.C., Ares I.R., Cagide E., Vieytes M.R., Vega F.V., Rubiolo J.A., Milers C.O., Suzuki T., Yasumoto T., Botana L.M. 2008. Cytoskeletal toxicity of pectenotoxins in hepatic cells. British Journal of Pharmacology, 155, 6: 934-944.

Fajdiga S. 2006. Vpliv sevov iz rodov *Salmonella* in *Lactobacillus* na raven izražanja interleukina 8 in proteina topotnega stresa 70 v celicah CaCo-2. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 123 str.

Fattorusso E., Taglialatela-Scafati O. 2009. Marine antimalarials. Marine Drugs, 7, 2: 130-152.

Fusetani N., Shinoda K., Matsunaga S. 1993. Cinachyrolide A: A potent cytotoxic macrolide possessing two spiro ketals from marine sponge *Cinachyra* sp. Journal of the American Chemical Society, 115, 10: 3977-3981.

González A.M. 2007. Spongiane diterpenoids. Current Bioactive Compounds, 3, 1: 1-36.

Gordaliza M. 2010. Cytotoxic terpene quinones from marine sponges. *Marine Drugs*, 8, 12: 2849-2870.

Gunasekera S.P., Zuleta I.A., Longley R.E., Wright A.E., Pomponi S.A. 2003. Discorhabdins S, T, and U, new cytotoxic pyrroloiminoquinones from a deep-water Caribbean sponge of the genus *Batzella*. *Journal of Natural Products*, 66, 12: 1615-1617.

Hirata Y., Uemura D. 1986. Halichondrins - Antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure and Applied Chemistry*, 58, 5: 701–710.

Hu G.P., Yuan J., Sun L., She Z.G., Wu J.H., Lan X.J., Zhu X., Lin Y.C., Chen S.P. 2011. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, 9, 4: 514-525.

Jain S., Vahdat T.L. 2011. Eribulin mesylate. *Clinical Cancer Research*, 17, 21: 6615-6622.

Joseph B., Sujatha S. 2011. Pharmacologically important natural products from marine sponges. *Journal of Natural Products*, 4: 5-12.

Kelman D., Kashman Y., Rosenberg E., Ilan M., Ifrach I., Loya Y. 2001. Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedon viridis* from the Red Sea: Evidence for selective toxicity. *Aquatic Microbial Ecology*, 24, 1: 9-16.

Kim G.Y., Kim W.J., Choi Y.H. 2011. Pectenotoxin-2 from marine sponges: A potential anti-cancer agent - A Review. *Marine Drugs*, 9, 11: 2176-2187.

Konishi H., Kikuchi S., Ochiai T., Ikoma H., Kubota T., Ichikawa D., Fujiwara H., Okamoto K., Sakakura C., Sonoyama T., Kokuba Y., Sasaki H., Matsui T., Otsuji E. 2009. Latrunculin A has a strong anticancer effect in a peritoneal dissemination model of human gastric cancer in mice. *Anticancer Research*, 29, 6: 2091-2098.

Kosmina R. 2012. Biološka aktivnost v etanolnih izvlečkih izbranih antarktičnih morskih spužev (*Porifera*). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 46 str.

Kumar D., Rawat D.S. 2011. Marine natural alkaloids as anticancer agents. V: Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry. Tiwari K.V., Mishra B.B. (eds.). Kerala, Research Signpost: 213-268.

Kuramoto M., Arimoto H., Uemura D. 2004. Bioactive alkaloids from the sea: A Review. *Marine Drugs*, 2, 1: 39-54.

Kweyu P.L., Bii C., Akenga A.T., Wanjala W.C. 2008. Antimicrobial marine natural products from the sponge, *Axinella infundibuliformis*. *Records of Natural Products*, 2, 4: 116-127.

Landolfa S. 2011. Secondary metabolites from Antarctic marine invertebrates and their potential as drug leads. B.Sc. Thesis. Tampa, University of South Florida, Honors College: 27 str.

