

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA LORBEK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA LORBEK

**VPLIV IZVLEČKA LESA BELE JELKE (*Abies alba*) NA RAST ČLOVEŠKIH
RAKAVIH CELIČNIH LINIJ *IN VITRO***

**THE INFLUENCE OF SILVER FIR (*Abies alba*) WOOD EXTRACT ON *IN VITRO*
GROWTH OF HUMAN CANCER CELL LINES**

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa.

Zahvala

Zahvaljujem izr. prof. dr. Matjažu Jerasu za mentorstvo ter prizadevanje, da bi bila moja naloga kar najbolj strokovno ter čitljivo napisana. Resnično sem hvaležna za priložnost sodelovanja z njim, njegovo pomoč, odzivnost ter izredno korektnost, ki sem je bila deležna. Brez temeljitega strokovnega pregleda in človeškega pristopa k mentorstvu naloga ne bi bila tako kakovostna, delo pa ne tako prijetno.

Zahvaljujem se svoji mami za podporo in vero vame. S svojo skrbjo zame, si prihranila marsikatero uro, ki sem jo zato lahko vložila v študij. Upam, da ti bom kdaj lahko vrnila toliko srčnosti in ljubezni, kot sem je prejela od tebe in bom nekoč tudi jaz s ponosom prebirala podobne vrstice v diplomskeih nalogah svojih otrok. Imela si težko delo in odlično si ga opravila, bravo mami!

Zahvaljujem se Ivanu za podporo in pomoč v življenjskih situacijah, ko je moje znanje odpovedalo. Nate se lahko vedno zanesem, saj vselej priskočiš na pomoč, ko te najbolj potrebujem.

Matevž, tebi sem hvaležna, ker si me vseskozi spodbujal, me razvajal, me sem ter tja pohvalil rekoč, da sem pridna, in me na nedeljska jutra bodril s svojimi šalami ter pametnimi odgovori na še tako težka vprašanja. Vlivaš mi upanje in pozitiven pogled na izzive v življenju, zato s tabo ni nobena gora previsoka zame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa.

Sara Lorbek

VSEBINSKO KAZALO

VSEBINSKO KAZALO	IV
Kazalo slik.....	V
Kazalo preglednic.....	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 Izvleček lesa bele jelke: sestava in lastnosti.....	1
1.2 Dokazani učinki izvlečka lesa bele jelke.....	2
1.2.1 Protektivno kardiovaskularno delovanje	3
1.2.2 Vpliv na aterosklerozo	3
1.2.3 Vpliv na diabetes.....	3
1.2.4 Vplivi na rast rakavih celic in potek rakave bolezni	4
2 NAMEN DELA	5
3 MATERIALI IN METODE	6
3.1 Materiali, reagenti in aparati	6
3.2 Metode.....	8
3.2.1 Priprava osnovnih sterilnih raztopin izvlečka lesa bele jelke.....	8
3.2.2 Priprava gojitvenih medijev in delovnih raztopin za ugotavljanje vplivov izvlečka lesa bele jelke na rast celic LNCaP, HepG2 in Jurkat	9
3.2.3 Določanje obsega proliferacije človeških rakavih celičnih linij in vitro v prisotnosti različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke	11
3.2.4 Ugotavljanje citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS	18
3.2.5 Statistične analize in grafična predstavitev rezultatov	24
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	25
4.1 Določanje obsega proliferacije človeških rakavih celičnih linij in vitro v prisotnosti različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke	25
4.1.1 Določanje obsega proliferacije celic LNCaP v prisotnosti različnih redčitev treh osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke v H ₂ O, DPBS in DMSO.....	25
4.1.2 Natančnejše ugotavljanje vplivov različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS (B _{DPBS}), na rast celične linije LNCaP	28
4.1.3 Ugotavljanje vplivov različnih redčitev osnovne raztopine B _{DPBS} , na rast celične linije LNCaP, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol.....	29
4.1.4 Mikroskopska detekcija morfoloških sprememb in obsega rasti celic LNCaP, gojenih ur v prisotnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka B _{DPBS}	30
4.1.5 Ugotavljanje vplivov različnih redčitev osnovne raztopine B _{DPBS} , na rast celične linije HepG2, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol	32

4.1.6 Ugotavljanje vplivov različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} , na rast celične linije Jurkat, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol	33
4.2 Ugotavljanje citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS}	35
4.2.1 Poskusno ugotavljanje obsega citotoksičnega delovanja različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} na celice LNCaP, z uporabo tripanskega modrila	35
4.2.2 Pilotno ugotavljanje obsega takojšnje citotoksičnosti (po 6 urah) različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} na celice LNCaP, s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay	37
4.2.3 Ugotavljanje obsega zgodnje citotoksičnosti (po 24 urah) redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} na celice LNCaP, s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay	38
4.2.4 Ugotavljanje obsega takojšnje (po 6 urah) in zgodnje citotoksičnosti (po 24 urah) različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} na celice HepG2, s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay	39
4.2.5 Ugotavljanje obsega takojšnje (po 6 urah) in zgodnje citotoksičnosti (po 24 urah) različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} na celice Jurkat, s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay	40
5 SKLEP.....	42
6 LITERATURA.....	43

Kazalo slik

Slika 1: Kromatogram izvlečka lesa bele jelke.....	2
Slika 2: Proliferacija celic LNCaP (2×10^3 /kulturo) po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji z različnimi redčitvami (v/v) treh osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke	26
Slika 3: Proliferacija celic LNCaP (2×10^3 /kulturo) po 48-urni inkubaciji s šestimi različnimi redčitvami (v/v) treh osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke različnih koncentracij.....	27
Slika 4: Obsegji proliferacije (A) in odstotki inhibicije rasti (B) celic LNCaP (2×10^3 /kulturo) po njihovi 72-urni inkubaciji z izbranimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS}	28
Slika 5: Obsegji proliferacije celic LNCaP po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji z različnimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol.....	29
Slika 6: Prikaz odstotkov inhibicije rasti celic LNCaP po 72 urah inkubacije z izbranimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol.....	30
Slika 7: Mikrofotografije celičnih kultur celic LNCaP, gojenih 72 ur v odsotnosti (0%) in prisotnosti izbranih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS}	32
Slika 8: Obsegji proliferacije celic HepG2 po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji z različnimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol.....	33
Slika 9: Prikaz odstotkov inhibicije rasti celic HepG2 po 72 urah inkubacije z izbranimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol.....	34
Slika 10: Obsegji proliferacije celic Jurkat po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji z različnimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol.....	34

Slika 11: Prikaz odstotkov inhibicije rasti celic Jurkat po 72 urah inkubacije z izbranimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B _{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol.....	36
Slika 12: Mikrofotografije kultur celic LNCaP po 72 urah inkubacije brez (0%) ali z različnimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke B _{DPBS} , obarvanih s tripanskim modrilom.....	37
Slika 13: Prikaz odstotkov relativne citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka B _{DPBS} na celicah LNCaP, po 6-urni inkubaciji	38
Slika 14: Prikaza odstotkov relativne citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B _{DPBS} , na celice LNCaP, po 24 urah inkubacije	38
Slika 15: Prikaza odstotkov relativne citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B _{DPBS} , na celice LNCaP, po 6 (A) in 24 urah (B) inkubacije.....	40

Kazalo preglednic

Preglednica I: Prikaz polifenolnih spojin, ki jih vsebuje izvleček lesa bele jelke; povzeto po (1)...	1
Preglednica II: Seznam uporabljenih materialov in aparatur.	6
Preglednica III: Primer delovnega načrta za pripravo redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v H ₂ O in ustreznih kontrol, ki je enak kot v primeru redčenja osnovnih raztopin v DMSO in DPBS	10
Preglednica IV: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim primerom delovnega načrta za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije	13
Preglednica V: Načrt priprave redčitev osnovne raztopine B _{DPBS} in ustreznih kontrol	14
Preglednica VI: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije	15
Preglednica VII: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije	16
Preglednica VIII: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije	17
Preglednica IX: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije	18
Preglednica X: Shema mikrotitrsko plošče z 48 vdolbinami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 72-urno inkubacijo.....	19
Preglednica XI: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 6,5-urno inkubacijo	20
Preglednica XII: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 24-urno inkubacijo	21
Preglednica XIII: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 6-urno / 24-urno inkubacijo	22
Preglednica XIV: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 6-urno oz. 24-urno inkubacijo.....	24

POVZETEK

Izvleček lesa bele jelke (*Abies alba*) vsebuje številne polifenole in je v dosedanjih študijah izkazal nekatere pozitivne farmakološke učinke. Med pomembnejše spadajo njegovi ugodni vplivi na pogoste bolezni sodobnega časa, diabetes, kardiovaskularna in rakava obolenja. Kljub temu pa je bilo doslej opravljenih razmeroma malo raziskav na temo delovanja ter potencialne uporabe izvlečka lesa bele jelke v farmacevtske namene. Z ozirom na spodbudne rezultate preteklih študij smo se odločili preskusiti njegove vplive na rast človeških celičnih linij, in sicer raka prostate LNCaP, jetrnega raka HepG2 ter akutne T-celične levkemije Jurkat, v pogojih *in vitro*. Obseg njihove rasti v prisotnosti in odsotnosti različnih koncentracij izvlečka smo določali spektrofotometrično. Ugotovili smo, da raztopina izvlečka v fosfatni pufrski raztopini (PBS) v koncentacijskem razponu od 3,63 mg/mL do 0,23 mg/mL, znatno zavira proliferacijo vseh treh vrst celic. Pri tem je bil zaviralni učinek na proliferacijo celic LNCaP in HepG2 sorazmeren uporabljenim koncentracijam raztopine izvlečka lesa bele jelke, v primeru celic Jurkat pa je bilo zaviranje rasti zelo intenzivno v celotnem koncentracijskem območju. Določili smo tudi obsege citotkosičnega delovanja preskušanih raztopin izvlečka na vsako izmed celičnih linij. Ugotovili smo, da je bila citotkosičnost izvlečka odvisna tudi od vrste uporabljene celične linije. Tako so na celice LNCaP in Jurkat višje koncentracije izvlečka delovale citotoksično, na celice HepG2 pa ne. V okviru magistrske naloge smo torej dokazali pomemben zaviralni vpliv raztopine izvlečka lesa bele jelke na rast treh človeških rakavih celičnih linij *in vitro*, s čimer smo pridobili novo, koristno znanje o njegovem delovanju.

Ključne besede: izvleček lesa bele jelke, celična linija LNCaP, celična linija HepG2, celična linija Jurkat, proliferacija, citotkosičnost

ABSTRACT

Silver fir (*Abies alba*) bark extract contains many polyphenols and has shown some positive pharmacological effects in previous studies. The most important ones are its beneficial activities on common modern time disorders like: diabetes, cardiovascular and cancerous diseases. Nevertheless, to date, relatively little research has been carried out regarding the mechanisms of action and the potential use of silver fir wood/bark extract for pharmaceutical purposes. In view of encouraging results of past studies, we decided to test its effects *in vitro* on the growth of human cancer cell lines, namely, LNCaP (prostate cancer), HepG2 (liver cancer), and Jurkat (acute T-cell leukemia). The extent of their growth in the presence and absence of different concentrations of the extract was defined spectrophotometrically. We found that the extract dissolved in the phosphate buffer (PBS) significantly inhibited proliferation of all three cell lines in the concentration range from 3,63 mg/mL to 0,23 mg/mL. In this regard, the inhibitory effect on the proliferation of LNCaP and HepG2 cells was proportional to the used concentrations of the extract solution, while in case of Jurkat cells, it was very intense throughout the applied concentration range. We have also determined the extent of cytotoxic activity of silver fir wood/bark extract dilutions on each of the three cell lines. Additionally, we found that the cytotoxicity of the extract depended on the cell type used. Thus, higher concentrations were cytotoxic to LNCaP and Jurkat cells, whereas no cytotoxicity could be detected on HepG2 cells. To conclude, we showed an important inhibitory effect of the silver fir wood/bark extract solution on the growth of three human cancer cell lines *in vitro*, thus gaining new, useful knowledge regarding its biological activity.

Keywords: silver fir bark extract, LNCaP cell line, HepG2 cell line, Jurkat cell line, cell proliferation, cytotoxicity

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

B_{DMSO} = raztopina izvlečka bele jelke v DMSO

B_{DPBS} = raztopina izvlečka bele jelke v DPBS

B_{voda} = raztopina izvlečka bele jelke v vodi

CCK-8 = barvilo/substrat za določanje proliferacije celic (ang. Cell Counting Kit-8),

DMSO = dimetil sulfoksid

DPBS = uravnotežena fosfatna pufrska raztopina soli, ki ne vsebuje kacijevih in magnezijevih ionov (ang. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

EGF = epidermalni rastni dejavnik (ang. Epidermal Growth Factor)

FBS = fetalni goveji serum (ang. Fetal Bovine Serum)

HepG2 = Human hepatoma cells / celice človeškega hepatocelularnega karcinoma

LDH = laktatna dehidrogenaza

LNCaP = celična linija človeškega raka prostate (ang. Lymph Node Carcroma of the Prostate)

m/v (%) = masno volumski odstotek

PFA = paraformaldehid

Rpm = število obratov na minuto (ang. Revolutions per minute)

TGF- α = transformirajoči rastni dejavnik- α (ang. Transforming Growth Factor- α)

v/v (%) = volumsko volumski odstotek

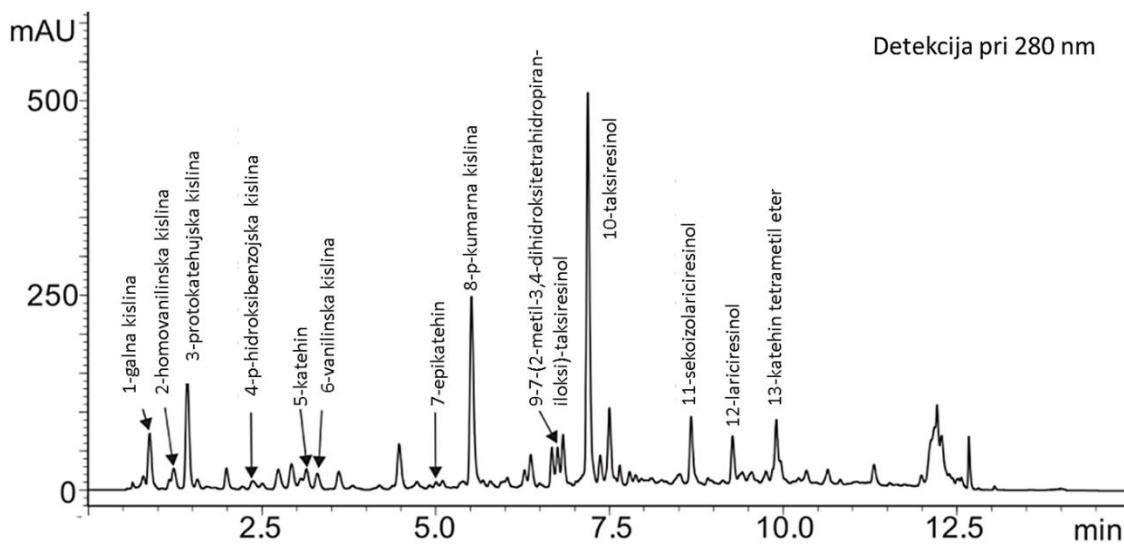
1 UVOD

1.1 Izvleček lesa bele jelke: sestava in lastnosti

Znano je, da izvlečki lesa različnih dreves vsebujejo raznovrstne polifenolne spojine in izkazujejo zanimive farmakološke učinke. Med njimi je zelo dobro raziskan izvleček obmorskega bora (*Pinus maritima*), znan pod tržnim imenom Pycnogenol®. Njegova uporaba je močno razširjena v kozmetičnih izdelkih ter prehranskih dodatkih, njegovo farmakološko delovanje pa pripisujejo mešanici flavonoidov, med njimi v največji meri procianidinom in fenolnim kislinam. Številne koristne biološke učinke pripisujejo tudi izvlečkom lesa bele jelke (*Abies alba*), ki spada med bolj zastopane drevesne vrste v Srednji Evropi. Izvleček njenega lesa je znan pod trgovskima imenoma Abigenol® in Belinal®. Leta 2013 je raziskovalka Tavčar Benković s sodelavci z uporabo analitskih laboratorijskih tehnik določila sestavo izvlečka lesa bele jelke. Pri tem so se avtorji študije osredotočili na analizo vsebnosti različnih polifenolov, ki imajo številne dokazane pozitivne farmakološke učinke (1). Polifenoli rastlinskega izvora so velika skupina spojin, ki jih glede na njihove strukture delimo na: fenolne kisline, flavonoide, stilbene, lignane, tanine, idr. (2). Ugotovili so, da vsebuje izvleček lesa bele jelke 6 fenolnih kislin, 3 flavonoide in 4 lignane. Posamezne spojine so predstavljene v Preglednici I., kromatogram izvlečka, na katerem je označenih vseh trinajst identificiranih spojin, pa je prikazan na Sliki 1 (1).

Preglednica I: Prikaz polifenolnih spojin, ki jih vsebuje izvleček lesa bele jelke; povzeto po (1).

Vrste polifenolov	Identificirane spojine
Fenolne kisline	galna, homovanilinska, protokatehujska, p-hidroksibenzojska, vanilinska in p-kumarna kislina
Flavonoidi	katehin, epikatehin in catechin tetrametil eter
Lignani	taksiresinol, 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidropiran-iloksi)-taksiresinol, sekoizolariciresinol in laricresinol



Slika 1: Kromatogram izvlečka lesa bele jelke. Označenih je 13 identificiralnih spojin; prirejeno po (1).

