

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUCIJA PRELOŽNIK

RAZVOJ FLUORIMETRIČNE METODE ZA SPREMLJANJE
VPLIVA SAPONINOV NA PREHOD CISTATINA SKOZI
CELIČNO MEMBRANO

DEVELOPMENT OF FLUORIMETRIC METHOD FOR
MONITORING THE INFLUENCE OF SAPONINS ON
CYSTATIN INTERNALIZATION ACROSS A CELL
MEMBRANE

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom Nine Kočevar, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Samu Kreftu, mag.farm., in somentorici Nini Kočevar, mag.farm. za strokovno vodenje in za vse nasvete pri eksperimentalnem delu in pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom Nine Kočevar, mag. farm.

Ljubljana, 2008

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	2
KAZALO SLIK	3
KAZALO PREGLEDNIC	4
POVZETEK	5
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1. UVOD	7
1.1. PROTEINI KOT UČINKOVINE	7
1.1.1. PROBLEMATIKA TERAPEVTSKIH PROTEINOV	7
1.1.2. PRISTOPI ZA POVEČANJE BIOLOŠKE UPORABNOSTI PROTEINOV	9
1.2. PROTEINAZE IN NJIHOVI INHIBITORJI	10
1.2.1. CISTEINSKE PROTEINAZE	10
1.2.2. CISTATINI – PROTEINSKI INHIBITORJI CISTEINSKIH PROTEINAZ	11
1.2.3. KOKOŠJI CISTATIN	12
1.3. SAPONINI	13
1.3.1. ZGRADBA SAPONINOV	13
1.3.2. LASTNOSTI SAPONINOV	14
1.3.3. SAPONINSKE DROGE, KI SMO JIH UPORABILI PRI DELU	15
1.3.3.1. <i>Quillaia saponaria</i>	16
1.3.3.2. <i>Hedera helix</i>	16
1.3.3.3. <i>Primula veris</i>	17
1.3.3.4. <i>Saponaria officinalis</i>	17
1.3.3.5. <i>Glyzyrrhiza glabra</i>	18
1.3.3.6. <i>Panax ginseng</i>	18
1.3.3.7. <i>Ruscus aculeatus</i>	19
1.3.4. VPLIV SAPONINOV NA CELIČNO MEMBRANO	19
1.3.5. VPLIV SAPONINOV NA PREHAJANJE SNOVI SKOZI CELIČNO MEMBRANO	21
1.3.6. MEHANIZEM DELOVANJA SAPONINOV NA CELIČNO MEMBRANO	22
1.4. SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE	24
2. NAMEN DELA	25
3. MATERIALI IN METODE DELA	26
3.1. REAGENTI, PUFRI, RAZTOPINE, TOPILA IN VZORCI	26
3.2. OPREMA IN APARATURE	28
3.3. METODE DELA	29
3.3.1. EKSTRAKCIJA SAPONINOV	29
3.3.2. DETEKCIJA SAPONINOV – TLC	29
3.3.3. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	31
3.3.4. DOLOČEVANJE CITOTOKSIČNOSTI SAPONINOV S PREIZKUSOM MTS	32
3.3.5. POSKUSI NA CELIČNIH KULTURAH	32
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	39
4.1. EKSTRAKCIJA IN DETEKCIJA SAPONINOV	39
4.2. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	42
4.3. CITOTOKSIČNOST SAPONINOV	43
4.3. POSKUSI NA CELIČNIH KULTURAH	44
5. ZAKLJUČEK	60
6. LITERATURA	62