Laport M.S., Santos O.C.S., Muricy G. 2009. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 1: 86-105.

Laurent D., Jullian V., Parenty A., Knibiehler M., Dorin D., Schmitt S., Lozach O., Lebouvier N., Frostin M., Alby F., Maurel S., Doerig C., Meijer L., Sauvain M. 2006. Antimalarial potential of xestoquinone, a protein kinase inhibitor isolated from a Vanuatu marine sponge *Xestospongia* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14, 13: 4477-4482.

Leal M.C., Puga J., Serôdio J., Gomes N.C.M., Calado R. 2012. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades – Where and what are we bioprospecting? *PLoS ONE*, 7, 1: e30580, doi:10.1371/journal.pone.0030580: 15 str.

Lebar D.M., Heimbegner L.J., Baker J.B. 2007. Cold-water marine natural products. Natural Product Reports, 24, 4: 774-797.

Lee Y.K., Lee Y.H., Lee H.K. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. Journal of Microbiology, 39, 4: 254-264.

Li H., Matsunaga S., Fusetani N. 1995. Halicylindramides A–C, antifungal and cytotoxic depsipeptides from the marine sponge *Halichondria cylindrata*. Journal of Medicinal Chemistry, 38, 2: 338-343.

Li Y., Huang W., Huang S., Du J., Huang C. 2012. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay. Biochemical and Biophysical Research Communications, 422, 1: 85-90.

Lieschke G.L., Currie P.D. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. Nature Reviews-Genetics, 8, 5: 353-367.

Liskay R.M. 1977. Absence of a measurable G2 phase in two Chinese hamster cell lines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 4: 1622-1625.

Lozzio C.B., Lozzio B.B. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood Journal, 45, 3: 321-334.

Mandrekar N., Thakur L.N. 2009. Significance of the zebrafish model in the discovery of bioactive molecules from nature. Biotechnology Letters, 31, 2: 171-179.

Marinho R.P., Muricy G.R.S., Silva M.F.L., deMarval M.G., Laport S.M. 2008. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 20, 2: 267-275.

Martins Antunes E. 2003. Pyrroloiminoquinone metabolites from South African Latrunculid sponges. PhD Thesis. Grahamstown, Rhodes University: 189 str.

Mayer M.S.A. 1999. Marine pharmacology in 1998: Antitumor and cytotoxic compounds. *Pharmacologist*, 41, 4: 159-164.

Mayer M.S.A., Glaser B.K., Cuevas C., Jacobs S.R., Kem W., Little R.D., McIntosh J.M., Newman J.D., Potts C.B., Shuster E.D. 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: A current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31, 6: 255-265.

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

Moon B., Baker J.B., McClintock B.J. 1998. Purine and nucleoside metabolites from the Antarctic sponge *Isodictya erinacea*. *Journal of Natural Products*, 61, 1: 116-118.

Murti Y., Agrawal T. 2010. Marine derived pharmaceuticals – Development of natural health products from marine biodiversity. *International Journal of ChemTech Research*, 2, 4 : 2198-2217.

Nagle G.D., Zhou Y.D. 2009. Marine natural products as inhibitors of hypoxic signaling in tumors. *Phytochemistry Reviews*, 8, 2: 415-429.

Nakamura M., Kakuda T., Qi J., Hirata M., Shintani T., Yoshioka Y., Okamoto T., Oba Y., Nakamura H., Ojika M. 2005. Novel relationship between the antifungal activity and citotoxicity of marine-derived metabolite xestoquinone and its family. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69, 9: 1749-1752.

Newbold R.W., Jensen P.R., Fenical W., Pawlik J.R. 1999. Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 3: 79-284.

Orhan I., Şener B., Kaiser M., Brun R., Tasdemir D. 2010. Inhibitory activity of marine sponge-derived natural products against parasitic Protozoa. *Marine Drugs*, 8, 1: 47-58.