Polifenoli učinkujejo antioksidativno preko več različnih mehanizmov. V prvi vrsti so učinkoviti lovilci prostih radikalov, poleg tega pa tudi učinkovito kelirajo železove (II) ione (Fe^{++}). Slednji vstopajo v Fentonovo reakcijo, v kateri nastaja najreaktivnejši in najnevarnejši hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) (3). Poleg vstopanja v neposredne oksidativne reakcije, polifenoli znižujejo oksidativni stres v celičah tudi tako, da interagirajo s pomembnimi celičnimi receptorji, vplivajo na celične signalne poti in encime, ki sodelujejo pri tvorbi reaktivnih kisikovih zvrsti (npr. ksantinske oksidaze, ciklooksigenaze, lipoksgenaze, mikrosomske monoooksigenaze in oksidaze NADH) (4). Izvleček lesa bele jelke je torej bogat vir naravnih antioksidantov. Poleg znanih antioksidativnih lastnosti posameznih spojin, je tudi njihova kombinacija v izvlečku močan antioksidant, kar predstavlja njegovo potencialno uporabnost (1).

1.2 Dokazani učinki izvlečka lesa bele jelke

Izvleček lesa bele jelke je v dosedanjih raziskavah, tako *in vitro* kot *in vivo*, izkazal zelo zanimive in obetavne učinke, vendar pa je o specifičnih načinih njegovega delovanja še vedno na razpolago razmeroma malo podatkov. V nadaljevanju si oglejmo rezultate nekaterih objavljenih študij.

1.2.1 Protektivno kardiovaskularno delovanje

Drevenšek in sodelavci so testirali učinke izvlečka lesa bele jelke na izolirana podganja srca (5). Raztopino izvlečka so v različnih koncentracijah vanje dovajali malo pred ter neposredno po indukciji ishemije, in sicer v fazi reperfuzije. Potrdili so hipotezo, da ima izvleček kardioprotективne učinke in obenem pokazali, da je bilo zmanjšanje poškodbe srca sorazmerno uporabljeni koncentraciji. Poleg vplivov izvlečka lesa bele jelke so preverili tudi delovanje njegovih posameznih polifenolnih sestavin. Ugotovili so, da je imel izvleček večji kardioprotективni učinek med ishemijo, v primerjavi z njegovima pomembnima posameznima sestavinama, p-kumarno in protokatehujsko kislino (5). Med drugim so spremljali količino sproščene laktatne dehidrogenaze (LDH), citoplazemskega encima, ki je pokazatelj obsega celičnih poškodb in ugotovili, da je bila količina sproščene LDH v srcih, ki so jih tretirali z raztopinami izvlečka lesa bele jelke značilno manjša, v primerjavi s kontrolnimi vzorci (5). Poleg zmanjšane količine LDH, so, v primerjavi s kontrolo, zaznali tudi skrajšanje trajanja aritmij za kar 80%. Tudi koronarni pretok je bil pri uporabi raztopin izvlečka lesa bele jelke med reperfuzijo večji, kar je dodaten dokaz za boljšo ohranitev funkcije srca po ishemični poškodbi (5).

1.2.2 Vpliv na ateroskleroza

Drevenšek in sodelavci so na morskih prašičkih dokazali zaščitne učinke izvlečka lesa bele jelke pri kronični aterogeni dieti. Spremljali so morfološke in funkcionalne spremembe aorte (6). Dolgotrajna aterogena dieta, ki vsebuje veliko nasičenih maščob, malo antoksidantov ter vlaknin in povzroča spremembe oz. poškodbe žilja, je pogost način prehranjevanja v Zahodnem svetu. Sočasno uživanje izvlečka lesa bele jelke ob tovrstni prehrani je v poskusnih živalih statistično značilno zmanjšalo debelino ateroskleroznega plaka in s tem preprečilo spremembe funkcije aorte. To spoznanje odpira možnosti za uporabo tega izvlečka v profilaksi razvoja srčnožilnih bolezni (6).

1.2.3 Vpliv na diabetes

Debeljak in sodelavci so v okviru klinične študije na ljudeh dokazali potencialno uporabnost izvlečka lesa bele jelke v preventivnem in podpornem zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2 (2). Ugotovili so, da zaužitje izvlečka skupaj z običajnim obrokom zniža postprandialno

koncentracijo glukoze v krvi. Ta je bila pri posameznikih, ki so z obrokom zaužili kapsulo z izvlečkom lesa bele jelke (Belinal[®]), 35% nižja kot pri tistih, ki so prejeli placebo. Prav tako so bile, v primerjavi s slednjimi, tudi plazemske koncentracije inzulina posameznikov, ki so zaužili izvleček, 25% nižje (2). Fenolni spojini, p-kumarna kislina ter nordihidrogvaiaretnika kislina, dokazano zavirata delovanje prebavnih encimov vpletenih v postprandialno regulacijo glukoze v krvi. Prav p-kumarna kislina, ki je prisotna tudi v izvlečku lesa bele jelke (Slika 1), znatno inhibira encim α -glukozidazo (1, 7). Nordihidrogvaiaretnika kislina, ki je v izvlečku sicer niso identificirali, pa zavira delovanje kar treh različnih encimov prebavne poti glukoze, in sicer α -glukozidazo, α -amilazo in dipeptidil peptidazo 4 (7). Polifenoli v prehrani (sadje in zelenjava) delujejo torej hipoglikemično tako, da: inhibirajo encima α -amilazo in/ali α -glukozidazo, zmanjšajo absorpcijo glukoze, stimulirajo izločanje inzulina, ščitijo β -celice trebušne slinavke pred glukotoksičnostjo, zmanjšajo sproščanje glukoze iz jeter in izboljšajo prevzem glukoze v perifernih tkivih preko moduacije znotrajceličnih signalnih poti (2, 8). Tovrstne spojine zmanjšajo tudi verjetnost pojava retinopatij, nefropatij ter nevropatij, ki so pogosti zapleti kronične izpostavljenosti hiperglikemiji. Prehrana bogata s polifenoli torej poveča učinkovitost zdravljenja in obvladovanja diabetesa, kar lahko na dolgi rok poveča kakovost življenja bolnikov s to boleznijo (7, 4).

1.2.4 Vplivi na rast rakavih celic in potek rakave bolezni

Ena od najnevarnejših bolezni sodobnega časa, poleg že omenjenih srčnožilnih bolezni in diabetesa, je rak. Karkabounas in sodelavci so dokazali antiproliferativno in protirakovo delovanje izvlečka lesa bele jelke, in sicer tako *in vitro*, na rakavi celični liniji L-1210 (mišji levkemični limfociti), kot tudi *in vivo*, na podganah (9). V slednjih so z benzopirenom inducirali tvorbo tumorjev, nato pa poskusnim živalim vse do njihove smrti v hrano dodajali izvleček lesa bele jelke v koncentraciji 50 mg/kg telesne mase. Učinki izvlečka na rakave celice so se pokazali v zmanjšanem obsegu proliferacije celic L-1210 ($IC_{50} = 49,6 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$), na tretirane poskusne živali pa v znaten podaljšanju njihove življenske dobe, počasnejši rasti tumorjev in za 16,6% manjši tvorbi le-teh, v primerjavi s kontrolno skupino (9). Kljub tem obetavnim rezultatom pa vse od njihove objave leta 2000 nismo zasledili nobene raziskave o vplivih izvlečka lesa bele jelke na rakave celice. To je bil dodaten motiv za naše raziskovalno delo, opravljeno v sklopu magistrske naloge.

2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge nameravamo preučiti delovanje izvlečka lesa bele jelke na človeške celične linije raka prostate LNCaP, jetrnega raka HepG2 in Jurkat, v pogojih *in vitro*. Pri tem bomo najprej določili vplive različnih koncentracij njegovih raztopin, pripravljenih s tremi različnimi topili, H₂O, DMSO in DPBS, na rast celic LNCaP. Tako nameravamo izbrati najprimernejše topilo, ki ga bomo uporabili za pripravo raztopin izvlečka za vse nadaljnje poskuse, s katerimi bomo ugotavljali, katere koncentracije zaviralo vplivajo na proliferacijo omenjenih celičnih linij *in vitro*. Celice bomo gojili v zanje optimalnih pogojih, jim dodali različne koncentracije raztopine izvlečka in nato po 24, 48 in 72 urah inkubacije spektrofotometrično ugotavljali obseg njihove rasti z uporabo reagenta WST-8 (Cell Counting Kit-8 oz. CCK-8) in meritvami absorbance pri 450 nm. Razlike v morfologiji in obsegu rasti celic LNCaP v celičnih kulturah, nastale zaradi prisotnosti različnih koncentracij izvlečka, bomo opazovali tudi z invertnim mikroskopom.

Določili bomo tudi citotoksičnost testiranih koncentracij izvlečka lesa bele jelke na vseh treh celičnih linijah, za kar bomo uporabili reagenčni komplet CytoTox 96[®], s katerim spektrofotometrično (490 nm) določamo količino laktatne dehidrogenaze (LDH), ki se sprosti iz poškodovanih celic. Citotoksično delovanje različnih koncentracij izvlečka na celice LNCaP pa bomo poleg tega skušali oceniti tudi z uporabo raztopine barvila tripansko modrilo, ki lahko prodre izključno v notranjost mrtvih celic in jihobarva temno modro. Cilj našega dela bo poiskati tiste koncentracije izvlečka lesa bele jelke raztopljenega v izbranem topilu, ki bodo povzročile največji upad proliferacije celic izbranih človeških rakavih linij, temu pa bo sledilo tudi ugotavljanje njihovega morebitnega neposrednega citotoksičnega delovanja.

Dobljeni rezultati bodo prispevali k poznavanju učinkov izvlečka lesa bele jelke na človeške rakave celične linije *in vitro* ter odprli nove možnosti za ciljano preučevanje natančnejših mehanizmov njegovega delovanja na nivoju specifičnih celičnih signalnih poti.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali, reagenti in aparati

Preglednica II: Seznam uporabljenih materialov in aparatur.

Material/aparatura	Proizvajalec in država
0,4 % raztopina barvila tripansko modrilo	Sigma-Aldrich, ZDA
10 mL sterilne brizge	Becton Dickinson, ZDA
15 mL epruvete oz. centrifugirke	Corning Inc., ZDA
4 % raztopina paraformaldehida	Sigma-Aldrich, ZDA
70 % etanol	Sigma-Aldrich, ZDA
96 % etanol	Sigma-Aldrich, ZDA
100 % etanol	Sigma-Aldrich, ZDA
Celična linija LNCaP	ATCC Number: CRL-1740™
Celična linija HepG2	ATCC Number: HB-8065™
Celična linija Jurkat	ATCC Number: TIB-152™
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	Bimake, ZDA
Centrifuga centric 322 PCC	Tehtnica, Slovenija
Citalec mikrotitrskih plošč Synergy H4 Hybrd Reader	BioTek, ZDA
Digestorij PIO MC 152	Iskra, Slovenija
Digitalna kamera NIKON DIGITAL SIGHT DS-Fil	Nikon, Japonska
Destilirana voda	/
DMEM-F12+GlutaMAX-I	Gibco Life Technologies, ZDA
DMSO	Sigma-Aldrich, ZDA
DPBS	Sigma-Aldrich, ZDA
Heat Inactivated FBS	Gibco Life Technologies, ZDA
Filter iz polietilensulfata z 0,22 µm porami	TPP, Švica
Filter SFCA iz celuloze z 0,20 µm porami	TPP, Švica
GlutaMAX-I CTSTM (100x)	Gibco Life Technologies, ZDA
Igle	Tik, Slovenija
Inkubator Heraeus Cytoperm 2	Heraeus, Nemčija
Invertni mikroskop NIKON ECLIPSE TE 300	Nikon, Japonska

Izvleček lesa bele jelke (B)	FFA, Katedra za farmacevtsko biologijo
Komercialni komplet reagentov Promega CitoTox 96® Non Radioactive Citotoxicity Assay	Promega, ZDA
Krovno stekelce	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Mešanica antibiotikov in antimikotikov Antibiotic Antimycotic Solution (100x)	Sigma-Aldrich, ZDA
Mikrotitrski plošče s 96 vdolbinami z ravnim dnom	TPP, Švica
Multikanalna pipeta	Corning, ZDA
Nastavki za pipetiranje	Sarstedt, Nemčija
Natrijev piruvat 100 mM (100x)	Gibco Life Technologies, ZDA
Neubauerjeva komora	Brand, Nemčija
Pasteurjeve pipete	Sarstedt, Nemčija
Pipete 1mL, 2mL, 5 mL, 10 mL	Sarstedt, Nemčija
Plostenke za gojenje celic	CoStar, ZDA
Programska oprema za zajem in obdelavo mikroskopskih slik NIS ELEMENTS F3.2	Nikon, Japonska
Pufer HEPES (1M)	Sigma-Aldrich, ZDA
Raztopina neesencialnih aminokislín MEM NEAA (100x)	Gibco Life Technologies, ZDA
Rokavice Green Nitrile, powder free gloves	Kimtech, Kimberly-Clark, ZDA
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, ZDA
Mikrocentrifugirke (2 mL)	CoStar, ZDA
Tehtnica Sartorius AX124	Sartorius AG, Nemčija
Tripsin – EDTA (1x)	PAA, Avstrija
Vrtinčni stresalnik Lap Dancer	IKA, Nemčija
Zamrzovalna skrinja FORMA 88000 SERIES (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific, ZDA

3.2 Metode

Vse postopke razen štetja celic s pomočjo Neubauerjeve števne komore smo izvajali v aseptičnih pogojih, v komori z laminarnim pretokom filtriranega zraka ter z uporabo sterilnega materiala in reagentov.

3.2.1 Priprava osnovnih sterilnih raztopin izvlečka lesa bele jelke

3.2.1.1 Tehtanje in razapljanje izvlečka lesa bele jelke v vodi, DMSO in DPBS za pilotne poskuse

Izvleček lesa bele jelke, ki je dokaj homogena trdna snov v obliki prahu rjave barve, so pripravili na Katedri za farmacevtsko biologijo FFA in nam oddelili ustrezeno količino za izvedbo poskusov. Pripravili smo tri zatehte, in sicer smo v dve epruveti zatehtali po 50 mg, v tretjo pa 25 mg izvlečka. Nato smo v prvo epruveto dodali 5 mL H₂O, v drugo 5 mL pufra DPBS, v tretjo pa 2,5 mL DMSO. Vse epruvete smo zaprli z navojnimi pokrovi in jih stresali na vrtinčnem stresalniku 10-15 minut pri sobni temperaturi. Tako smo pridobili tri raztopine, pri tem pa opazili, da je v H₂O in DPBS ostalo še nekaj neraztopljenega izvlečka, medtem ko ga je bilo v DMSO bistveno manj.

3.2.1.2 Tehtanje in razapljanje izvlečka lesa bele jelke v izbranem topilu DPBS

Za vse nadaljnje poskuse, z izjemo pilotskih, smo v 50 mL centrifugirko, ki smo jo predhodno stehtali, natehtali 100 mg izvlečka lesa bele jelke in mu dodali 10 mL DPBS. Nato smo postopali tako, kot je opisano v predhodnem poglavju.

3.2.1.3 Sterilno filtriranje in alikvotiranje raztopin

Pridobljene raztopine za pilotske poskuse smo najprej centrifugirali (1.500 rpm, 5 minut), nato pa supernatante sterilno filtrirali. Za filtriranje vodne raztopine in raztopine z DPBS smo uporabili polietilensulfatni (pore 0,20 µm), za filtriranje raztopine z DMSO pa celulozni filter (pore 0,22 µm). Zatem smo sterilni raztopini v DPBS in H₂O s pomočjo sterilnih pipet v 1 mL alikvotih raztočili v ustrezeno število sterilnih 2 mL mikrocentrifugirk s pokrovi, raztopino v DMSO pa razdelili na 0,5 mL alikvote. Označene vsebnike smo nato prenesli v zamrzovalno skrinjo na temperaturo -80 °C, kjer smo jih hranili do uporabe.

Osnovno raztopino izvlečka v izbranem topilu DPBS, ki smo jo uporabili v nadalnjih poskusih, smo prav tako centrifugirali, filtrirali, alikvotirali in do uporabe zamrznili pri -80 °C. Neraztopljeni ostanek v centrifugirki pa smo 6 dni sušili pri temperaturi 42 °C, nato pa centrifugirko ponovno stehtali in določili maso neraztopljene snovi, ki je bila 9,3 mg. Raztopilo se je torej 90,7 mg izvlečka, tako, da je bila koncentracija njegove osnovne raztopine 9,07 mg/mL.

3.2.2 Priprava gojitvenih medijev in delovnih raztopin za ugotavljanje vplivov izvlečka lesa bele jelke na rast celic LNCaP, HepG2 in Jurkat

3.2.2.1 Priprava osnovnega medija RPMI-1640 za celice LNCaP in Jurkat

V 500 mL medija RPMI-1640 smo dodali 5 mL 1 M pufra HEPES, 5 mL raztopine GlutaMax (100x) in 5 mL mešanice antibiotikov in antimikotikov (100x). Zaprti plastični vsebnik z medijem smo nekajkrat obrnili, da so se dodane raztopine enakomerno premešale.

3.2.2.2 Priprava osnovnega medija DMEM-F12 za celice HepG2

V 500 mL medija DMEM-F12 smo dodali 5 mL 1 M pufra HEPES, 5 mL raztopine GlutaMax (100x), 5 mL raztopine antibiotikov ter antimikotikov (100x), 5 mL 100 mM raztopine Na-piruvata (100x) in 5 mL mešanice neesencialnih aminokislin (100x) in vse dobro premešali.

3.2.2.3 Priprava gojitvenega medija z 10% FBS za celice LNCaP in Jurkat

Za gojenje celičnih linij LNCaP in Jurkat smo pripravili po 50 mL medija tako, da smo k 5 mL FBS dodali 45 mL osnovnega medija RPMI-1640 in mešanico dobro premešali na vrtinčnem stresalniku.

3.2.2.4 Priprava gojitvenega medija z 10% FBS za celice HepG2

Za pripravo 50 mL medija za gojenje celic HepG2 smo postopali enako kot v prejšnjem poglavju, le da smo k 5 mL FBS dodali 45 mL osnovnega medija DMEM-F12.