KAZALO SLIK

Slika 1: Tridimenzionalna zgradba kokošnjega cistatina (12)	12
Slika 2: Osnovna zgradba sapogenina triterpenskimi saponinov; oleanan (rdeče), ursan (zeleno)....	13
Slika 3: Osnovna zgradba sapogenina steroidnih saponinov; spirostan (zeleno), furostan (rdeče)..	13
Slika 4: Kemijska formula kvilaja kisline, glavnega aglikona saponinov v kvilaji	16
Slika 5: Kemijska formula hederakozida C v navadnem bršljanu	16
Slika 6: Kemijska formula glavnega saponina v jegliču, primule kisline A	17
Slika 7: Kemijska formula enega glavnih saponinov v navadni milnici, saponozida D	17
Slika 8: Kemijska formula glavnega saponina v sladkem korenu, glicirizina	18
Slika 9: Kemijska formula glavnega saponina v ginsengu, ginsenzida Rb1	19
Slika 10: Kemijski formuli glavnih saponinov v bodeči lobodiki, ruskozida in ruscina.....	19
Slika 11: Mehanizem delovanja saponinov na celično membrano. (1) Od holesterola neodvisna vstavitev aglikona v membrano; (2) Vezava holesterola na saponin; (3) Agregacija saponinov in nastanek por.....	23
Slika 12: Shema proučevanega sistema	33
Slika 13: TLC-plošča za izvlečke korenin jegliča (na sliki označeno kot Primula) po orositvi z vanilinskim reagentom	39
Slika 14: TLC-plošča pod UV-254 nm za izvlečke korenin sladkega korena (Gly.) in korenin navadne milnice (Sap.) z različnimi topili ter njuna standarda v metanolu.....	40
Slika 15: TLC-plošča po orositvi z vanilinskim reagentom za izvlečke korenin sladkega korena (Gly.) in korenin navadne milnice (Sap.) ter njuna standarda v metanolu	40
Slika 16: TLC-plošča pod UV-254 nm (a) in po orositvi z vanilinskim reagentom (b) za izvlečke ginsenga in kvilaje.....	41
Slika 17: TLC-plošča pod UV-254 nm (a) in po orositvi z vanilinskim reagentom (b) za izvlečke navadnega bršljana in bodeče lobodike	42
Slika 18: Elektroferogram vodnega izvlečka sladkega korena; označen je vrh, ki predstavlja glicirizin.....	42
Slika 19: Grafi prikazujejo odstotek preživelih celic v odvisnosti od dodatka vodnih izvlečkov iz saponinskih drog v različnih razredčitvah. Kontrolo predstavljajo celice, ki jim niso bili dodani saponinski izvlečki.	43
Slika 20: Graf spreminjanja intenzitete fluorescence po dodatku različnih koncentracij substrata celicam.....	45
Slika 21: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 10. in 20. minuto po dodatku različnih koncentracij substrata celicam in kontrole brez celic	46
Slika 22: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin cistatina (nemodificiranega C0 in aciliranega C6–C18) celicam in kontrole; 0,2 μM raztopina cistatina; 5 μM raztopina substrata	47
Slika 23: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin cistatina (nemodificiranega C0 in aciliranega C6–C18) celicam in kontrole; 0,2 μM raztopina cistatina; 100 μM raztopina substrata	47
Slika 24: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 10. in 20. minuto po dodatku raztopin cistatina (nemodificiranega C0 in aciliranega C8, C12 in C16) celicam in kontrole; 1 μM raztopina cistatina; 5 μM raztopina substrata	48
Slika 25: Intenziteta fluorescence celic, izmerjena kot končna meritev po dodatku NaOH. Celice so bile 20 minut izpostavljene raztopinam cistatina (0,2 μM), nato pa še 15 minut raztopini substrata (5 μM).	49
Slika 26: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin glicirizinskega standarda v vodi (v različnih koncentracijah) celicam	51
Slika 27: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin glicirizinskega standarda v PBS (v različnih koncentracijah) celicam	52