Park Y.C. 2004. Chemical investigation of three Antarctic marine sponges. PhD Thesis. University of South Florida, College of Arts and Sciences, Department of Chemistry: 119 str.

Pedpradab P., Molex W., Nukoolkarn V., Darumas U. 2010. Biological activities of extracts from Andaman Sea sponges, Thailand. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4, 8: 63-69.

Perry B.N., Blunt W.J., Munro G.H.M. 1988. Discorhabdin D, an antitumor alkaloid from the sponges *Letrunculia brevis* and *Prienos* sp. *Journal of Organic Chemistry*, 53, 17: 4127-4128.

Peterson R.J., Mitchison J.T. 2002. Small molecules, big impact: A history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chemistry & Biology*, 9, 12: 1275-1285.

Pettit G.R., Herald C.L., Boyd M.R., Leet J.E., Dufresne C., Doubek D.L., Schmidt J.M., Cerny R.L., Hooper J.N., Rützler K.C. 1991. Antineoplastic agents. 219. Isolation and structure of the cell growth inhibitory constituents from the western Pacific marine sponge *Axinella* sp. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 11: 3339-3340.

Purushottama G.B., Venkateshvaran K., Pani Prasad K., Nalini P. 2009. Bioactivities of extracts from the marine sponge *Halichondria panicea*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15, 3: 444-459.

Putz A. 2009. Secondary metabolites from marine sponges, with focus on the chemical ecology and biochemical characterisation of the stress-induced biotransformation of *Aplysina* alkaloids. PhD Thesis. Düsseldorf,

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: 231 str.

Rabelo L., Montiero N., Serquiz R., Santos P., Oliveira R., Oliveira A., Rocha H., Morais H.A., Uchoa A., Santos E. 2012. A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. *Marine Drugs*, 10, 4: 727-743.

Rajh M. 2012. Biološko aktivne snovi v vodnih ekstraktih antarktičnih morskih sružev. Poročilo o individualnem raziskovalnem projektu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 25 str.

Raveendran T.V., Limna Mol V.P. 2009. Natural product antifoulants. *Current Science*, 97, 4: 508-520.

Ravichandran S., Kathiresan K., Balaram H. 2007. Anti-malarials from marine sponges. *Biotechnology and Molecular Biology Review – Academic Journals*, 2, 2 : 33-38.

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

Rubinstein A.L. 2006. Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2, 2: 231-240.

Sabdono A., Radjasa O.K. 2008. Microbial symbionts in marine sponges: Marine natural product factory. *Journal of Coastal Development*, 11, 2: 57-61.

Sagar S., Kaur M., Minneman P.K. 2010. Antiviral lead compounds from marine sponges. *Marine Drugs*, 8, 10: 2619-638.

Salati N.A., Ahmad S.S., Khwaja J.K. 2013. Assessment of cytotoxicity in chemotherapeutic drugs—By *in vitro* methods. Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 5, 5: 73-76.

Selvin J., Lipton A.P. 2004. Biopotentials of secondary metabolites isolated from marine sponges. Hydrobiologia - The International Journal of Aquatic Sciences, 513, 1-3: 231-238.

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

Sima P., Vetvicka V. 2011. Bioactive substances with anti-neoplastic efficacy from marine invertebrates: Porifera and Coelenterata. World Journal of Clinical Oncology, 2, 11: 355-361.

Simi S., Xiao Y., Campagna M., Doehmer J., Darroudi F. 1999. Dual-colour FISH analysis to characterize a marker chromosome in cytochrome P450 2B1 recombinant V79 Chinese hamster cells. Mutagenesis, 14, 1: 57-61.

Simmons T.L., Adrianasolo E., McPhail K., Flatt P., Gerwick H.W. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. Molecular Cancer Therapeutics, 4, 2: 333-42.

Sipkema D., Franssen M. C. R., Osinga R., Tramper J., Wijffels R. H. 2005. Marine sponges as pharmacy. Marine Biotechnology, 7, 3: 142-62.