3.2.2.5 Priprava medija za odmrzovanje celic

Odmrzovalni medij smo pripravili sproti, in sicer iz 80% ustreznega osnovnega medija in 20% FBS. Ker smo za vsak poskus odmrznili po eno 2 mL kriovialo ustreznih, v tekočem dušiku shranjenih celic, smo za ta postopek potrebovali dvakratni volumen odmrzovalnega

medija, torej 4 mL (3,2 mL osnovnega medija in 0,8 mL FBS), ki smo ga najprej dobro premešali, nato pa neposredno pred uporabo segreli na 37 °C v vodni kopeli.

3.2.2.6 Priprava različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke iz njegovih osnovnih raztopin v H₂O, DPBS in DMSO

Iz osnovnih sterilnih raztopin izvlečka lesa bele jelke [konc. 100% oz. ~ 1% (m/v)], ki smo ga raztopljalili v topilih DMSO, H₂O in DPBS, smo pripravili delovne redčitve s koncentracijami: 50%, 25%, 5%, 2,5%, 0,5%, 0,25%, 0,05%, 0,025% in 0,005% (vse v/v, glede na konc. osnovnih raztopin – 100%) (Preglednica III). Za redčenje smo uporabili ustrezni gojitveni medij z 10% FBS. Navedene koncentracije smo izbrali za pilotni eksperiment, s katerim smo želeli orientacijsko preveriti njihove vplive na proliferacijo celic LNCaP, obenem pa testirati tudi katero od topil za pripravo osnovnih raztopin, torej DMSO, H₂O ali DPBS, bomo uporabili za nadaljnje delo. Ob tem smo pripravili tudi kontrole, in sicer tako, da smo omenjena tri topila brez raztopljenega izvlečka, na enak način kot vzorce, redčili z ustreznim gojitvenim medijem, ki je vseboval 10% FBS.

Preglednica III: Primer delovnega načrta za pripravo redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v H₂O in ustreznih kontrol, ki je enak kot v primeru redčenja osnovnih raztopin v DMSO in DPBS.

Koncentracija raztopin izvlečka (v/v)	Priprava redčitev izvlečka	-	Koncentracija topila kontrolah (v/v)	Priprava redčitev kontrol
50% B_{voda}	500 µL B _{voda} + 500 µL medija		50% H₂O	500 µL H ₂ O + 500 µL medija
25% B_{voda}	250 µL B _{voda} + 750 µL medija		25% H₂O	250 µL H ₂ O + 750 µL medija
5% B_{voda}	100 µL 50% B _{voda} + 900 µL medija		5% H₂O	100 µL 50% H ₂ O+ 900 µL medija
2,5% B_{voda}	100 µL 25% B _{voda} + 900 µL medija		2,5% H₂O	100 µL 25% H ₂ O + 900 µL medija
0,5% B_{voda}	100 µL 5% B _{voda} + 900 µL medija		0,5% H₂O	100 µL 5% H ₂ O + 900 µL medija
0,25% B_{voda}	100 µL 2,5% B _{voda} + 900 µL medija		0,25% H₂O	100 µL 2,5% H ₂ O+900 µL medija
0,05% B_{voda}	100 µL 0,5% B _{voda} + 900 µL medija		0,05% H₂O	100 µL 0,5% H ₂ O+900 µL medija
0,025% B_{voda}	100 µL 0,25% B _{voda} + 900 µL medija		0,025% H₂O	100 µL 0,25% H ₂ O+900 µL med.
0,005% B_{voda}	100 µL 0,05% B _{voda} + 900 µL medija		0,005% H₂O	100 µL 0,05% H ₂ O+900 µL med.

Legenda: B_{voda} – osnovna sterilna raztopina izvlečka lesa bele jelke v H₂O; medij – RPMI-1640 z 10% FBS

3.2.3 Določanje obsega proliferacije človeških rakavih celičnih linij *in vitro* v prisotnosti različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke

3.2.3.1 Odmrzovanje celic

Pred vsakim poskusom smo iz Dewarjeve posode s tekočim dušikom vzeli po eno krioampulo s približno 2 mL suspenzije celic in jo na hitro odtalili v vodni kopeli (37°C). S Pasteurjevo pipeto smo k odtaljenim celicam nemudoma dodali nekaj odmrzovalnega medija (osnovni medij z 20% FBS), ki smo ga predhodno segreli na 37°C , in celično suspenzijo v celoti prenesli v 50 mL centrifugirko z odmrzovalnim medijem. Po nekaj minutah smo v centrifugirko dodali osnovni medij do oznake 45 mL in celično suspenzijo 10 minut centrifugirali pri 1.700 rpm, brez zavore, na sobni temperaturi. Nato smo odlili supernatant, celično usedlino dobro pretresli na vrtinčnem mešalu, dodali DPBS do oznake 35 mL in celice ponovno centrifugirali pod enakimi pogoji. Po temeljiti odstranitvi supernatanta smo celično usedlino resuspendirali s stresanjem na vrtinčnem stresalniku, celicam dodali 1,9 mL gojitvenega medija z 10% FBS in suspenzijo še enkrat dobro pretresli.

3.2.3.2 Določanje koncentracije celic s pomočjo Neubauerjeve komore

V vdolbinico mikrotitrsko plošče (96 vdolbinic) smo odpipetirali 80 μL 0,4 % raztopine tripanskega modrila, dodali 20 μL predhodno dobro premešane celične suspenzije in zmes rahlo pomešali. Suspenzijo celic v barvilu smo, tik pred nanosom vzorca pod krovno steklo položeno na Neubauerjevo števno komoro, dobro homogenizirali z mešanjem z mikropipeto. Nato smo s pomočjo svetlobnega mikroskopa prešteli celice v petih kvadratkih števne komore. Koncentracijo celic v suspenziji smo izračunali s pomočjo Enačbe 1.

Enačba 1: Izračun števila celic/mL celične suspenzije z uporabo Neubauerjeve komore.

$$\text{Število celic/mL} = \text{število celic v petih kvadratkih} \times 25 \times 10^4$$

Nato smo suspenzijo celic razredčili z gojitvenim medijem z 10% FBS do želene koncentracije, ki smo jo potrebovali za izvedbo eksperimenta, v našem primeru do 25×10^3 celic/mL.

3.2.3.3 Priprava celičnih kultur v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami za določanje obsega proliferacije celic LNCaP v prisotnosti različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke v topilih DPBS, DMSO in H₂O

Pripravili smo 9 mikrotitrskih plošč s 96 vdolbinicami z ravnim dnom. V vse vdolbinice na skrajnih robovih smo z multikanalno pipeto prenesli po 100 µL DPBS, s čimer smo skušali zmanjšati izhlapevanje iz vdolbinic s celicami med eksperimentom. V ostale vdolbinice na mikrotitrskih ploščah smo, skladno z delovnim načrtom (Preglednica IV) z 12-kanalno pipeto raztočili po 80 µL suspenzije celic LNCaP s koncentracijo 25×10^3 /mL, kar pomeni 2.000 celic/vdolbinico. Mikrotitrskie plošče smo pokrili s pokrovi in jih za 24 ur prenesli v inkubator (37°C , 5% CO₂ v zraku in 96% vlaga), da so se celice LNCaP pritrdile na dno vdolbinic.

Naslednji dan smo v ustrezne vdolbinice s celicami na enako pripravljenih 9 mikrotitrskih ploščah, skladno z delovnim načrtom (Preglednica IV), dodali po 20 µL preskušanih redčitev (50%, 25%, 5%, 2,5%, 0,5%, 0,25%, 0,05%, 0,025% in 0,005%) vseh treh različnih osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke (H₂O, DPBS in DMSO), pri čemer smo vsako od koncentracij testirali v trojniku. K pozitivnim (celice brez dodatka izvlečkov) in slepim (samo gojitveni medij) kontrolam pa smo dodali po 20 µL gojitvenega medija.

Prve tri plošče smo pred meritvami obsega celične proliferacije inkubirali 24 ur, druge tri 48 ur in zadnje tri 72 ur. Kot kontrole smo uporabili ustrezne redčitve topil (v/v), ki smo jih uporabili za razapljanje izvlečka (H₂O, DPBS in DMSO), pripravljene z gojitvenim medijem RPMI-1640 z 10% FBS (v Preglednici IV soobarvane s sivo barvo). Z njimi smo ugotavljali morebitne vplive omenjenih topil na rast celic LNCaP. Za določitev absorbance ozadja pa smo, tako kot smo to že opisali, uporabili slepe kontrole, in sicer 4 vdolbinice brez celic s po 100 µL samega gojitvenega medija ter po 3 vdolbinice s kombinacijami 80 µL gojitvenega medija z 20 µL 50%, 25% in 5% redčitve posameznih topil, H₂O, DPBS in DMSO. Te kontrole so v Preglednici IV obarvane rdeče-rjavo. Pozitivno kontrolo pa so predstavljale celice LNCaP, ki so rastle v 100 µL gojitvenega medija, brez kakšnega koli drugega dodatka (bela polja v Preglednici IV).

Preglednica IV: Shema mikrotitrskih plošč s 96 vdolbinicami s prikazanim primerom delovnega načrta za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije. Predstavljene so razporeditve, z različnimi redčitvami osnovne vodne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{voda}), tretiranih mikrokultur celic LNCaP (zelena barva ozadja) ter ustrezne kontrole. Pozitivna kontrola (bela barva ozadja); kontrola za ugotavljanje vplivov ustreznih redčitev uporabljenega topila za razapljanje izvlečka na celice (siva barva ozadja) in različne slepe kontrole (rdeče-rjava barva ozadja). Delovni načrt za pripravo mikrotitrskih plošč je bil enak tudi v primerih testiranja izvlečka lesa bele jelke, raztopljenega v DPBS in DMSO.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	LNCaP	LNCaP	LNCaP	LNCaP+50% B_{voda}	LNCaP+50% B_{voda}	LNCaP+50% B_{voda}	LNCaP+25% B_{voda}	LNCaP+25% B_{voda}	LNCaP+25% B_{voda}	LNCaP+25% B_{voda}	DPBS
C	DPBS	LNCaP+5% B_{voda}	LNCaP+5% B_{voda}	LNCaP+2,5% B_{voda}	LNCaP+2,5% B_{voda}	LNCaP+2,5% B_{voda}	LNCaP+0,5% B_{voda}	LNCaP+0,5% B_{voda}	LNCaP+0,25% B_{voda}	LNCaP+0,25% B_{voda}	LNCaP+0,25% B_{voda}	DPBS
D	DPBS	LNCaP+0,25% B_{voda}	LNCaP+0,05% B_{voda}	LNCaP+0,05% B_{voda}	LNCaP+0,05% B_{voda}	LNCaP+0,025% B_{voda}	LNCaP+0,025% B_{voda}	LNCaP+0,005% B_{voda}	LNCaP+0,005% B_{voda}	LNCaP+0,005% B_{voda}	LNCaP+0,005% B_{voda}	DPBS
E	DPBS	LNCaP+50% H_2O	LNCaP+50% H_2O	LNCaP+50% H_2O	LNCaP+25% H_2O	LNCaP+25% H_2O	LNCaP+25% H_2O	LNCaP+5% H_2O	LNCaP+5% H_2O	LNCaP+5% H_2O	LNCaP+2,5% H_2O	DPBS
F	DPBS	LNCaP+2,5% H_2O	LNCaP+2,5% H_2O	LNCaP+0,5% H_2O	LNCaP+0,5% H_2O	LNCaP+0,5% H_2O	LNCaP+0,25% H_2O	LNCaP+0,25% H_2O	LNCaP+0,05% H_2O	LNCaP+0,05% H_2O	LNCaP+0,05% H_2O	DPBS
G	DPBS	LNCaP+0,05% H_2O	LNCaP+0,025% H_2O	LNCaP+0,025% H_2O	LNCaP+0,025% H_2O	LNCaP+0,005% H_2O	LNCaP+0,005% H_2O	LNCaP+0,005% H_2O	Medij	Medij	Medij	DPBS
H	DPBS	Medij	Medij s 50% H_2O	Medij s 50% H_2O	Medij s 50% H_2O	Medij s 25% H_2O	Medij s 25% H_2O	Medij s 25% H_2O	Medij s 5% H_2O	Medij s 5% H_2O	Medij s 5% H_2O	DPBS

Legenda: Medij – RPMI-1640 z 10% FBS

Po 24 urah inkubacije smo prve tri plošče (topila H_2O , DPBS in DMSO) vzeli iz inkubatorja in v vse vdolbinice z izjemo obrobnih, v katerih je bil DPBS, dodali po 10 μL reagenta WST-8, ki je mononatrijeva sol, 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolij, namenjena določanju obsega celične proliferacije. Žive, presnovno aktivne celice WST-8 reducirajo z dehidrogenazami, pri čemer nastane oranžnoobarvan vodotopni formazan, njegova količina pa je neposredno proporcionalna številu živih celic.

Po dodatku reagenta WST-8 smo plošče pokrili, prenesli v inkubator, jih inkubirali 4 ure, nato pa s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč izmerili absorbanco pri 450 nm. Aparat je avtomatsko odšteval vrednosti slepe kontrole (samo gojitveni medij), vrednosti absorbanc pa so bile prenosorazmerne količinam živih, presnovno aktivnih celic LNCaP v posamezni mikrokulturi. Enako smo postopali tudi s preostalimi mikrotitrskimi ploščami po 48- in 72-urni inkubaciji.

3.2.3.3 Natančnejše ugotavljanje vplivov različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke, raztopljenega v izbranem topilu DPBS, na rast celične linije LNCaP

Na enak način, ki je opisan v prejšnjem poglavju, smo pripravili 3 mikrotitrskie plošče s 96 vdolbinami (za inkubacijo 24, 72 in 96 ur). Delovni načrt njihove priprave je predstavljen v Preglednici VI.

Tokrat smo preverjali vplive 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% in 5% koncentracij (vse v/v) osnovne raztopine izvlečka v topilu DPBS (B_{DPBS}), ki smo ga izbrali za vse nadaljne poskuse. Načrt njihove priprave je prikazan v Preglednici V. Dejanske koncentracije preskušanih redčin osnovne raztopine B_{DPBS} , ki so bile v stiku s po 2.000 celicami LNCaP/vdolbinico pa so bile: 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% in 1% (vse v/v).

Preglednica V: Načrt priprave redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} (100%) in ustreznih kontrol.

Koncentracija raztopine izvlečka	Priprava raztopine izvlečka	-	Koncentracija kontrolne raztopine	Priprava kontrolne raztopine
50% B_{DPBS}	2.500 µL B_{DPBS} + 2.500 µL medija		50% DPBS	2.500 µL DPBS + 2.500 µL medija
40% B_{DPBS}	800 µL 50% B_{DPBS} + 200 µL medija		40% DPBS	800 µL 50% DPBS + 200 µL medija
35% B_{DPBS}	700 µL 50% B_{DPBS} + 300 µL medija		35% DPBS	700 µL 50% DPBS + 300 µL medija
30% B_{DPBS}	600 µL 50% B_{DPBS} + 400 µL medija		30% DPBS	600 µL 50% DPBS + 400 µL medija
25% B_{DPBS}	500 µL 50% B_{DPBS} + 500 µL medija		25% DPBS	500 µL 50% DPBS + 500 µL medija
20% B_{DPBS}	400 µL 50% B_{DPBS} + 600 µL medija		20% DPBS	400 µL 50% DPBS + 600 µL medija
15% B_{DPBS}	300 µL 50% B_{DPBS} + 700 µL medija		15% DPBS	300 µL 50% DPBS + 700 µL medija
10% B_{DPBS}	200 µL 50% B_{DPBS} + 800 µL medija		10% DPBS	200 µL 50% DPBS + 800 µL medija
5% B_{DPBS}	100 µL 50% B_{DPBS} + 900 µL medija		5% DPBS	100 µL 50% DPBS + 900 µL medija
2,5% B_{DPBS}	50 µL 50% B_{DPBS} + 950 µL medija		2,5% DPBS	50 µL 50% DPBS + 950 µL medija

Legenda: B_{DPBS} – osnovna sterilna raztopina izvlečka lesa bele jelke v DPBS; medij – RPMI-1640 z 10% FBS

Preglednica VI: Shema mikrotitrskie plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije. Predstavljene so razporeditve, z različnimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{DPBS}), tretiranih mikrokultur celic LNCaP (rumena barva ozadja) ter ustreznih kontrol. Pozitivna kontrola (bela barva ozadja); kontrola za ugotavljanje vplivov redčitev uporabljenega topila

za raztopljanje izvlečka na celice (siva barva ozadja) in različne slepe kontrole (rdeče rjava barva ozadja).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	LNCaP	LNCaP	LNCaP	LNCaP+40% B _{DPBS}	LNCaP+40% B _{DPBS}	LNCaP+40% B _{DPBS}	LNCaP+35% B _{DPBS}	LNCaP+35% B _{DPBS}	LNCaP+30% B _{DPBS}	LNCaP+30% B _{DPBS}	DPBS
C	DPBS	LNCaP+30% B _{DPBS}	LNCaP+30% B _{DPBS}	LNCaP+25% B _{DPBS}	LNCaP+25% B _{DPBS}	LNCaP+25% B _{DPBS}	LNCaP+20% B _{DPBS}	LNCaP+20% B _{DPBS}	LNCaP+20% B _{DPBS}	LNCaP+15% B _{DPBS}	LNCaP+15% B _{DPBS}	DPBS
D	DPBS	LNCaP+15% B _{DPBS}	LNCaP+10% B _{DPBS}	LNCaP+10% B _{DPBS}	LNCaP+10% B _{DPBS}	LNCaP+5% B _{DPBS}	LNCaP+5% B _{DPBS}	LNCaP+5% B _{DPBS}	LNCaP+40% DPBS	LNCaP+40% DPBS	LNCaP+40% DPBS	DPBS
E	DPBS	LNCaP+35% DPBS	LNCaP+35% DPBS	LNCaP+35% DPBS	LNCaP+30% DPBS	LNCaP+30% DPBS	LNCaP+25% DPBS	LNCaP+25% DPBS	LNCaP+25% DPBS	LNCaP+20% DPBS	LNCaP+20% DPBS	DPBS
F	DPBS	LNCaP+20% DPBS	LNCaP+20% DPBS	LNCaP+15% DPBS	LNCaP+15% DPBS	LNCaP+10% DPBS	LNCaP+10% DPBS	LNCaP+10% DPBS	LNCaP+5% DPBS	LNCaP+5% DPBS	LNCaP+5% DPBS	DPBS
G	DPBS	LNCaP+5% DPBS	Medij	Medij	Medij	Medij	Medij + 40% DPBS	Medij + 40% DPBS	Medij + 40% DPBS	Medij + 35% DPBS	Medij + 35% DPBS	DPBS
H	DPBS	Medij + 35% DPBS	Medij + 30% DPBS	Medij + 30% DPBS	Medij + 30% DPBS	Medij + 25% DPBS	Medij + 25% DPBS	Medij + 25% DPBS	Medij + 20% DPBS	Medij + 20% DPBS	Medij + 20% DPBS	DPBS

Legenda: Medij – RPMI-1640 z 10% FBS

Po 24, 48 in 72 urah inkubacije, smo z uporabo reagenta WST-8, kot je opisano v prejšnjem poglavju, določili obseg proliferacije celic. Ker pa smo pri tem, tako kot v pilotnem poskusu, opazili, da prihaja pri meritvah absorbance, predvsem v vdolbinicah z višjimi koncentracijami raztopin izvlečka, zaradi njihove obarvanosti, do interferenc z barvo nastalega formazana, smo v nadaljevanju izvedli še en poskus, kar je opisano v naslednjem poglavju.