Slika 28: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin glicirizinskega standarda v PBS (s koncentracijo 1 µg/mL) celicam; primerjava med običajnim postopkom (modro) in postopkom, pri katerem pred dodatkom substrata celice 2-krat speramo s PBS (vijolično).....	53
Slika 29: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku izvlečka sladkega korena , razredčenega 100-krat.....	54
Slika 30: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku izvlečka navadne milnice , razredčenega 100-krat.....	55
Slika 31: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku izvlečka ginsenga , razredčenega 50-krat in 100-krat.....	55
Slika 32: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku izvlečka navadnega bršljana , razredčenega 50-krat in 100-krat	56
Slika 33: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku izvlečka bodeče lobodike , razredčenega 50-krat in 100-krat.....	57
Slika 34: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku izvlečka sladkega korena , razredčenega 100-krat; primerjava med učinkom neaciliranega cistatina (C0) in palmitoiliranega cistatina (C16) (1 µM raztopini).....	58
Slika 35: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku izvlečka navadne milnice , razredčenega 100-krat; primerjava med učinkom nemodificiranega cistatina in palmitoiliranega cistatina (1 µM raztopini); na koncu spiranje in dodatek 100 µL vode za 5 minut ter dodatek substrata v vodo.....	59

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Saponinske droge, ki smo jih uporabili pri delu	15
Preglednica II: Zaporedje dodatkov raztopin celicam pri uporabi glicirizinskega standarda v PBS	37
Preglednica III: Zaporedje dodatkov raztopin celicam pri uporabi glicirizinskega standarda v PBS pri spiranju celic pred dodatkom substrata	37
Preglednica IV: Zaporedje dodatkov raztopin celicam pri uporabi saponinskih izvlečkov	38
Preglednica V: Rezultati kapilarne elektroforeze.....	43

POVZETEK

Proteini kot zdravilne učinkovine predstavljajo velik potencial, čeprav je njihova terapevtska uporabnost omejena. Zdravilne učinkovine proteinske narave so terapevtsko problematične zaradi slabe absorpcije z mesta vnosa, kar je posledica fizikalno-kemijskih in encimskih barier, hitre metabolične razgradnje s peptidazami in kratkega razpolovnega časa ter širokega spektra bioloških učinkov. Da bi odpravili naštete pomanjkljivosti in povečali biološko uporabnost proteinov, si pomagamo z različnimi pristopi. Eden izmed teh pristopov je tudi dodatek saponinov, ki s spremembami v lipidnem dvosloju celične membrane olajšajo prehod proteinov v celico.

V diplomski nalogi smo želeli razviti metodo, s katero bi spremljali vpliv saponinov na prehod proteinov v celico. Kot modelni protein smo uporabili kokošji cistatin, ki je inhibitor lizosomske proteinaze katepsina B. Iz različnih saponinskih drog smo najprej pripravili saponinske izvlečke in prisotnost saponinov potrdili s tankoplastno kromatografijo in kapilarno elektroforezo. S kolorimetričnim preizkusom MTS smo ugotavljali citotoksičnost saponinskih izvlečkov pri različnih razredčitvah in nato netoksične razredčitve uporabili za poskuse na tumorskih celicah MCF-10A neo T. Po dodatku različnih saponinskih izvlečkov in cistatina celicam ter dodatku za katepsin B specifičnega substrata Z-Arg-Arg-AMC smo s spektrofotometrom spremljali kinetiko naraščanja fluorescence. Več kot je prišlo cistatina v celico, večja je bila inhibicija katepsina B in manj fluorescenčnega produkta je nastalo.

Ugotovili smo, da metoda ni primerna za spremljanje majhnih sprememb znotraj celic. Za večino saponinskih izvlečkov zato nismo uspeli potrditi hipoteze, da vplivajo na prehod cistatina v celico. Domnevamo, da saponini ta prehod olajšajo, vendar pa so bile spremembe verjetno premajhne in metoda premalo občutljiva, da bi to lahko zaznali. Izmed vseh izvlečkov so se rezultati za izvlečka listov navadnega bršljana in korenine navadne milnice še najbolj približali pričakovanim. V tem primeru so saponini najverjetneje povzročili večje spremembe in tako olajšali prehod cistatina v celico, vendar pa zaradi pomanjkanja informacij o citotoksičnosti različnih razredčitev izvlečka navadnega bršljana hipoteze ne moremo v celoti potrditi.