Taboada S., García-Fernández L.F., Bueno S., Vazquez J., Cuevas C., Avila C. 2010. Antitumoural activity in Antarctic and sub-Antarctic benthic organisms. Antarctic Science, 22, 5: 494-507.

Thomas T.R.A., Kavlekar D.P., LokaBharathi P.A. 2010. Marine drugs from sponge-microbe association - A Review. Marine Drugs, 8, 4: 1417-1468.

Timm C., Mordhorst T., Köck M. 2010. Synthesis of 3-alkyl pyridinium alkaloids from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. Marine Drugs, 8, 3: 483-497.

Tohme R., Darwiche N., Gali-Muhtasib H. 2011. A journey under the sea: The quest for marine anti-cancer alkaloids. Molecules, 16, 11: 9665-9696.

Turk T., Ambrožič Avguštin J., Batista U., Strugar G., Kosmina R., Čivović S., Janussen D., Kauferstein S., Mebs D., Sepčić K. 2013. Biological Activities of Ethanolic Extracts from Deep-Sea Antarctic Marine Sponges. Marine Drugs, 11, 4: 1126-1139.

Turk T., Richter M., Kružić P. 2011. Pod površinom Mediterana. Zagreb, Školska knjiga: 590 str.

Van Minh C., Van Kiem P., Hai Dang N. 2005. Marine natural products and their potential application in the future. Asean Journal on Science and Technology for Development, 22, 4 : 297-311.

Varoglu M. 1996. Investigations of natural products from sponges and sponge associated marine fungi. PhD Thesis. Santa Cruz, California Sea Grant College Program, University of California: 297 str.

Wada Y., Fujioka H., Kita Y. 2010. Synthesis of the marine pyrroloiminoquinone alkaloids, discorhabdins. Marine Drugs, 8, 4: 1394-1416.

Williams E.D., Lassota P., Andersen J.R. 1998. Motuporamines A-C, cytotoxic alkaloids isolated from the marine sponge *Xestospongia exigua* (Kirkpatrick). Journal of Organic Chemistry, 63, 14: 4838-4841.

Woo J.K., Jeon J., Kim C.K., Sim C.J., Oh D.C., Oh K.B., Shin J. 2013. Gombamide A, a cyclic thiopeptide from the sponge *Clathria gombawuiensis*. Journal of Natural Products, 76, 7: 1380-1383.

Ye B., Xie Y., Qin Z.H., Wu J.C., Han R., He J.K. 2011. Anti-tumor activity of CrTX in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32, 11: 1397-1401.

Zhang H.J, Sun J.B., Lin H.W., Wang Z.L., Tang H., Cheng P., Chen W.S., Yi Y.H. A. 2007. New cytotoxic cholesterol sulfate from marine sponge *Halichondria rugosa*. *Natural Product Research*, 21, 11: 953-958.

ZAHVALA

Najprej bi se želela zahvaliti prof.dr. Kristini Sepčić za neizmerno prijaznost, podporo in pomoč pri nastajanju moje magistrske naloge. S svojim »materinskim« in pozitivnim pristopom vsakemu pomoči potrebnemu študentu pomaga prebroditi tudi najbolj zahtevna študijska obdobja. Kristina, hvala za vse!

Na podoben način se želim zahvaliti tudi prof.dr. Urški Batista, ki me je vseskozi vodila in usmerjala z veliko mero potrežljivosti. Hvala za vso pomoč v laboratoriju in za vaše »ostro oko«, s katerim ste ujela vsako napako v mojem pisnem izdelku. Hvala še za prijazen in topel odnos, ki mi je polepšal dneve, preživete v laboratoriju.

Svojemu mentorju, prof.dr. Tomu Turku se zahvaljujem za priložnost za opravljanje tega magistrskega dela. Profesorju Turku se zahvaljujem tudi za kvalitetna in zelo zabavna predavanja iz Biokemije in Molekularne biokemije, ki mi bodo še dolga leta ostala v spominu.