3.2.3.4 Ugotavljanje vplivov različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke, raztopljenega v izbranem topilu DPBS, na rast celične linije LNCaP, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Načrt za pripravo 3 mikrotitrskih plošč je predstavljen v Preglednici VII. Testirali smo 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% in 2,5% (vse v/v) redčitve osnovne raztopine B_{DPBS} s koncentracijo 9,07 mg/mL, kar predstavlja naslednje koncentracije izvlečka lesa bele jelke (m/v): 3,63 mg/mL, 3,17 mg/mL, 2,72 mg/mL, 2,27 mg/mL, 1,81 mg/mL, 1,36 mg/mL, 0,91 mg/mL, 0,45 mg/mL in 0,23 mg/mL. Končne koncentracije, s katerimi so bile v stiku celice LNCaP (po 2×10^3 /vdolbinico) pa so bile: 72,6 µg, 63,5 µg, 54,4 µg, 45,3 µg, 36,3 µg, 27,2 µg, 18,1 µg, 9,1 µg in 4,5 µg. Vdolbinice, v katerih so bile celice z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka, so v Preglednici VII označene z modro barvo.

Tokrat smo uporabili slepe kontrole za vsako testirano koncentracijo B_{DPBS} (v Preglednici VII so označene z rumeno barvo), ki smo jih pripravili tako, da smo 80 µL medija RPMI-1640 z 10% FBS dodali po 20 µL raztopine izvlečka lesa bele jelke z ustrezno koncentracijo. Po opravljenih meritvah absorbanc pri 450 nm, ki so sledile dodatku reagenta WST-8 in

nadaljnji 6-urni inkubaciji, smo njihove povprečne vrednosti odšteli od ustreznih posameznih vrednosti meritev v vdolbinicah s celicami.

Preglednica VII: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije. Predstavljene so razporeditve z različnimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{DPBS}) tretiranih mikrokultur celic LNCaP (modra barva ozadja) ter ustreznih kontrol. Pozitivna kontrola (bela barva ozadja) in slepe kontrole (rumena barva ozadja).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	LNCaP	LNCaP	LNCaP	LNCaP+40% B_{DPBS}	LNCaP+40% B_{DPBS}	LNCaP+40% B_{DPBS}	LNCaP+35% B_{DPBS}	LNCaP+35% B_{DPBS}	LNCaP+35% B_{DPBS}	LNCaP+30% B_{DPBS}	DPBS
C	DPBS	LNCaP+30% B_{DPBS}	LNCaP+30% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	LNCaP+15% B_{DPBS}	LNCaP+15% B_{DPBS}	DPBS	DPBS
D	DPBS	LNCaP+15% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP+2,5% B_{DPBS}	LNCaP+2,5% B_{DPBS}	LNCaP+2,5% B_{DPBS}	DPBS
E	DPBS	LNCaP	LNCaP	LNCaP	Medij	Medij	Medij	Medij+40% B_{DPBS}	Medij+40% B_{DPBS}	Medij+40% B_{DPBS}	Medij+35% B_{DPBS}	DPBS
F	DPBS	Medij+35% B_{DPBS}	Medij+35% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+25% B_{DPBS}	Medij+25% B_{DPBS}	Medij+25% B_{DPBS}	Medij+20% B_{DPBS}	Medij+20% B_{DPBS}	DPBS
G	DPBS	Medij+20% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	Medij+5% B_{DPBS}	Medij+5% B_{DPBS}	Medij+5% B_{DPBS}	DPBS
H	DPBS	Medij+2,5% B_{DPBS}	Medij+2,5% B_{DPBS}	Medij+2,5% B_{DPBS}	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS

Legenda: Medij – RPMI-1640 z 10% FBS

Predstavljeni eksperimentalni pristop smo uporabili pri vseh nadalnjih testiranjih različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke, pripravljenih iz osnovne raztopine B_{DPBS} (9,07 mg/mL).

3.2.3.5 Ugotavljanje vplivov različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke, raztopljenega v izbranem topilu DPBS, na rast celične linije HepG2, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Za poskus smo zopet pripravili 3 mikrotitrsko plošče (za inkubacijo 24, 48 in 72 ur), skladno z delovnim načrtom, ki ga prikazuje Preglednica VIII, pri čemer smo postopali enako kot v prejšnjih poglavjih. Pripravi osnovnega in gojitvenega medija za celice HepG2 sta opisani v poglavjih 3.2.2.2 in 3.2.2.4. Testirali smo deset različnih redčitev (v/v) osnovne raztopine B_{DPBS} (9,07 mg/mL): 50% (4,54 mg/mL), 40% (3,63 mg/mL), 35% (3,17 mg/mL), 30% (2,72 mg/mL), 25% (2,27 mg/mL), 20% (1,81 mg/mL), 15% (1,36 mg/mL), 10% (0,91 mg/mL), 5% (0,45 mg/mL) in 2,5% (0,23 mg/mL). Količine izvlečka, s katerimi so bile v stiku celice HepG2 (po 2×10^3 /vdolbinico) pa so bile: 90,7 µg, 72,6 µg, 63,5 µg, 54,4 µg, 45,3 µg, 36,3 µg, 27,2 µg, 18,1 µg, 9,1 µg in 4,5 µg.

Preglednica VIII: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije. Predstavljene so

razporeditve z različnimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{DPBS}) tretiranih mikrokultur celic HepG2 (modra barva ozadja) ter ustreznih kontrol. Pozitivna kontrola (bela barva ozadja) in slepe kontrole (rumena barva ozadja).

	1	2	3	4	5	30	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	HepG2	HepG2	HepG2	HepG2	HepG2	HepG2+50% B_{DPBS}	HepG2+50% B_{DPBS}	HepG2+50% B_{DPBS}	HepG2+40% B_{DPBS}		
C	DPBS	HepG2+40% B_{DPBS}	HepG2+40% B_{DPBS}	HepG2+35% B_{DPBS}	HepG2+35% B_{DPBS}	HepG2+35% B_{DPBS}	HepG2+30% B_{DPBS}	HepG2+30% B_{DPBS}	HepG2+25% B_{DPBS}	HepG2+25% B_{DPBS}		
D	DPBS	HepG2+25% B_{DPBS}	HepG2+20% B_{DPBS}	HepG2+20% B_{DPBS}	HepG2+20% B_{DPBS}	HepG2+15% B_{DPBS}	HepG2+15% B_{DPBS}	HepG2+15% B_{DPBS}	HepG2+10% B_{DPBS}	HepG2+10% B_{DPBS}	HepG2+10% B_{DPBS}	
E	DPBS	HepG2+5% B_{DPBS}	HepG2+5% B_{DPBS}	HepG2+5% B_{DPBS}	HepG2+2,5% B_{DPBS}	HepG2+2,5% B_{DPBS}	HepG2+2,5% B_{DPBS}	Medij+50% B_{DPBS}	Medij+50% B_{DPBS}	Medij+50% B_{DPBS}	Medij+40% B_{DPBS}	
F	DPBS	Medij+40% B_{DPBS}	Medij+40% B_{DPBS}	Medij+35% B_{DPBS}	Medij+35% B_{DPBS}	Medij+35% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+25% B_{DPBS}	Medij+25% B_{DPBS}	
G	DPBS	Medij+25% B_{DPBS}	Medij+20% B_{DPBS}	Medij+20% B_{DPBS}	Medij+20% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	
H	DPBS	Medij+5% B_{DPBS}	Medij+5% B_{DPBS}	Medij+5% B_{DPBS}	Medij+2,5% B_{DPBS}	Medij+2,5% B_{DPBS}	Medij+2,5% B_{DPBS}	Medij	Medij	Medij	Medij	DPBS

Legenda: Medij – DMEM-F12 z 10% FBS

Absorbance po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji smo, po dodatku reagenta WST-8 in nadaljnji 6-urni inkubaciji, merili pri 450 nm. Pri izračunih obsega celične proliferacije pa smo ustrezno upoštevali oz. odštevali vrednosti absorbanc kontrol.

3.2.3.6 Ugotavljanje vplivov različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke, raztopljenega v izbranem topilu DPBS, na rast celične linije Jurkat, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Na standarden način smo pripravili 3 mikrotitrskie plošče (za inkubacijo 24, 48 in 72 ur), skladno z delovnim načrtom, ki ga prikazuje Preglednica IX. Razlika glede gojenja celične linije Jurkat ter celic LNCaP in HepG2 je v tem, da sta slednji celični liniji adhezijski, medtem ko celice Jurkat (rakovo spremenjeni limfociti T) rastejo v suspenziji. Po naselitvi v vdolbinice mikrotitrskie plošče, smo tudi te celice pred dodatkom različnih koncentracij izvlečka inkubirali 24 ur, da so se stabilizirale. Sicer pa smo postopali na enak, že predhodno opisan način. Za gojitev medij smo, tako kot v primeru celične linije LNCaP, uporabili RPMI-1640 z 10% FBS. Testirali smo enake redčitve osnovne raztopine B_{DPBS} (9,07 mg/mL), kot v primeru celične linije HepG2 (poglavje 3.2.3.5).

Preglednica IX: Shema mikrotitrskie plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo 3 identičnih plošč, za 24, 48 in 72 ur inkubacije. Predstavljene so razporeditve z različnimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{DPBS})

tretiranih mikrokultur celic Jurkat (modra barva ozadja) ter ustreznih kontrol. Pozitivna kontrola (bela barva ozadja) in slepe kontrole (rumena barva ozadja).

	1	2	3	4	5	30	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	Jurkat	Jurkat	Jurkat	Jurkat	Jurkat	Jurkat	Jurkat+50% BOPBS	Jurkat+50% BOPBS	Jurkat+50% BOPBS	Jurkat+40% BOPBS		DPBS
C	DPBS	Jurkat+40% BOPBS	Jurkat+40% BOPBS	Jurkat+35% BOPBS	Jurkat+35% BOPBS	Jurkat+35% BOPBS	Jurkat+30% BOPBS	Jurkat+30% BOPBS	Jurkat+30% BOPBS	Jurkat+25% BOPBS	Jurkat+25% BOPBS	DPBS
D	DPBS	Jurkat+25% BOPBS	Jurkat+20% BOPBS	Jurkat+20% BOPBS	Jurkat+20% BOPBS	Jurkat+15% BOPBS	Jurkat+15% BOPBS	Jurkat+15% BOPBS	Jurkat+10% BOPBS	Jurkat+10% BOPBS	Jurkat+10% BOPBS	DPBS
E	DPBS	Jurkat+5% BOPBS	Jurkat+5% BOPBS	Jurkat+5% BOPBS	Jurkat+2,5% BOPBS	Jurkat+2,5% BOPBS	Jurkat+2,5% BOPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+40% BOPBS	DPBS
F	DPBS	Medij+40% BOPBS	Medij+40% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+25% BOPBS	Medij+25% BOPBS	DPBS
G	DPBS	Medij+25% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+10% BOPBS	Medij+10% BOPBS	Medij+10% BOPBS	DPBS
H	DPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij	Medij	Medij	Medij	DPBS

Legenda: Medij – RPMI-1640 z 10% FBS

Absorbance po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji smo, po dodatku reagenta WST-8 in nadaljnji 6-urni inkubaciji, merili pri 450 nm. Pri izračunih obsega celične proliferacije pa smo ustrezno upoštevali oz. odštevali vrednosti absorbanc kontrol.

3.2.4 Ugotavljanje citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS

Citotoksičnost različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka B_{DPBS} za celice LNCaP smo ugotavljali z dvema različnim metodama, za celice HepG2 in Jurkat pa le z eno.

3.2.4.1 Ugotavljanje citotoksičnosti različnih koncentracij osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS na celicah LNCaP z uporabo tripanskega modrila

Uporabili smo mikrotitrsko ploščo s 24 vdolbinami. Ker je rastna površina v posamezni vdolbini približno 6x večja ($1,9 \text{ cm}^2$) kot v primeru mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami ($0,32 \text{ cm}^2$), smo v 8 vdolbin prenesli po $240 \mu\text{L}$ suspenzije celic LNCaP s koncentracijo 25×10^3 celic/mL, torej po 6×10^3 celic LNCaP (Preglednica X). K celicam smo nato dodali še $100 \mu\text{L}$ gojitvenega medija (RPMI-1640 z 10 % FBS) in ploščo inkubirali 24 ur, da se so celice v celoti pritrdile na plastično površino. Naslednji dan smo iz celičnih kultur najprej odstranili ves gojitveni medij in ga nadomestili z $240 \mu\text{L}$ svežega. Potem smo v vsako od 6 vdolbin s celicami dodali po $60 \mu\text{L}$ vsake od naslednjih testiranih redčitev (v/v) osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS (B_{DPBS}): 30%, 25%, 20%, 15%, 10% in 5%. Za pripravo negativnih kontrol pa smo v dve vdolbini s celicami LNCaP dodali po $60 \mu\text{L}$ gojitvenega medija. Skupni volumen v vsaki vdolbini je bil tako $400 \mu\text{L}$.

Preglednica X: Shema mikrotitrsko plošče z 24 vdolbinami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 72-urno inkubacijo. Predstavljene so razporeditve z različnimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{DPBS}) tretiranih mikrokultur celic LNCaP (modra barva ozadja) ter negativne kontrole (rumena barva ozadja).

	1	2	3	4	5	6
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	LNCaP	LNCaP+30% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	DPBS
C	DPBS	LNCaP+15% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP	DPBS
D	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS

Legenda: Medij – RPMI-1640 z 10% FBS

Mikrotitrsko ploščo smo po dodatku različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka B_{DPBS} inkubirali 72 ur, nato odstranili medij iz vseh vdolbinic s celicami ter vse celične kulture 2x sprali s po 0,5 mL na 37 °C ogretega medija RPMI-1640, brez dodanega FBS. Še pred tem smo pripravili 2 mL, z DPBS v razmerju 1:1, razredčene 0,4% raztopine tripanskega modrila. Za ugotavljanje citotoksičnosti smo uporabili priznani protokol, ki so ga objavili Perry in sodelavci (10). V vsako vdolbino smo po spiranju celic dodali po 200 µL razredčene raztopine tripanskega modrila tako, da smo pokrili celotno rastno površino. Sledila je 1-minutna inkubacija pri sobni temperaturi, nato pa smo iz vdolbin previdno odstranili celotno količino barvila. Celične kulture smo pregledali pod invertnim svetlobnim mikroskopom, jih fotografirali ter primerjali glede na število opaženih mrtvih celic LNCaP v vsaki od vdolbin, v katere smo dodali različne koncentracije izvlečka B_{DPBS} , s številom mrtvih celic, ki smo jih opazili v kontrolah.

3.2.4.2 Pilotno ugotavljanje obsega takojšnje citotoksičnosti različnih koncentracij osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS na celicah LNCaP s kompletom reagentov Promega CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay

S tem testom kvantitativno določamo količino stabilnega citoplazemskega encima laktatne dehidrogenaze (LDH), ki se v medij celične kulture sprosti iz liziranih oziroma poškodovanih celic, kjer ga zaznamo s pomočjo sklopljene encimske reakcije. V njej se tetrazolijeva sol INT (p-nitrojodotetrazolij vijolično) pretvorji v rdeči formazan, katerega intenziteto izmerimo spektrofotometrično pri 490 nm. Reakcija je kvantitativna, saj je količina nastalega formazana sorazmerna številu poškodovanih in liziranih celic (11).

Poskus smo izvedli tako, da smo, skladno z delovnim načrtom, ki je predstavljen v Preglednici XI, na ustaljeni način, v ustrezeno število vdolbinic mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami, naselili po 2×10^3 celic (po $80 \mu\text{L}$ celične suspenzije). Kot pri spremljjanju celične proliferacije, smo mikrotitrsko ploščo inkubirali preko noči, da so se celice pritrdile na rastno površino. Naslednji dan smo v ustrezne vdolbinice s celicami (polja pobarvana modro v Preglednici XI) v triplikatih dodali po $20 \mu\text{L}$ vsake od naslednjih testiranih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v pufru DPBS (B_{DPBS}) (v/v): 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% in 2,5%. Nato smo mikrotitrsko ploščo inkubirali 6 ur ter dosledno upoštevali protokol proizvajalca uporabljenega kompleta reagentov (11). Pozitivno kontrolo smo pripravili tako, da smo 45 minut pred iztekom inkubacije v 3 vdolbinice, ki so vsebovale le celice, brez dodatka izvlečka, dodali po $10 \mu\text{L}$ priložene raztopine detergenta (polja pobarvana rumeno v Preglednici XI). Pripravili smo tudi negativno kontrolo, in sicer samo celice LNCaP v gojitvenem mediju (polja pobarvana belo v Preglednici XI). Za slepe kontrole pa smo v 3 vdolbinice odpipetirali le gojitveni medij, v 3 pa gojitveni medij z dodatkom 50% redčitve B_{DPBS} (polja pobarvana rdeče-rjavo v Preglednici XI).