SEZNAM OKRAJŠAV

Arab, Ara	arabinoza
Arg	aminokislina arginin
Cys	aminokislina cistein
Da	Dalton
Fuc	fukoza
Gal	galaktoza
Glc, Gluc	glukoza
IC ₅₀	polovica maksimalne inhibitorne koncentracije določene substance
Rf	retencijski faktor
Rham, Rha	ramnoza
rpm	obrat na minuto
SDS	natrijev lavrilsulfat
Z-Arg-Arg-AMC	benziloksikarbonil-Arg-Arg-7-amino-4-metilkumarin
Xyl	ksiloza

1. UVOD

1.1. PROTEINI KOT UČINKOVINE

Fiziološki proteini imajo pomembno vlogo v delovanju človeškega organizma. Velik napredek v tehnologiji rekombinantne DNA je omogočilo biotehnološko pridobivanje številnih biološko aktivnih proteinov, ki predstavljajo potencialne učinkovine za zdravljenje različnih patoloških stanj in bolezni. Kljub temu pa njihova terapevtska uporabnost še vedno ostaja omejena, saj primanjkuje ustreznih načinov za učinkovito dostavo teh spojin do mesta delovanja. Značilne lastnosti proteinov preprečujejo učinkovito absorpcijo skozi sluznico GIT, zato terapevtske proteine apliciramo predvsem parenteralno. Ker pa gre v tem primeru za invaziven vnos, proučujejo tudi druge neinvazivne načine, kot so intraokularni, intranazalni, bukalni, transdermalni, pulmonalni in peroralni. Peroralni vnos velja za najmanj primernega, zato še vedno raziskujejo različne pristope, s katerimi bi se izognili številnim oviram, ki jih prinaša takšen način vnosa terapevtskih proteinov (1).

1.1.1. PROBLEMATIKA TERAPEVTSKIH PROTEINOV

Zdravilne učinkovine proteinske narave so problematične s terapevtskega vidika zaradi slabe absorpcije z mesta vnosa, kar je posledica fizikalno-kemijskih in encimskih barier, hitre metabolične razgradnje s peptidazami in kratkega razpolovnega časa ter širokega spektra bioloških učinkov, t. i. multipotentnosti (2).

HITRA ENCIMSKA RAZGRADNJA PROTEINOV

Peroralno vnesen protein mora premagati številne ovire preden doseže sistemski krvni obtok. Takoj po vnosu so proteini izpostavljeni delovanju številnih proteolitičnih encimov: pepsinu v želodcu, encimom pankreasa (tripsinu, kimotripsinu in kabsipeptidazi) v tankem črevesju in encimom črevesnih resic. Pomembna je tudi encimska razgradnja v krvnem obtoku in jetrih (1, 3).

(NE)STABILNOST PROTEINOV

Na splošno lahko nestabilnost proteinov razdelimo na kemijsko in fizikalno. Kemijska se nanaša na vse procese, ki vodijo do nastanka ali cepitve kovalentnih vezi in pomenijo nastanek nove kemijske entitete. Omogočajo jo posamezne reaktivne skupine, ki jih imajo določene aminokisline. H kemijski nestabilnosti prištevamo hidrolizo peptidne vezi, deamidacijo, racemizacijo, oksidativne procese ter tvorbo in razcep disulfidnih vezi (4, 5). Fizikalna nestabilnost je odvisna od jakosti nekovalentnih interakcij in se nanaša na vse druge spremembe razen kemijskih. Pri tem lahko pri povišani temperaturi pride do spremembe nativne konformacije, prav tako pa je pomemben tudi pH okolja. Denaturacijo lahko povzročijo različne soli, kelatne spojine in organska topila, česar posledica je lahko agregacija. Do fizikalne nestabilnosti pride tudi, če je protein v stiku z zrakom ali s hidrofobno površino (5).