Vsestranskemu dr. Juriju Hadalinu se zahvaljujem za nesebično pomoč pri odpravljanju številnih slovničnih in oblikovnih napak...ne le pri magistrski nalogi, temveč tudi pri vseh seminarjih in poročilih.

Svoji družini se zahvaljujem za finančno in moralno podporo, brez katere bi najverjetneje končala kot slabo plačana medicinska sestra. Zato svoje magistrsko delo posvečam svojim staršem, ki so me s požrtvovalnostjo in brezpogojno ljubeznijo uspešno pripeljali do zastavljenega cilja.

PRILOGE

Priloga A: Iz literature zbrani podatki o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v organskih izvlečkih iz morskih spužev (Kosmina, 2012).

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Microcionidae</i>	Euripamidi A in B	Ciklični peptidi	Ni podatka	Zavirajo kopičenje lipidnih kapljic v makrofagih	Ito in sod., 2004
<i>Latrunculia</i>	Kalipeltini A - C	Aciklični peptidi	Etanol	Protiglivična in anti-HIV aktivnost, zaviralec $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ izmenjevalca, pozitiven inotropni agent v levem atriju morskega prašička, citotoksičnost proti KB celicam	Zampella in sod., 2002
	Kalipeltini F - I	Aciklični peptidi	Metanol	Protiglivično delovanje proti glivi <i>Candida albicans</i>	Sepe in sod., 2006
	Kalipeltini J - M	Aciklični peptidi	Metanol	Protiglivično delovanje proti <i>C. albicans</i> in citotoksična aktivnost proti L16 celicam	D'Auria in sod., 2007
	Diskorabdin A	Policiklični alkaloidi	Etanol	Močan citotoksin proti tumorskim celicam, zavira karcinome mišjih Erlich celic	Makareva in sod, 2010
	Diskorabdin B	Policiklični alkaloidi	Ni podatka	Močno citotoksičen in protimikroben	Perry in sod., 1988

	Diskorabdin C, E	Piroloiminokinoninski alkaloidi	Metanol	Citotoksičnost proti celicam opičjih ledvic in P388 mišjih levkemičnih celic. Antimikrobnno delovanje proti Gram + in Gram - bakterijam in glivam	Copp in sod., 1994
	Diskorabdin W, D	Piroloiminokinoninski alkaloidi	Metanol/ Diklorometan (1:1)	Delovanje proti mišjim levkemičnim celicam. Protimikrobn in protitumorsko delovanje	Lang in sod., 2005
	Diskorabdin I, L	Piroloiminokinoninski alkaloidi	2-propanol	Citotoksičnost proti tumorskim celičnim linijam.	Reyes in sod., 2004
	Diskorabdin R	Piroloiminokinoninski alkaloidi	Etanol	Protibakterijsko delovanje	Ford in sod., 2000
	Latrunkulinosid A - B	Dekalaktonski glikozidi	Butanol	Inhibicija prehranjevanja zlatih ribic	Rezanka in sod., 2003
	Latrunkuleična kislina	Poliketid makrocikličnega in triazolidnega obroča	Metanol	Potencialni terapevtik, molekularne sonde v raziskavah citoskeleta	Vilozny in sod., 2004
	Oksalatrunkulin B	Heterocikel s triazolidnim obročem	Metanol/ Diklorometan	Inhibicija aktina, delovanje proti glivam in proti raku	Ahmed in sod., 2007
	Latrunkulin A	Ketidne aminokisline	Ni podatka	Zavira tumorske celice prostate, aktivacija celic raka prsi	El Sayed in sod., 2008