Preglednica XI: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 6-urno inkubacijo. Predstavljene so razporeditve z različnimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{DPBS}) tretiranih mikrokultur celic LNCaP (modra barva ozadja) ter ustreznih kontrol. Negativna kontrola (bela barva ozadja), pozitivna kontrola (rumena barva ozadja) in slepe kontrole (rdeče-rjava barva ozadja).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	LNCaP	LNCaP	LNCaP	LNCaP+50% B_{DPBS}	LNCaP+50% B_{DPBS}	LNCaP+50% B_{DPBS}	LNCaP+40% B_{DPBS}	LNCaP+40% B_{DPBS}	LNCaP+40% B_{DPBS}	LNCaP+30% B_{DPBS}	DPBS
C	DPBS	LNCaP+30% B_{DPBS}	LNCaP+30% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	LNCaP+15% B_{DPBS}	LNCaP+15% B_{DPBS}	DPBS
D	DPBS	LNCaP+15% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP+2,5% B_{DPBS}	LNCaP+2,5% B_{DPBS}	LNCaP+2,5% B_{DPBS}	DPBS
E	DPBS	LNCaP	LNCaP	LNCaP	Medij+50% DPBS	Medij+50% DPBS	Medij+50% DPBS	Medij	Medij	Medij	Medij	DPBS
F	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
G	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
H												

Legenda: Medij – RPMI-1640 z 10% FBS

Iz vseh vdolbinic s celicami in kontrolami smo po 6 urah z multikanalno pipeto odstranili po $50 \mu\text{L}$ medija in vzorce prenesli v novo mikrotitrsko ploščo, kjer smo jim dodali po $50 \mu\text{L}$ reagenta CytoTox 96® in ploščo, zaščiteno pred svetlobo, inkubirali 30 minut na sobni temperaturi. Nato smo v vsako vdolbinico dodali po $50 \mu\text{L}$ raztopine za prekinitev reakcije in znotraj 1 ure s čitalcem izmerili absorbance pri 490 nm ter izračunali % relativne citotoksičnosti z uporabo enačbe 2.

Enačba 2: Izračun deleža relativne citotoksičnosti.

$$\% \text{ relativne citotoksičnosti} = \frac{(m-s)-(n-s)}{(p-s)-(n-s)} \times 100$$

Legenda:

- m – vrednost meritve posameznega vzorca
- n – vrednost meritve negativne kontrole
- p – vrednost meritve pozitivne kontrole
- s – povprečna vrednost meritev slepih kontrol

Ker se je izkazalo, da je zaradi obarvanosti testiranih redčitev osnovne raztopine izvlečka B_{DPBS}, prihajalo do interferenc pri spektrofotometriji, smo v nadalnjih poskusih pripravili slepe kontrole z dodatki vsake od uporabljenih koncentracij B_{DPBS}. Njihove povprečne vrednosti absorbanc smo pri izračunih odštevali od ustreznih posameznih vrednosti meritev v vdolbinicah s celicami. Poleg tega smo se, glede na rezultate pilotnega poskusa, odločili, da bomo v nadaljevanju ugotavliali še citotoksičnosti različnih koncentracij izvlečka po 24-urni inkubaciji.

4.2.4.3 Ugotavljanje obsega zgodnje citotoksičnosti različnih koncentracij osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS na celicah LNCaP s kompletom reagentov Promega CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Pripravili smo 2 mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami in v ustrezeno število le-teh, skladno z delovnim načrtom (Preglednica XII), naselili celice LNCaP. Pri tem smo na prvo mikrotitrsko ploščo nanesli po 2×10^3 celic/vdolbinico, na drugo pa po 4×10^3 celic/vdolbinico. Testirali smo citotoksičnost naslednjih devetih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} (9,07 mg/mL): 50% (4,54 mg/mL), 40% (3,63 mg/mL), 35% (3,17 mg/mL), 30% (2,72 mg/mL), 25% (2,27 mg/mL), 20% (1,81 mg/mL), 15% (1,36 mg/mL), 10% (0,91 mg/mL) in 5% (0,45 mg/mL). Tako kot v pilotnem poskusu, ki smo ga opisali v prejšnjem poglavju, smo pripravili negativne (polja obarvana zeleno v Preglednici XII) in pozitivne kontrole (polja obarvana rdeče-rjavo v Preglednici XII), tem pa smo dodali še slepe kontrolne vzorce z dodatki vsake od uporabljenih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} (polja obarvana rumeno v Preglednici XII). Čas inkubacije po dodatku raztopin izvlečka k celicam smo tokrat podaljšali na 24 ur.

Preglednica XII: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 24-urno inkubacijo. Predstavljene so razporeditve z različnimi

redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{DPBS}) tretiranih mikrokultur celic LNCaP (modra barva ozadja) ter ustreznih kontrol. Negativna kontrola (zelena barva ozadja), pozitivna kontrola (rdeče-rjava barva ozadja) in slepe kontrole (rumena barva ozadja).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	LNCaP, neg	LNCaP, neg	LNCaP, neg	LNCaP, poz	LNCaP, poz	LNCaP, poz	LNCaP+50% B_{DPBS}	LNCaP+50% B_{DPBS}	LNCaP+50% B_{DPBS}	LNCaP+40% B_{DPBS}	DPBS
C	DPBS	LNCaP+40% B_{DPBS}	LNCaP+40% B_{DPBS}	LNCaP+35% B_{DPBS}	LNCaP+35% B_{DPBS}	LNCaP+35% B_{DPBS}	LNCaP+30% B_{DPBS}	LNCaP+30% B_{DPBS}	LNCaP+30% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+25% B_{DPBS}	DPBS
D	DPBS	LNCaP+25% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	LNCaP+20% B_{DPBS}	LNCaP+15% B_{DPBS}	LNCaP+15% B_{DPBS}	LNCaP+15% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	LNCaP+10% B_{DPBS}	DPBS
E	DPBS	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	LNCaP+5% B_{DPBS}	Medij	Medij	Medij	Medij+50% B_{DPBS}	Medij+50% B_{DPBS}	Medij+50% B_{DPBS}	Medij+40% B_{DPBS}	DPBS
F	DPBS	Medij+40% B_{DPBS}	Medij+40% B_{DPBS}	Medij+35% B_{DPBS}	Medij+35% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+30% B_{DPBS}	Medij+25% B_{DPBS}	Medij+25% B_{DPBS}	DPBS	DPBS
G	DPBS	Medij+25% B_{DPBS}	Medij+20% B_{DPBS}	Medij+20% B_{DPBS}	Medij+20% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+15% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	Medij+10% B_{DPBS}	DPBS
H		Medij+5% B_{DPBS}	Medij+5% B_{DPBS}	Medij+5% B_{DPBS}	DPBS	DPBS						

Legenda: Medij – RPMI-1640 z 10% FBS

Določanje obsega citotoksičnosti je potekalo tako, kot je opisano v prejšnjem poglavju (3.2.4.2).

3.2.4.4 Ugotavljanje obsega takojšnje (po 6 urah) in zgodnje (po 24 urah) citotoksičnosti različnih koncentracij osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS na celicah HepG2, s kompletom reagentov Promega CytoTox 96[®] Non Radioactive Cytotoxicity Assay, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Za poskus smo pripravili mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami in skladno z delovnim načrtom, v izbrane vdolbinice naselili po 2×10^3 celic HepG2, v po 80 μL . Po 6-urni oz. 24-urni inkubaciji smo v ustrezne vdolbinice v triplikatih dodali po 20 μL naslednjih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} s koncentracijo 9,07 mg/mL: 50% (4,54 mg/mL), 40% (3,63 mg/mL), 35% (3,17 mg/mL), 30% (2,72 mg/mL), 25% (2,27 mg/mL), 20% (1,81 mg/mL), 15% (1,36 mg/mL), 10% (0,91 mg/mL), 5% (0,45 mg/mL) in 2,5% (0,23 mg/mL). Na enak način kot v prejšnjem poskusu s celicami LNCaP, smo pripravili negativne (polja obarvana zeleno v Preglednici XIII), pozitivne (polja obarvana rdeče-rjava v Preglednici XIII) in slepe kontrole (polja obarvana rumeno v Preglednici XIII).

Preglednica XIII: Shema mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 6-urno oziroma 24-urno inkubacijo. Predstavljene so razporeditve z različnimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (B_{DPBS}) tretiranih mikrokultur celic HepG2 (modra barva ozadja) ter ustreznih kontrol. Negativna

kontrola (zelena barva ozadja), pozitivna kontrola (rdeče-rjava barva ozadja) in slepe kontrole (rumena barva ozadja).

	1	2	3	4	5	30	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	HepG2, neg	HepG2, neg	HepG2, neg	HepG2, poz	HepG2, poz	HepG2, poz	HepG2+50% BOPBS	HepG2+50% BOPBS	HepG2+50% BOPBS	HepG2+40% BOPBS	DPBS
C	DPBS	HepG2+40% BOPBS	HepG2+40% BOPBS	HepG2+35% BOPBS	HepG2+35% BOPBS	HepG2+35% BOPBS	HepG2+30% BOPBS	HepG2+30% BOPBS	HepG2+25% BOPBS	HepG2+25% BOPBS	DPBS	DPBS
D	DPBS	HepG2+25% BOPBS	HepG2+20% BOPBS	HepG2+20% BOPBS	HepG2+20% BOPBS	HepG2+15% BOPBS	HepG2+15% BOPBS	HepG2+15% BOPBS	HepG2+10% BOPBS	HepG2+10% BOPBS	DPBS	DPBS
E	DPBS	HepG2+5% BOPBS	HepG2+5% BOPBS	HepG2+5% BOPBS	HepG2+2,5% BOPBS	HepG2+2,5% BOPBS	HepG2+2,5% BOPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+40% BOPBS	DPBS
F	DPBS	Medij+40% BOPBS	Medij+40% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+25% BOPBS	Medij+25% BOPBS	DPBS
G	DPBS	Medij+25% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+10% BOPBS	Medij+10% BOPBS	Medij+10% BOPBS	DPBS
H	DPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij	Medij	Medij	Medij	DPBS

Legenda: Medij – DMEM-F12 z 10% FBS

Po 6-urni in po 24-urni inkubaciji smo obsege citotoksičnosti določili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.4.2.

3.2.4.5 Ugotavljanje obsega takojšnje (po 6 urah) in zgodnje (po 24 urah) citotoksičnosti različnih koncentracij osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS na celicah Jurkat, s kompletom reagentov Promega CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Na standarden način in skladno z delovnim načrtom, ki je prikazan v Preglednici XIV, smo na mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami pripravili ustrezno število mikrokultur s po 2×10^3 celic Jurkat/vdolbinico (v po 80 μL). Po inkubaciji preko noči, smo v izbrane vdolbinice v triplikatih dodali po 20 μL naslednjih redčitev osnovne raztopine BDPBS s koncentracijo 9,07 mg/mL: 50% (4,54 mg/mL), 40% (3,63 mg/mL), 35% (3,17 mg/mL), 30% (2,72 mg/mL), 25% (2,27 mg/mL), 20% (1,81 mg/mL), 15% (1,36 mg/mL), 10% (0,91 mg/mL), 5% (0,45 mg/mL) in 2,5% (0,23 mg/mL). Na enak način kot v prejšnjih dveh poskusih s celicami LNCaP in HepG2, smo pripravili negativne (polja obarvana zeleno v Preglednici XIV), pozitivne (polja obarvana rdeče-rjava v Preglednici XIV) in slepe kontrole (polja obarvana rumeno v Preglednici XIV).

Preglednica XIV: Shema mikrotitrtske plošče s 96 vdolbinicami s prikazanim delovnim načrtom za pripravo plošče za 6-urno oziroma 24-urno inkubacijo. Predstavljene so razporeditve z različnimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke (BDPBS) tretiranih mikrokultur celic Jurkat (modra barva ozadja) ter ustreznih kontrol. Negativna kontrola (zelena barva ozadja), pozitivna kontrola (rdeče-rjava barva ozadja) in slepe kontrole (rumena barva ozadja).

	1	2	3	4	5	30	7	8	9	10	11	12
A	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS	DPBS
B	DPBS	Jurkat, neg	Jurkat, neg	Jurkat, neg	Jurkat, poz	Jurkat, poz	Jurkat, poz	Jurkat+50% BDPBS	Jurkat+50% BDPBS	Jurkat+50% BDPBS	Jurkat+40% BDPBS	DPBS
C	DPBS	Jurkat+40% BDPBS	Jurkat+40% BDPBS	Jurkat+35% BDPBS	Jurkat+35% BDPBS	Jurkat+35% BDPBS	Jurkat+30% BDPBS	Jurkat+30% BDPBS	Jurkat+30% BDPBS	Jurkat+25% BDPBS	Jurkat+25% BDPBS	DPBS
D	DPBS	Jurkat+25% BDPBS	Jurkat+20% BDPBS	Jurkat+20% BDPBS	Jurkat+20% BDPBS	Jurkat+15% BDPBS	Jurkat+15% BDPBS	Jurkat+15% BDPBS	Jurkat+10% BDPBS	Jurkat+10% BDPBS	Jurkat+10% BDPBS	DPBS
E	DPBS	Jurkat+5% BDPBS	Jurkat+5% BDPBS	Jurkat+5% BDPBS	Jurkat+2,5% BDPBS	Jurkat+2,5% BDPBS	Jurkat+2,5% BDPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+50% BOPBS	Medij+40% BOPBS	DPBS
F	DPBS	Medij+40% BOPBS	Medij+40% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+35% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+30% BOPBS	Medij+25% BOPBS	Medij+25% BOPBS	DPBS
G	DPBS	Medij+25% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+20% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+15% BOPBS	Medij+10% BOPBS	Medij+10% BOPBS	Medij+10% BOPBS	DPBS
H	DPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij+2,5% BOPBS	Medij	Medij	Medij	Medij	DPBS

Legenda: Medij - RPMI-1640 z 10% FBS

Po 6-urni in po 24-urni inkubaciji smo obsege citotoksičnosti določili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.4.2.

3.2.5 Statistične analize in grafična predstavitev rezultatov

Izmerjene rezultate smo uredili, statistično obdelali ter grafično predstavili z uporabo računalniških programov Excel (Microsoft, ZDA) in GraphPad Prism® v. 6.07 (GraphPad Software, ZDA). Uporabili smo: deskriptivno statistiko za določanje povprečnih vrednosti in standardnih odklonov (SD; angl. standard deviation) ter enosmerne in dvosmerne analize varianc (ANOVA) z Dunnett-ovo post-hoc analizo za primerjanje razlik med povprečnimi vrednostmi meritev absorbanc pri posameznih uporabljenih redčitvah oz. koncentracijah osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke in povprečno vrednostjo pozitivne kontrole. Kot statistično značilne smo obravnavali vse tiste rezultate, katerih vrednosti p so bile manjše ali enake 0,05 ($p \leq 0,05$).

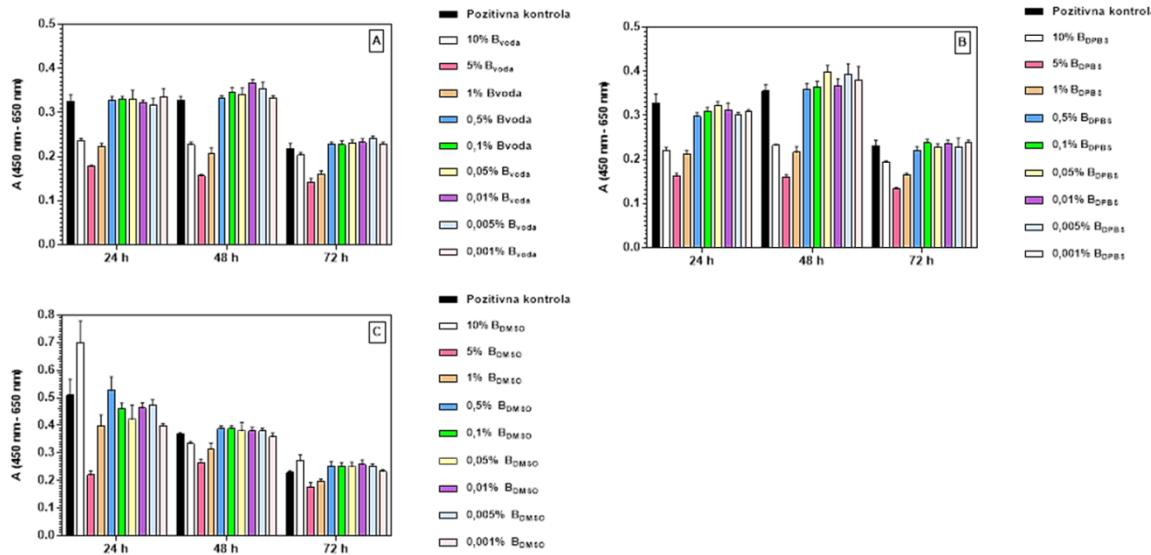
4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 Določanje obsega proliferacije človeških rakavih celičnih linij *in vitro* v prisotnosti različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke

4.1.1 Določanje obsega proliferacije celic LNCaP v prisotnosti različnih redčitev treh osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke v H₂O, DPBS in DMSO

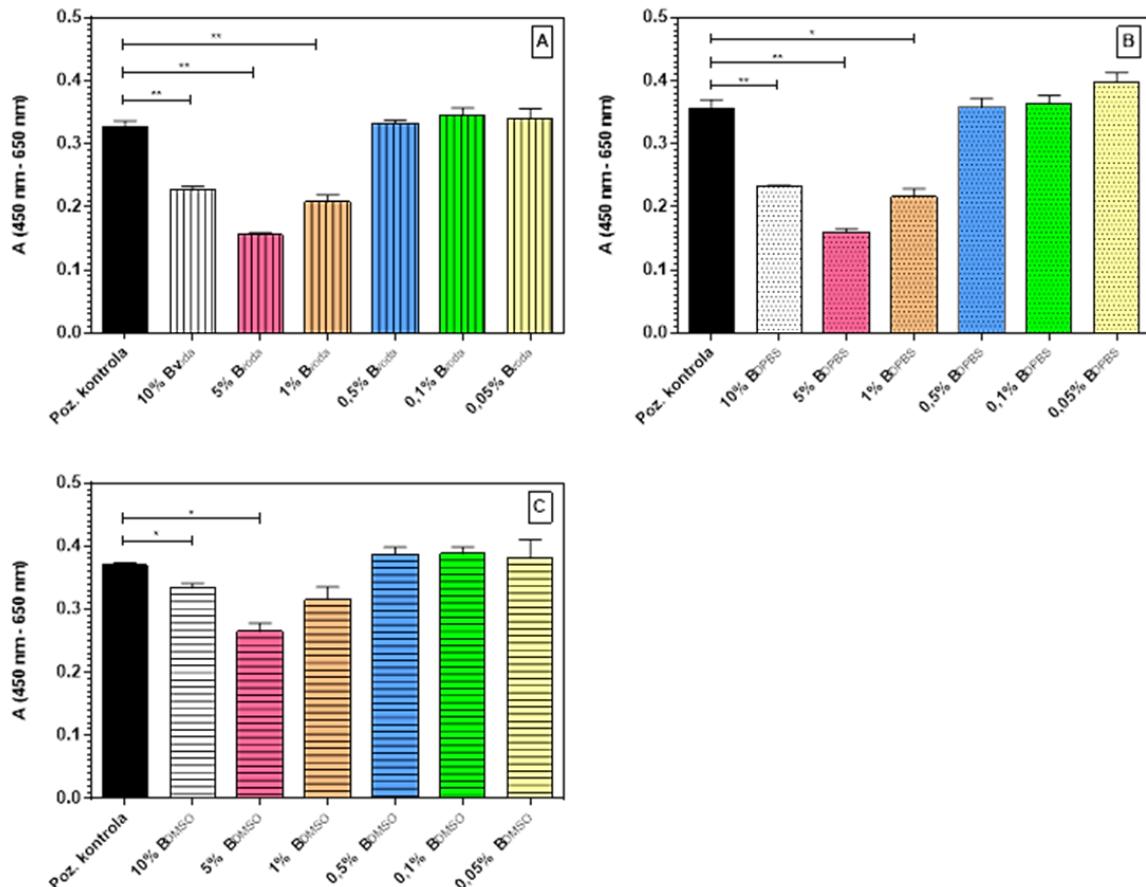
Celice LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) so izolirali leta 1977 iz metastaze v bezgavki 50-letnega belca z rakiom prostate (12). Gre za adherentne epitelne celice, ki v celični kulturi rastejo hitro (njihov podvojitveni čas je 60 ur), in sicer tako v agregatih kot tudi posamezno. Predstavljajo zanimiv eksperimentalni celični model, saj so edina doslej znana celična linija raka prostate, katere rast je odvisna od androgenov. Celice LNCaP proizvajajo značilno alkalno fosfatazo, za prosto specifičen antigen (PSA) ter polipeptidne dejavnike, kot sta npr. epidermalni rastni dejavnik (EGF) in transformirajoči rastni dejavnik (TGF- α) (12). Zaradi navedenih dejstev je ta celični model zelo uporaben tudi za študije vplivov posameznih potencialnih učinkov na rak prostate (13).

Najprej smo s pilotnimi poskusi določili obsegge proliferacije celic LNCaP v prisotnosti različnih redčitev osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke, ki smo jih pripravili z uporabo treh različnih topil (H₂O, DPBS in DMSO), in sicer po 24, 48 in 72 urah (Slike 2 in 3).



Slika 2: Proliferacija celic LNCaP (2×10^3 /kulturo) po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji z različnimi redčitvami (v/v) treh osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke. A - osnovna raztopina v H_2O (B_{voda}); B - osnovna raztopina v pufru DPBS (B_{DPBS}); C - osnovna raztopina v DMSO (B_{DMSO}). Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov ($n=3$) s standardnimi odkloni (SD). Legenda: navedene odstotne koncentracije (v/v) so tiste, ki so bile dejansko prisotne v posameznih kulturah celic LNCaP.

Ugotovili smo, da so v primeru vseh treh osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke (H_2O , DPBS ali DMSO) celično proliferacijo najbolj zavrle njihove 5% redčitve (v/v). Za bolj ilustrativen in pregleden prikaz ugotovljenih učinkov izvlečka smo zaviranje proliferacije celic LNCaP *in vitro* grafično predstavili z meritvami, opravljenimi po njihovi 48-urni inkubaciji z 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% in 0,05% redčitvami (v/v) vsake od osnovnih raztopin (H_2O , DPBS in DMSO) (Slika 3).

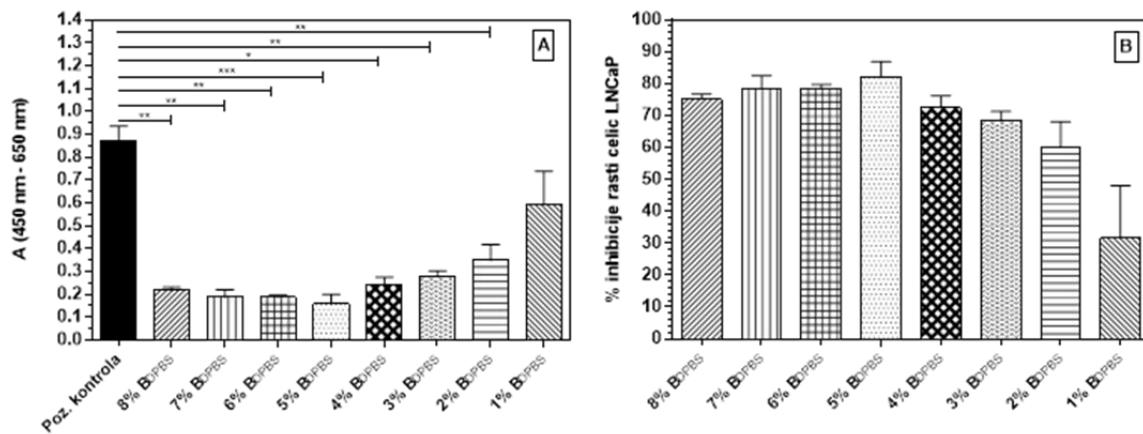


Slika 3: Proliferacija celic LNCaP (2x10³/kulturo) po 48-urni inkubaciji s šestimi različnimi redčitvami (v/v) treh osnovnih raztopin izvlečka lesa bele jelke različnih koncentracij. A - osnovna raztopina v H₂O (B_{voda}); B - osnovna raztopina v DPBS (B_{PBS}); C - osnovna raztopina v DMSO (B_{DMSO}). Navedene odstotne koncentracije (v/v) so tiste, ki so bile dejansko prisotne v posameznih kulturah celic LNCaP. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). Statistično značilne razlike smo določili z enosmerno analizo varianc (ANOVA) in Dunnett-ovo post-hoc analizo. Legenda: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001

Na osnovi izsledkov uvodnih poskusov smo se odločili, da bomo v vseh nadaljnjih eksperimentih uporabljali redčitve osnovne raztopine izvlečka v pufru DPBS (B_{PBS}), med drugim tudi zato, ker je vrednost pH tega topila znotraj fiziološkega interavala (pH = 7,0 - 7,4).

4.1.2 Natančnejše ugotavljanje vplivov različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS (B_{DPBS}), na rast celične linije LNCaP

Za poskus smo izbrali serijo redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS} (8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% in 1%, vse v/v), s katerimi smo, glede na predhodne rezultate, želeli natančneje določiti, katera med njimi najmočneje zavre proliferacijo celic LNCaP po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji. Rezultati poskusa po 72-urni inkubaciji, ko je bila inhibicija celične proliferacije največja, so prikazani na Sliki 4.

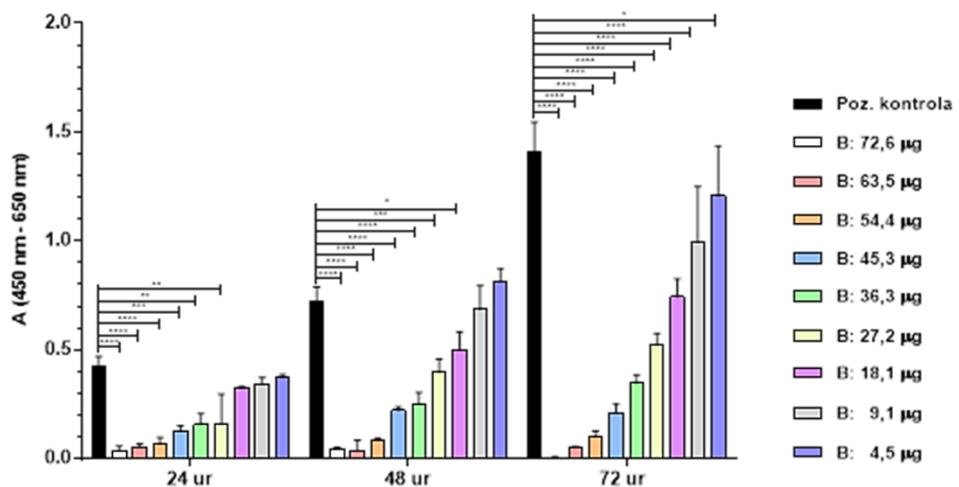


Slika 4: Obseggi proliferacije (A) in odstotki inhibicije rasti (B) celic LNCaP (2×10^3 /kulturo) po njihovi 72-urni inkubaciji z izbranimi redčitvami osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS} . Navedene odstotne koncentracije (v/v) so tiste, ki so bile dejansko prisotne v posameznih kulturah celic LNCaP. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). B - odstotki inhibicije rasti celic so izračunani glede na povprečno vrednost pozitivne kontrole. A - statistično značilne razlike med izmerjenimi absorbancami smo določili z enosmerno analizo varianc (ANOVA) in Dunnett-ovo post-hoc analizo. Legenda: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001**

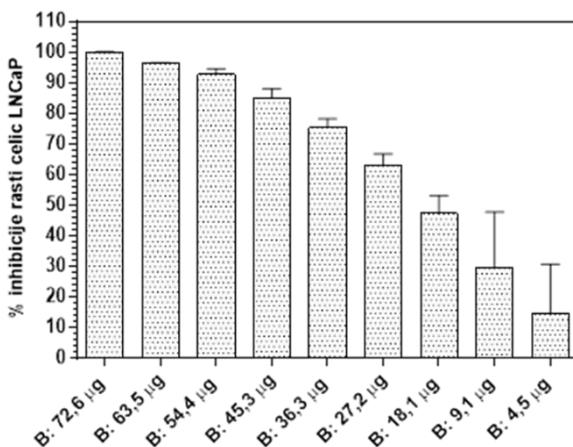
Proliferacija celic LNCaP je bila, glede na pozitivno kontrolo, statistično značilno manjša v prisotnosti koncentracij 7 od 8 uporabljenih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} (od 8% do 2%), najnižjo vrednost absorbance pa smo ponovno, tako kot v pilotnem poskusu, izmerili v primeru 5% redčitve (Slika 4A). Rezultate smo prikazali tudi v obliki odstotkov inhibicije celične rasti, glede na povprečno vrednost pozitivne kontrole (Slika 4B). Pri uporabi 5% raztopine izvlečka je odstotek inhibicije presegel 80% (81,9%).

4.1.3 Ugotavljanje vplivov različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS}, na rast celične linije LNCaP, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Ker smo tekom uvodnih poskusov ugotovili, da raztopine izvlečka povzročajo nespecifično absorbanco ozadja in s tem vplivajo na rezultate meritev, smo ugotavljanje obsegala proliferacije celic LNCaP v prisotnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke v DPBS (B_{DPBS}) ponovili tako, da smo od meritev odšteli povprečne vrednosti absorbanci ustreznih slepih kontrol. Meritve absorbanci smo izvedli po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji celic z izbranimi redčitvami B_{DPBS}, pri čemer smo uporabili osnovno raztopino izvlečka z znano koncentracijo (m/v). Preskusili smo naslednje koncentracije raztopin B_{DPBS}: 3,63 mg/mL (72,6 µg/celično kulturo), 3,17 mg/mL (63,5 µg/celično kulturo), 2,72 mg/mL (54,4 µg/celično kulturo), 2,27 mg/mL (45,4 µg/celično kulturo), 1,81 mg/mL (36,3 µg/celično kulturo), 1,36 mg/mL (27,2 µg/celično kulturo), 0,91 mg/mL (18,1 µg/celično kulturo), 0,45 mg/mL (9,1 µg/celično kulturo) in 0,23 mg/mL (4,5 µg/celično kulturo). Rezultate poskusa prikazujeta Sliki 5 in 6.



Slika 5: Obsegji proliferacije celic LNCaP po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji z različnimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol. Navedene so količine izvlečka, ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). Statistično značilne razlike med izmerjenimi absorbancami smo določili z dvosmerno analizo varianc (ANOVA) in Dunnett-ovo post-hoc analizo. Legenda: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001

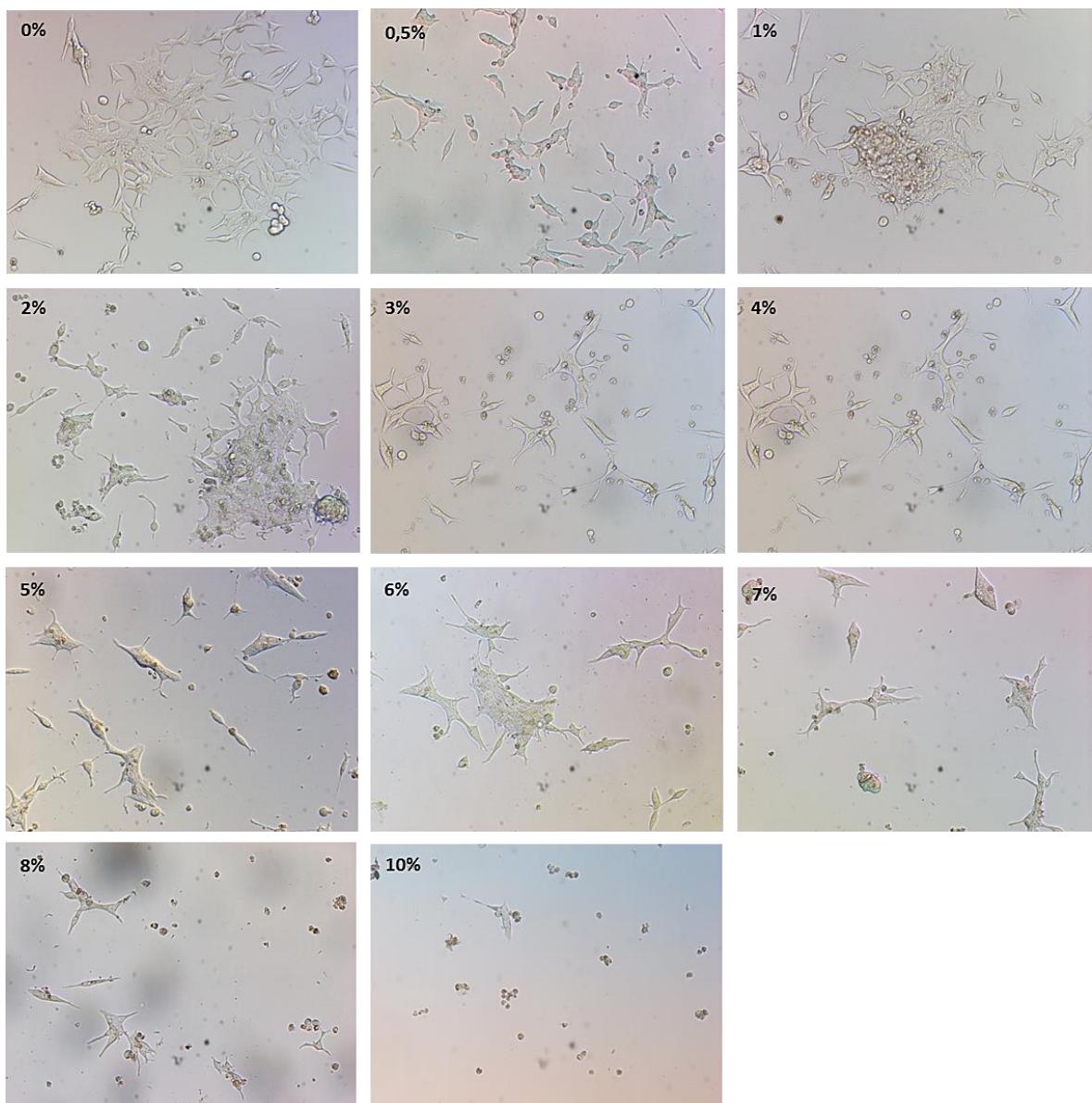


Slika 6: Prikaz odstotkov inhibicije rasti celic LNCaP po 72 urah inkubacije z izbranimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slehih kontrol. Navedene so količine izvlečka, ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). Odstotki inhibicije rasti celic so izračunani glede na povprečno vrednost pozitivne kontrole.

Tokrat smo opazili jasno koncentracijsko-odvisno inhibicijo proliferacije celic LNCaP in obenem nedvoumno potrdili, da izvleček lesa bele jelke učinkovito zavira njihovo rast v pogojih *in vitro*.