	Latrunkulin A in B	Ketidne aminokisline	Petrolejski eter	Učinki na celične linije mišjih nevroblastov in fibroblastov, povzročijo reorganizacijo mikrofilamentov v celicah	Kashman in sod., 1980
	(+)-latrunkulin A (+)-latrunkulin B Latrunkulina C in M	Ketidne aminokisline	Ni podatka	Povzroči reverzibilne spremembe v morfologiji celic, ogrozi organizacijo mikrofilamenov, in zavira posredovanje mikrofilamentov med celično delitvijo	Smith in sod., 1992
	(+)-latrunkulin A (1) (+)-1Bepilatrunkulin A	Ketidne aminokisline, knjugirani dieni	Ni podatka	Močan zaviralec mikrofilamentov med celično delitvijo	White in sod., 1992
	Citaroksazol	Aromatični alkaloid	Etanol	Citotoksično delovanje	Genta - Jouve in sod., 2011

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

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

	Renieramicin M Renieramicin G Renieramicin N	Alkaloidi - Izokinolinski kinoni	Metanol	Kažejo močno citotoksičnost in protitumorsko aktivnost	Suwanborirux in sod., 2003
	Renieramicin O - S	Alkaloidi - Izokinolinski kinoni	Etil acetat	Citotoksičnost, protitumorske spojine	Amnuopol in sod., 2004
	Hacijodini A - G	Alkaloidi – 3- Alkilpiridinski Alkaloidi	Metanol	Citotoksični proti celicam mišje levkemije	Tsukamoto in sod., 2000
	Ciklosteletamin A Ciklosteletamin G Dehidro- ciklosteletamin D	Alkaloidi – 3- Alkilpiridinski Alkaloidi	Etanol	Zavirajo človeške levkemične celice	Oku in sod., 2004
	Haliciklamin B	Alkaloidi – 3- Alkilpiridinski Alkaloidi	Metanol	Protimikrobnna aktivnost, selektivna citotoksičnost proti tumorskim celicam	Harrison in sod., 1996
	Ksestomanzamin A, B, X	Alkaloidi – □- Karbolinski Alkaloidi	Aceton	Citotoksičnost proti KB celicam	Kobayashi in sod., 1995

	Manzamin A, Manzamin J, 3,4-Dihidromanzamin A 6-Deoksimanzamin X Manzamin A N-oksid Manzamin J N-oksid 3,4-Dihidromanzamin A N-oksid	Alkaloidi – □-Karbolinski Alkaloidi	Aceton in Metanol	Insekticidna aktivnost, delujejo proti Gram + bakterijam, citotoksičnost	Edrada in sod., 1996
	(+)-3b,3'b-Dimetilkestospongin (+)-(7S)-Hidroksikkestospongin A	Alkaloidi – Makrolitični Kinolizidini	Metanol	Protigliivično delovanje proti glivi <i>Candida</i> spp.	Moon in sod., 2002
	(+)-Araguspongin K, L	Alkaloidi – Makrolitični Kinolizidini	Etanol	Protimalarična in protituberkulozna aktivnost	Orabi in sod., 2002

	Ksestosin A	Alkaloidi – Makrolitični Kinolizidini	Metanol	Vazodilatorna in ihtiotskična aktivnost	Iwagawa in sod., 2000
	Motuporamin A- I	Alkaloidi	Metanol	Zavira celično gibanje, citotoksična aktivnost	Williams in sod., 2002
	Aaptamin	Alkaloidi	Metanol	Citotoksičnost proti KB celicam	Calcul in sod., 2003
	Izoaaptamin				
	Demetil(oksi)aaptamin				
	Dimetilketal aaptamin				
	Benzo[de][1,6]naptirid in derivat A - derivat D				
	Ampimedin	Alkaloidi	Metanol in Metanol/ Kloroform	Citotoksičnost proti različnim vrstam tumorjev	Tasdemir in sod., 2001
	Neoampimedin				
	Deoksiampimedin				

	Halenakinon	Kinoni	Ni podatka	Kardiotonična aktivnost	Roll in sod., 1983
	Halenakinol	Kinoni	Ni podatka	Kardiotonične aktivnosti	Kobayashi in sod., 1985
	Halenakinol sulfat				
	Ksestokinon	Kinoni	Metanol– Diklorometan	Inhibicija cdc25b fosfataze	Cao in sod., 2005