4.1.4 Mikroskopska detekcija morfoloških sprememb in obsega rasti celic LNCaP, gojenih 72 ur v prisotnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka B_{DPBS}

Kulture celic LNCaP, gojene 72 ur v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami, bodisi v odsotnosti (0%; pozitivna kontrola) ali prisotnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS}, in sicer 10%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% in 0,5% (vse v/v), smo opazovali z invertnim mikroskopom in jih fotografirali (Slika 7).



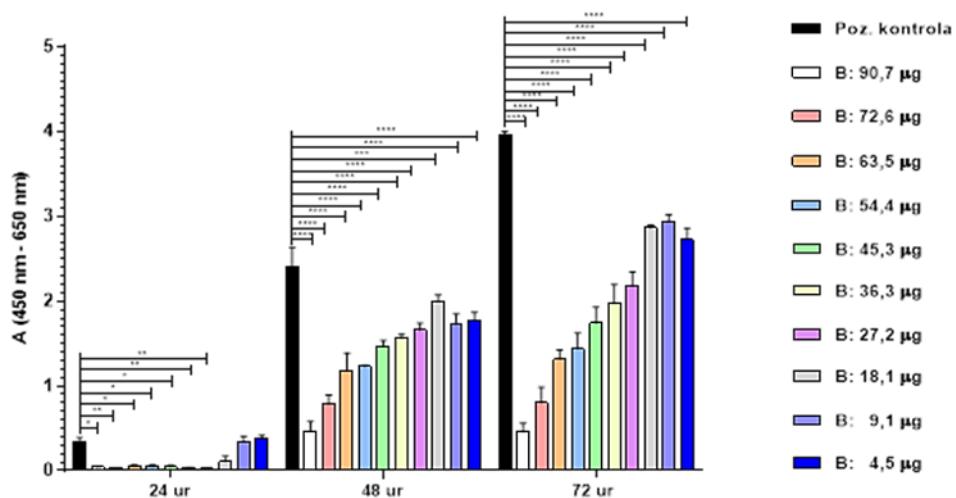
Slika 7: Mikrofotografije celičnih kultur celic LNCaP, gojenih 72 ur v odsotnosti (0%) in prisotnosti izbranih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke BDPBS. Na slikah so prikazane koncentracije (%), ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Povečava: 10x.

Ugotovili smo, da prisotnost višjih koncentracij izvlečka (10 – 3%), v primerjavi s pozitivno kontollo (0%), močno zmanjša število celic v kulturah in izrazito spremeni njihovo morfologijo.

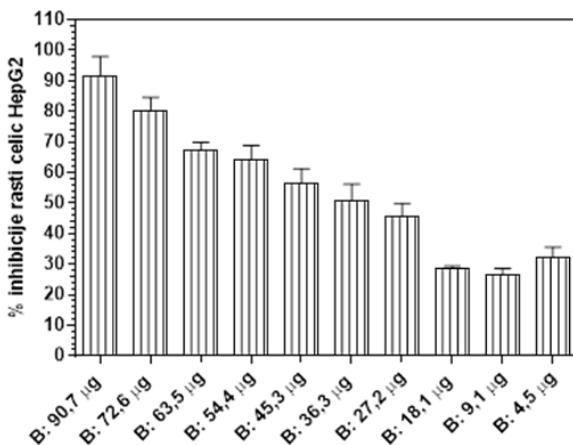
4.1.5 Ugotavljanje vplivov različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS}, na rast celične linije HepG2, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Celice HepG2 so nesmrtna celična linija, ki so jo izolirali iz jeter 15-letnega belca z dobro diferenciranim jetrnoceličnim rakom (hepatocelularnim karcinom). Gre za adherentne celice, ki so morfološko podobne epitelnim, proizvajajo pa številne plazemske proteine, npr. transferin, fibrinogen, plazminogen in albumin. Njihovo rast *in vitro* stimulira rastni hormon somatotropin, sicer pa jih lahko dokaj enostavno namnožimo v večjem številu (14).

Vplive izvlečka lesa bele jelke na proliferacijo celic HepG2 smo ugotavljali tako kot v primeru celic LNCaP (poglavlje 4.1.3), rezultati poskusa pa so prikazani na Slikah 8 in 9.



Slika 8: Obsegji proliferacije celic HepG2 po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji z različnimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol. Navedene so količine izvlečka, ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). Statistično značilne razlike med izmerjenimi absorbanciami smo določili z dvosmerno analizo varianc (ANOVA) in Dunnett-ovo post-hoc analizo. Legenda: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001



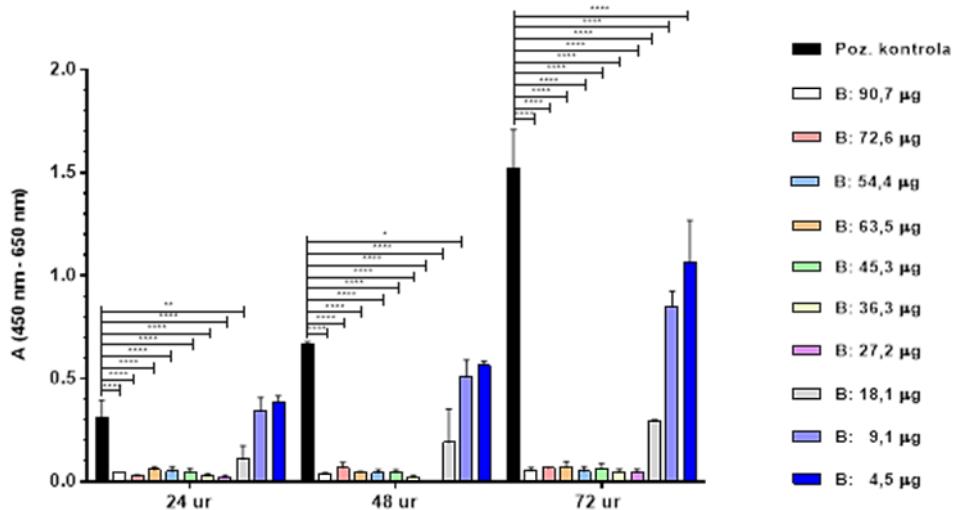
Slika 9: Prikaz odstotkov inhibicije rasti celic HepG2 po 72 urah inkubacije z izbranimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol. Navedene so količine izvlečka, ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). Odstotki inhibicije rasti celic so izračunani glede na povprečno vrednost pozitivne kontrole.

Ugotovili smo, da so preskušane redčitve osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS} v vseh treh časovnih intervalih (24, 48 ter 72 ur) koncentracijsko-odvisno zavirale proliferacijo celic HepG2, pri čemer pa je bil potek navideznih krivulj inhibicije celične rasti manj enakomeren kot v primeru celic LNCaP (primerjava rezultatov na Slikah 5 in 8). Te razlike so najverjetneje posledica različnih mehanizmov zaviranja rasti, ki jih sprožijo sestavine izvlečka v celicah posamezne celične linije.

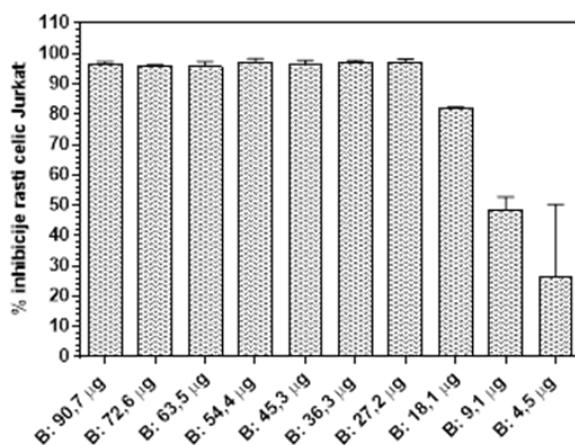
4.1.6 Ugotavljanje vplivov različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS}, na rast celične linije Jurkat, ob upoštevanju ustreznih slepih kontrol

Celice Jurkat so nesmrtna celična linija limfocitov T, ki so jo izolirali v poznih 70-tih prejšnjega stoletja iz periferne krvi 14-letnega belca s T-celično levkemijo. Zanje je značilno, da proizvajajo interlevkin 2 (IL-2), najpogosteje pa jih uporabljo za preučevanje mehanizmov delovanja zdravil ter obsevanja, raziskovanje mehanizmov akutne T-celične levkemije, T-celične signalizacije ter izražanja kemokinov receptorjev, ki sodelujejo pri virusnih okužbah, predvsem pri okužbi z virusom HIV (15). Za razliko od celic LNCaP in HepG2, celice Jurkat niso adherentne, zato med gojenjem *in vitro* proliferirajo v suspenziji.

Vplive različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS} na rast celič Jurkat smo ugotavljali na enak način kot predhodno, z uporabo celičnih linij LNCaP in HepG2. Rezultati poskusa so grafično predstavljeni na Slikah 10 in 11.



Slika 10: Obseg proliferacije celič Jurkat po 24-, 48- in 72-urni inkubaciji z različnimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slehih kontrol. Navedene so količine izvlečka, ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). Statistično značilne razlike med izmerjenimi absorbancami smo določili z dvosmerno analizo varianc (ANOVA) in Dunnett-ovo post-hoc analizo. Legenda: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001



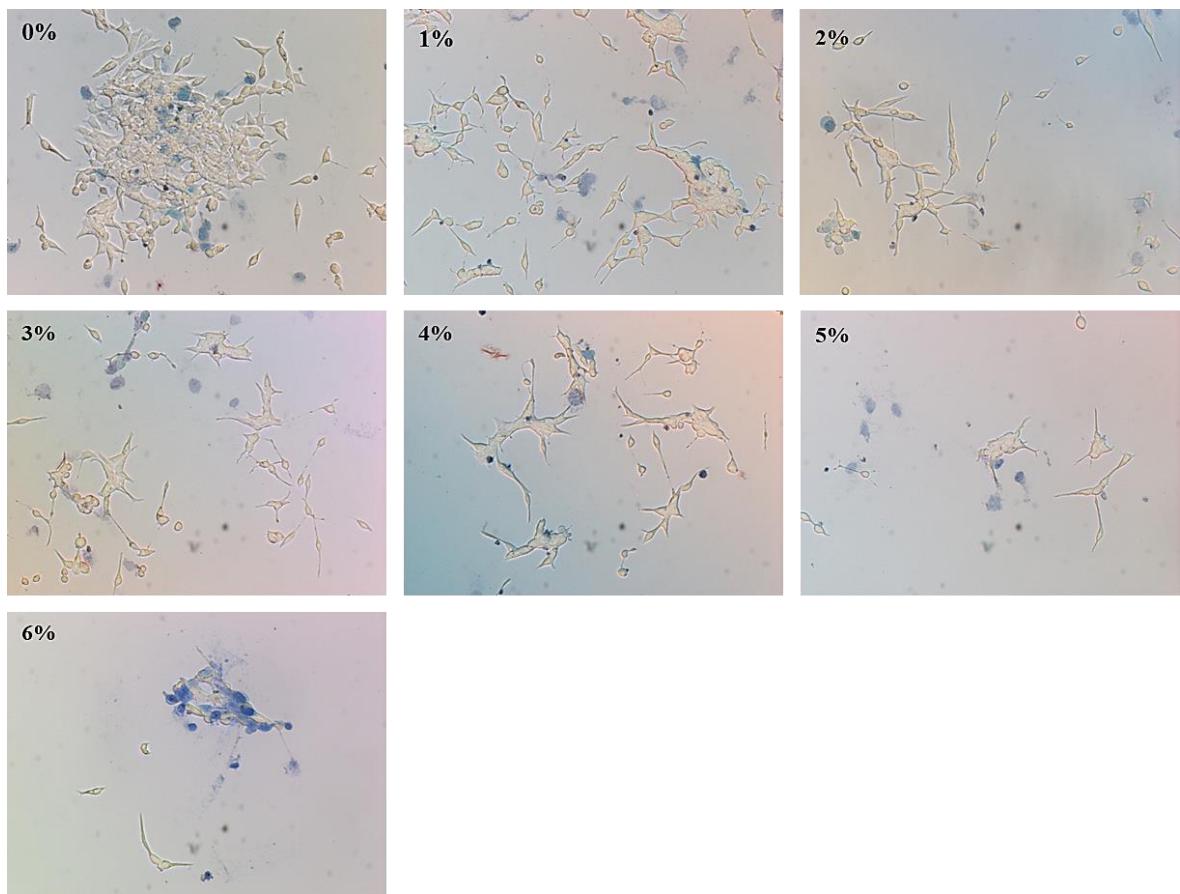
Slika 11: Prikaz odstotkov inhibicije rasti celič Jurkat po 72 urah inkubacije z izbranimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke, pripravljenimi z redčenjem osnovne raztopine B_{DPBS} (90,7 mg/mL), ob upoštevanju ustreznih slehih kontrol. Navedene so količine izvlečka, ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). Odstotki inhibicije rasti celič so izračunani glede na povprečno vrednost pozitivne kontrole.

Ugotovili smo, da je izvleček lesa bele jelke v območju od 90,7 µg do vključno 27,2 µg zelo močno, za več kot 95%, zavrl proliferacijo celic Jurkat, in to po vseh treh inkubacijskih časih (Sliki 10 in 11). Preostale tri količine, in sicer 18,1 µg (82,1% inhibicija po 72 urah), 9,1 µg (48,5% inhibicija po 72 urah) in 4,5 µg (26,4% inhibicija po 72 urah) pa so celično rast inhibirale manj intenzivno, poleg tega je bila inhibicija znotraj tega omejenega območja koncentracijsko odvisna, kar se pri preostalih preskušanih redčitvah, ki so vsebovale večjo količino izvlečka, ni izkazalo. V primerjavi z zaviralnim delovanjem izvlečka na rast celic LNCaP in HepG2, je le-ta najmočneje in v najširšem koncentracijskem intervalu inhibiral proliferacijo celic Jurkat. Glede na naše izsledke pa bi bilo zanimivo preskusiti delovanje različnih koncentracij izvlečka lesa bele jelke tudi na poliklonsko izzvano proliferacijo normalnih limfocov T. Opisane razlike so najverjetneje posledica različnih lastnosti uporabljenih celičnih linij. Seveda pa bi bilo ključno odkriti in raziskati mehanizme, preko katerih sestavine izvlečka lesa bele jelke inhibitajo rast celic vsake od uporabljenih celičnih linij.

4.2 Ugotavljanje citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke BDPBS

4.2.1 Poskusno ugotavljanje obsega citotoksičnega delovanja različnih redčitev osnovne raztopine BDPBS na celice LNCaP, z uporabo tripanskega modrila

Tripansko modrilo je barvilo, ki prodre izključno v notranjost poškodovanih oz. mrtvih celic, zato lahko z njegovo uporabo določimo deleže živih in mrtvih celic v celičnih suspenzijah in adherentnih kulturah. Kulturam s po 6×10^3 celic LNCaP v mikrotitrski plošči s 24 vdolbinami smo po 24-urni inkubaciji dodali po 60 µl izbranih redčitev osnovne raztopine izvlečka v DPBS (30%, 25%, 20%, 15%, 10% in 5%, vse v/v) in jih inkubirali 72 ur. Nato smo odstranili medij, celične kulture sprali, jim dodali razredčeno raztopino tripanskega modrila, jo odstranili, nato pa pod invertnim mikroskopom ocenili število mrtvih, modro obarvanih celic v posamezni vdolbini mikrotitrsko plošče. Rezultate smo primerjali z negativno kontrolo, v kateri celic pedvodno nismo tretirali z izvlečkom (Slika 12).

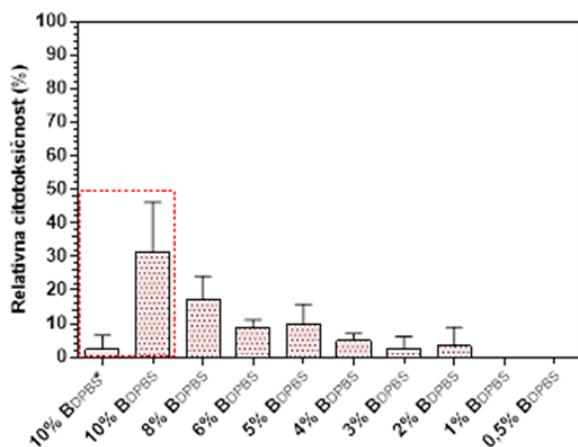


Slika 12: Mikrofotografije kultur celic LNCaP po 72 urah inkubacije brez (0%) ali z različnimi koncentracijami izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS}, obarvanih s tripanskim modrilom. Koncentracije (%) na slikah so tiste, ki so bile dejansko prisotne v posamezni celični kulturi. Povečava: 10x.

Največ mrtvih celic smo opazili v kulturi, ki smo jo gojili v prisotnosti najvišje koncentracije B_{DPBS}. Ker smo med spiranjem celičnih kultur, po naši oceni, izgubili kar nekaj celic, so rezultati testa zgolj informativni. V kolikor bi želeli uporabljati ta način ugotavljanja citotoksičnosti, bi ga morali temeljito optimizirati, pri tem pa nikakor ne bi mogli dobiti natančnih rezultatov, zato bi bil zgolj informativen. Kljub temu pa smo, glede na izsledke, ki so prikazani na Sliki 12, sklepali, da je izvleček v uporabljenih koncentracijah deloval šibko citotoksično na celice LNCaP. Odločili smo se, da bomo v nadaljevanju za vrednotenje citotoksičnosti izvlečka lesa bele uporabljali komercialno dostopni test CytoTox 96[®] Non Radioactive Cytotoxicity Assay, proizvajalca Promega.

4.2.2 Pilotno ugotavljanje obsega takojšnje citotoksičnosti (po 6 urah) različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} na celice LNCaP, s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay

Pilotno določanje citotoksičnosti izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS} smo opravili po 6 urah inkubacije celic LNCaP (po 2×10^3 /vdolbinico oz. kulturo) s po 20 µL naslednjih redčitev (v/v) osnovne raztopine B_{DPBS}, v triplikatih: 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% in 2,5%. V poskusu smo pripravili tudi pozitivno (celice LNCaP gojene brez prisotnosti izvlečka, ki smo jih lizirali z raztopino detergenta – 100% citotoksičnost) in negativno kontrolo (celice LNCaP gojene brez prisotnosti izvlečka) ter dve slepi kontroli (samo gojitveni medij in medij z dodatkom 20 µL najvišje uporabljene koncentracije izvlečka). Rezultati v obliki % relativne citotoksičnosti, ki smo jih izračunali iz izmerjenih vrednosti absorbanc pri 490 nm s pomočjo Enačbe 2 (poglavlje 3.2.4.2), so prikazani na Sliki 13.



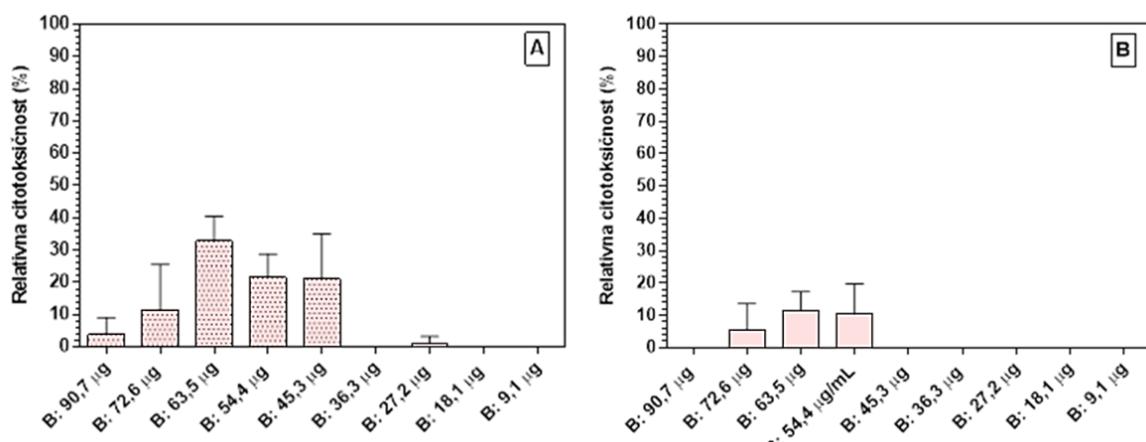
Slika 13: Prikaz odstotkov relativne citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka B_{DPBS} na celicah LNCaP, po 6-urni inkubaciji. Navedene so koncentracije (v/v), ki so bile dejansko prisotne v posameznih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD). Črtkani pravokotnik v rdeči barvi omejuje odstotka relativnih citotoksičnosti, ki smo ju dobili potem, ko smo od posameznih meritev odšteli bodisi povprečno vrednost slepe kontrole samega gojitvenega medija, brez dodanega izvlečka (10% B_{DPBS}) ali pa povprečno vrednost slepe kontrole, pripravljene iz gojitvenega medija z dodatkom 20 µL 50% redčitve osnovne raztopine izvleča (10% B_{DPBS}*). Pri izračunih vseh ostalih vrednosti pa smo odšteli izključno povprečne vrednosti slepe kontrole, ki je vsebovala le gojitveni medij.

Zmero oz. nizko citotoksičnost, ki ni presegla 20%, smo zaznali v prisotnosti vseh redčitev B_{DPBS}, z izjemo 1% in 0,5% koncentracije. Ugotovili smo, da je na obseg relativne citotoksičnosti vplivalo nespecifično ozadje, ki so ga povzročile obarvane raztopine izvlečka (Slika 13). Zato smo se odločili, da bomo v nadaljnjih poskusih obvezno pripravili in pri-

izračunih upoštevali slepe kontrole za vsako od preskušanih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} . Prav tako smo sklenili, da bomo obseg citotoksičnosti merili tudi po 24-urni inkubaciji.

4.2.3 Ugotavljanje obsega zgodnje citotoksičnosti (po 24 urah) redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} na celice LNCaP, s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay

Po 24 urah inkubacije kultur s po 2×10^3 in 4×10^3 celic LNCaP/vdolbinico mikrotitrske plošče, v prisotnosti izbranih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele B_{DPBS} , s koncentracijami: 90,7 µg/celično kulturo, 72,6 µg/ celično kulturo, 63,5 µg/ celično kulturo, 54,4 µg/ celično kulturo, 45,3 µg/ celično kulturo, 36,3 µg/ celično kulturo, 27,2 µg/ celično kulturo, 18,1 µg/ celično kulturo in 9,1 µg/ celično kulturo, smo izmerili absorbance in izračunali obsege citotoksičnosti. Pri tem smo upoštevali izmerjene vrednosti ustreznih slepih kontrol. Rezultate prikazuje Slika 14.



Slika 14: Prikaza odstotkov relativne citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke B_{DPBS} , na celice LNCaP, po 24 urah inkubacije. A - 2.000 celic/vdolbinico; B - 4.000 celic/vdolbinico. Navedene so količine izvlečka, ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov ($n=3$) s standardnimi odkloni (SD).

Na kulture s po 2×10^3 celicami LNCaP so zmerno citotoksično delovale količine izvlečka od 90,7 µg do vključno 45,3 µg (Slika 14A). Zanimivo je, da najvišja uporabljenega količina izvlečka (90,7 µg) ni povzročila največjega obsega relativne citotoksičnosti, ki smo ga sicer

zaznali pri $63,5 \mu\text{g}$ (32,8%). Vzrok za to bi bila lahko kompleksna sestava izvlečka lesa bele jelke, zaradi katere bi ta v določenih koncentracijah oz. količinah glede na število v posamezni kulturi prisotnih celic LNCaP deloval manj, v drugih pa bolj citotoksično.

V primeru uporabe 4×10^3 celic/kulturo so bili odstotki relativne citotoksičnosti pričakovano nižji in omejeni le na prisotnost $72,6 \mu\text{g}$, $63,5 \mu\text{g}$, in $54,4 \mu\text{g}$ izvlečka, pri čemer smo najvišjo vrednost (11,6%) ponovno določili pri $63,5 \mu\text{g}$ (Slika 11B).

V poskusih, v katerih smo spremljali zaviralne učinke izvlečka lesa bele jelke na rast celic LNCaP, smo ugotovili, da so bile v vseh časovnih točkah (24, 48 in 72 ur) najučinkovitejše najvišje uporabljene koncentracije redčitev osnovne raztopine B_{DPBS}, in sicer $72,6 \mu\text{g}$, $63,5 \mu\text{g}$, $54,4 \mu\text{g}$ in $45,3 \mu\text{g}$ (Slika 5). Glede na razmeroma majhen prispevek citotoksičnosti (največ 32,8% po 24 urah) sklepamo, da testirane količine izvlečka lesa bele jelke zavirajo rast še preko drugih, zazdaj še naznanih mehanizmov, ki jih bo potrebno raziskati. Nenazadnje pa moramo biti pozorni tudi na dejstvo, da ima citoplazemski encim laktatna dehidrogenaza (LDH), ki se sprosti iz liziranih oziroma poškodovanih celic in smo ga določali s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay, razpolovno dobo približno 9 ur. Zato bi bili lahko rezultati določanja obsega citotoksičnosti po 24 urah do določene mere vprašljivi.

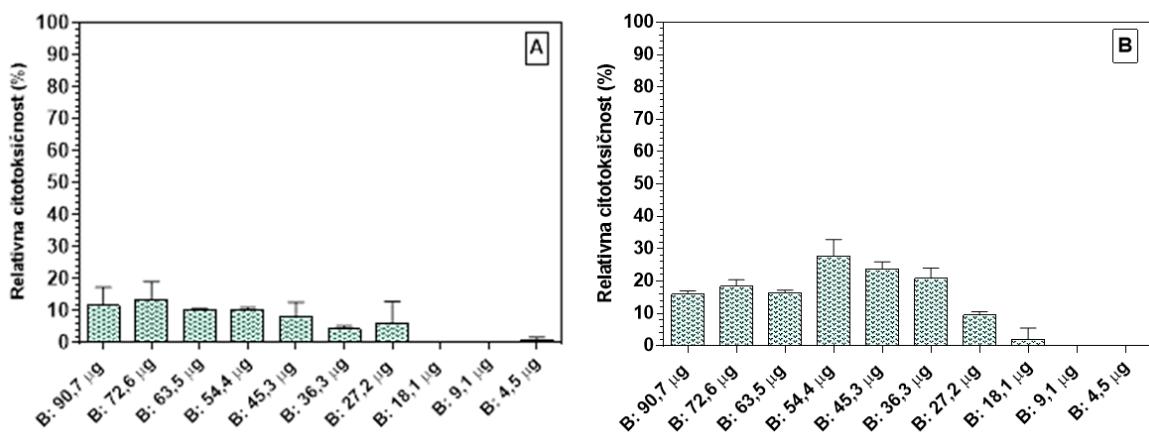
4.2.4 Ugotavljanje obsega takojšnje (po 6 urah) in zgodnje citotoksičnosti (po 24 urah) različnih redčitev osnovne raztopine B_{DPBS} na celice HepG2, s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay

Obsege citotoksičnosti $90,7 \mu\text{g}$, $72,6 \mu\text{g}$, $63,5 \mu\text{g}$, $54,4 \mu\text{g}$, $45,3 \mu\text{g}$, $36,3 \mu\text{g}$, $27,2 \mu\text{g}$, $18,1 \mu\text{g}$ in $9,1 \mu\text{g}$ izvlečka bele jelke (uporaba redčitev osnovne raztopine B_{DPBS}) smo na enak način kot v primeru celic LNCaP ugotavljali tudi v kulturah s po 2×10^3 celic HepG2. Tokrat, tako po 6 kot po 24 urah inkubacije, nismo zaznali nobenega citotoksičnega učinka. Pravzaprav ni presenetljivo, da je citotoksičnost izvlečka lesa bele jelke odvisna tudi od vrste uporabljeni rakave celične linije. Najverjetnejše je v primeru celic HepG2 pomembno dejstvo, da proizvajajo številne plazemske proteine, ki lahko vežejo polifenolne spojine v izvlečku in s tem preprečijo njihovo neposredno citotoksično delovanje. Ker pa smo v predhodnih poskusih dokazali, da izvleček bele jelke močno zavira proliferacijo teh celic

(Sliki 8 in 9), so za ta efekt očitno odgovorni drugi, necitotoksični mehanizmi, ki jih še ne poznamo, bodo pa tarče nadalnjih raziskav.

4.2.5 Ugotavljanje obsega takojšnje (po 6 urah) in zgodnje citotoksičnosti (po 24 urah) različnih redčitev osnovne raztopine BDPBS na celice Jurkat, s testom CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay

Citotoksičnost 90,7 µg, 72,6 µg, 63,5 µg, 54,4 µg, 45,3 µg, 36,3 µg, 27,2 µg, 18,1 µg in 9,1 µg izvlečka bele jelke (uporaba redčitev osnovne raztopine BDPBS) smo na enak način kot v primeru celic LNCaP in HepG2 ugotavljali tudi z uporabo kultur celične linije Jurkat (2×10^3 celic/kulturo). Rezultati poskusa so predstavljeni na Sliki 15.



Slika 15: Prikaza odstotkov relativne citotoksičnosti različnih redčitev osnovne raztopine izvlečka lesa bele jelke BDPBS, na celice Jurkat, po 6 (A) in 24 urah (B) inkubacije. Navedene so količine izvlečka, ki so bile dejansko prisotne v posameznih celičnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti meritev triplikatov (n=3) s standardnimi odkloni (SD).

Medtem, ko so bili po 6 urah inkubacije sicer šibki citotoksični učinki (najvišja, 13,5% relativna citotoksičnost v prisotnosti 72,6 µg) videti odvisni od uporabljenih količin izvlečka (Slika 15A), pa se je po 24-urni inkubaciji citotoksičnost nekoliko povečala pri uporabi 54,4 µg (27,7%), 45,3 µg (23,7%) in 36,3 µg (20,8%) (Slika 15B). Poleg že navedenih predpostavk glede različnih vplivov izvlečka na različne vrste celic ter morebitne vprašljivosti rezultatov določanja obsega citotoksičnosti na osnovi LDH po 24-urni inkubaciji, je vsekakor pomembno tudi dejstvo, da so celice Jurkat za razliko od celičnih linij LNCaP in HepG2 neadherentne.

Glede na ugotovitev, da izvleček lesa bele jelke zelo močno in v širokem koncentracijskem območju zavira rast celic Jurkat (Sliki 10 in 11), medtem ko nanje deluje le šibko citotoksično, lahko ponovno trdimo, da so za inhibicijo celične proliferacije tudi v tem primeru odgovorni še neznani mehanizmi, ki jih bo potrebno odkriti in raziskati. Poleg tega pa bi bilo zanimivo ugotoviti ali izvleček vpliva tudi na proliferacijo normalnih limfocitov T.

5 SKLEP

Za ugotavljanje vplivov izvlečka lesa bele jelke na rast človeških celičnih linij raka prostate (LNCaP), raka jeter (HepG2) in T-celične levkemije (Jurkat) *in vitro*, smo uporabljali ustrezne redčitve njegove osnovne raztopine v fosfatnem pufru DPBS (B_{DPBS}) in pri tem dokazali naslednje učinke:

- izrazito zaviranje proliferacije vseh treh vrst celic, pri čemer je bilo to v primeru celic LNCaP in HepG2 koncentracijsko odvisno, v primeru celic Jurkat, kjer je bil ta efekt najmočnejši, pa praviloma ne. Inhibicija proliferacije celic Jurkat je bila koncentracijsko odvisna le v spodnjem koncentracijskem območju preskušanih raztopin izvlečka.
- šibko do zmerno citotoksičnost na nivoju spremljanja količin laktatne dehidrogenaze (LDH) v supernatantih celičnih kultur, in sicer pri višjih koncentracijah izvlečka v primeru celic LNCaP in Jurkat ter njeni popolno odsotnost v primeru celic HepG2.

Ker na osnovi šibkega oz. odsotnega citotoksičnega delovanja izvlečka lesa bele jelke na izbrane človeške rakave linije ne moremo pojasniti njegovega močnega zaviralnega učinka na rast omenjenih celic, bo potrebno poiskati in raziskati mehanizme, ki so za to odgovorni. Ena od lažje izvedljivih metod bi lahko bilo ugotavljanje morebitne fragmentacije DNA po obdelavi celic z različnimi koncentracijami izvlečka. Sicer pa bi morali preučiti njegove vplive na delovanje signalnih poti, ki so ključne za celično rast.

Delo, ki smo ga opravili, je torej razkrilo pomembne zaviralne učinke izvlečka lesa bele jelke na izbrane človeške rakave celične linije, gojene *in vitro*, kar odpira številne možnosti, ob tem pa še številnejša vprašanja, za katera menimo, da nujno potrebujejo odgovore.

6 LITERATURA

1. Tavčar Benković E, Grohar T, Žigon D, Švajger U, Janeš D, Kreft S, Štrukelj B: Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity. Industrial Crops and Products 2014; 52: 23-28.
2. Debeljak J, Ferk P, Čokolič M, Zavratnik A, Tavčar Benković E, Kreft S, Štrukelj B: Randomised double blind, cross-over, placebo and active controlled human pharmacodynamic study on the influence of silver fir wood extract (Belinal) on post-glycemic response. Pharmazie 2016; 71: 1-4.
3. Vasincu A, Cretu E, Geangelau I, Mihailescu Amalinei RL, Miron A: Polyphenolic content and antioxidant activity of an extractive fraction from *Abies alba* bark. Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi 2013; 117/2: 545-550.
4. Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F: Dietary polyphenols as potential neutraceuticals in management of diabetes: a review. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders 2013; 12: 43-51.
5. Drevenšek G, Lunder M, Tavčar Benković E, Štrukelj B, Kreft S: Cardioprotective effects of siver fir (*Abies alba*) wood extract in ishemic-reperfused isolated rat hearts. Food & Nutrition research 2016; 60: 29623-29630.
6. Drevenšek G, Lunder M, Tavčar Benković E, Mikelj A, Štrukelj B, Kreft S: Silver fir (*Abies alba*) trunk extract protects guinea pig arteries from impaired functional responses and morphology due to an atherogenic diet. Phytomedicine 2015; 22: 856-861.
7. Roškar I, Štrukelj B, Lunder M: Screening of phenolic compounds reveals inhibitory activity of norgihidroguaialetic acid against three enzymes involved in the regulations ob blood glucse level. Plant Foods Hum. Nutr. 2016; 71: 88-89.
8. Hanhineva K, Torronen K, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K: Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. Int. J. Mol. Sci. 2010; 11: 1365-1402.
9. Karkabounas S, Assimakopoulos D, Malamas M, Skaltsounis AL, Leonce S, Zelovitis J, Stefanou D, Evangelou A: Antiproliferative and anticarcinogenic effects of an aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album se abies*, on a L-1210 malignant cell line and tumor-bearing Wistar rats. Anticancer Res. 2000; 20 (6B): 4391-4395.

10. Perry SW, Epstein LG, Gelbard HA: *In situ* trypan blue staining of monolayer cell cultures for permanent fixation and mounting. BioTechniques, 1997; 22:1020-024.
11. Protokol citotox prirejen po: Technical Bulletin, CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Instructions for Use of Product, 2016. Promega/G1780.
12. Van Steenbrugge GJ, Van Uffelen CJC, Bolt J, Schröder FH: The human prostatic cancer cell line LNCaP and its derived sublines: an *in vitro* model for the study of androgen sensitivity. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 1991; 40/1-3: 207-214.
13. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Ming Chu T, Mirand EA, Murphy GP: LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res. 1983; 43: 1809-1818.
14. <http://www.hepg2.com>, dostopano 12.07.2017
15. <http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/jurkat.php>, dostopano 16.07.2017