	Adociakinon A - B Sekoadociakinon A -B 14- Metoksiksestokinon 15- Metoksiksestokinon 15-Kloro-14- hidroksiksestokinon 14-Kloro-15- hidroksiksestokinon 41	Kinoni	Metanol	Citotoksične aktivnosti, poskusi <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> kažejo na protitumorsko aktivnost pri živalih, citotoksičnost proti človeškem tumorju debelega črevesa	Concepcion in sod., 1995
	3-Ketoadociakinon A - B 13-O-Metilksestokinol sulfat	Kinoni	Ni podatka	Strupeni v človeških tumorskih celicah debelega črevesa, citotoksična aktivnost	Cao in sod., 2005

	Ksestosapol C	Kinoni	Metanol	Inhibitor virusa HIV	Kubota in sod., 2008
	Ksestovanin A	Terpenoidi	Metanol	Protiglivično delovanje proti <i>Pythium ultimum</i>	Northcote in sod. 1989
	Sekoksestovanin A				
	Klionasterol	Steroli, konvencionalni steroli	Ni podatka	Inhibitor CP celic	Cerqueira in sod., 2003
	Ksestokerol A- B	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Protimikrobrovo delovanje proti bakterijam	Kobayashi in sod., 1993
	Aragusterol A	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Močan protitumorski sterol	Iguchi in sod. 1993
	Aragusterol B	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Antiproliferativna aktivnosti proti KB celicam <i>in vitro</i> (aragusterol d nima tega učinka)	Iguchi in sod. 1993
	Aragusterol D (Ksestokerol C)				
	Aragusterol C	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Protitumorska aktivnost	Shimura in sod., 1994
	Haplosamat A - B	Steroli – Polihidroksi steroli	Metanol	Inhibicija HIV-1 integraze	Qureshi in sod., 1999

	Ksestobergsterol A - B	Steroli – Polihidroksi steroli	Ni podatka	Zavira sproščanje histamina iz podganjih celic, citotoksičnost proti celicam l-1210 mišje levkemije	Shoji in sod., 1992
	Ibisterol sulfat B -C (22S)-4b,5b-Epoksi-2b,3a,12b,22-tetrahidroksi-14a-metilholesta-7,9(11)-diene-6,24-dion	Steroli – Polihidroksi steroli	Metanol	Inhibicija HIV-1 integraze	Lerch in sod., 2001
	5a,8a-Epidioksi-24a-etilholest-6-en-3b-ol	Drugi steroli	Ni podatka	Inhibitor CP celic	Cerqueira in sod., 2003
	Ksestosterol (9E,17E)-18-bromoocatadeca-9,17-diene-7,15-dinoat Ksestosterol (9E,17E)-18-bromooktadeka-9,17-dien-5,7,15-trinoat	Drugi steroli	Diklorometan	Inhibicija vezave ligandov na možanske podganje A1 receptorje	Pham in sod., 1999
	Ksestspongienol A – L	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Metanol	Protiglični in protimikrobní učinki, zaviranje HIV-1 integraze, citotoksičnost	Liu in sod., 2011

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

	<p>Metil (7E,13E,17E)-18-bromooktadeka-7,13,17-trien-5,15-dinoat</p> <p>(9E,17E)-18-Bromoooktadeka-9,17-dien-5,7,15-trinoična kislina</p> <p>(9E,15E)-16-Bromoheksadeka-9,15-dien-5,7-dinoična kislina</p>	<p>Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline</p>	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	<p>Metil (9E,15E)-16-bromoheksadeka-9,15-dien-5,7-dinoat</p> <p>(9E,17E)-18-Bromoooktadeka-9,17-dien-5,7-dinoična kislina</p> <p>Metil (9E,17E)-18-bromoooktadeka-9,17-dien-5,7-dinoat</p>	<p>Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline</p>	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992

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