KRATEK RAZPOLOVNI ČAS

Kratek razpolovni čas proteinov je posledica njihove hidrofilne narave in hitre encimske razgradnje. Podaljšamo ga lahko z modificiranjem proteina ali s spreminjanjem načina vnosa, vendar lahko pri tem izgubimo terapevtsko učinkovitost (4).

MULTIPOTENTNOST PROTEINOV

Problem terapevtskih proteinov je tudi širok spekter bioloških učinkov. Za uspešno zdravljenje mora učinkovina doseči mesto delovanja. V večini primerov se učinkovina porazdeli po telesu in je le malo doseže tarčno mesto. Preostali del učinkovine se zato lahko veže na nespecifična vezavna mesta in povzroča neželene učinke (2).

ANTIGENSKE LASTNOSTI PROTEINOV

Z vnosom terapevtskih proteinov lahko sprožimo imunski odgovor. Na imunogenost terapevtskih proteinov lahko vplivajo genetska predispozicija, vrsta bolezni in vrsta proteina, prisotnost konjugatov ali fragmentov, način vnosa, pogostost odmerjanja in trajanje zdravljenja. Prav tako imajo velik vpliv način proizvodnje, rokovanje in

shranjevanje, ki lahko v pripravku povzročijo nastanek nečistot ali pa se z oksidacijo in agregacijo spremeni tridimenzionalna zgradba proteina (4).

1.1.2. PRISTOPI ZA POVEČANJE BIOLOŠKE UPORABNOSTI PROTEINOV

Terapevtska uporabnost proteinov je omejena zaradi njihove nestabilnosti v fizioloških razmerah in premajhne absorpcije, saj gre za velike hidrofilne molekule, ki s težavo prehajajo skozi biološko membrano. Da bi odpravili številne pomanjkljivosti in povečali biološko uporabnost proteinov, si pomagamo z različnimi pristopi (1, 2, 5):

- ✓ Zmanjšanje aktivnosti encimov na mestu absorpcije in absorpcijski poti (npr. z dodajanjem inhibitorjev proteolitičnih encimov).
- ✓ Ciljana dostava proteinov v kolon, kjer je nižja koncentracija proteolitičnih encimov.
- ✓ Podaljšanje zadrževanja na mestu absorpcije s pomočjo mukoadhezivnih farmacevtskih oblik (mikrodelcev, liposomov in gelov).
- ✓ Povečanje prepustnosti absorpcijske bariere s pospeševalci absorpcije, z iontoforezo (4) ali liposomi. Med pospeševalce absorpcije sodijo površinsko aktivne snovi (fosfolipidi, soli žolčnih kislin in **saponini**), maščobne kisline, kompleksirajoče snovi in metilirani β -ciklodekstrini.
- ✓ Povečanje obstojnosti proteina na različne načine:

a) S fizikalnimi pristopi terapevtske proteine vgradimo v različne farmacevtske oblike, kot so nanodelci (5) ali liposomi za doseganje transcelularnega transporta z endocitozo. Ostale možnosti so še lipidne mikrod disperzije, emulzije, injektabilni implantati, mikrosfere, črpalke in ogrodne oblike (3).

b) Kemijski pristopi:

- o Pegiliranje proteinov oziroma pripenjanje verig polietilenglikola na protein (4).
- o Bioizosterne spremembe ali zamenjave določenih aminokislin (vključitev *D*-aminokislin v zgradbo proteinov), kar zmanjša afiniteto do različnih proteolitičnih encimov in upočasni encimsko razgradnjo (1, 5).

- o Aciliranje proteinov z derivati maščobnih kislin je ena od osnovnih metod za povečanje lipofilnosti in s tem prepustnosti proteinov skozi celične membrane. Glede na reakcijske razmere se maščobne verige vežejo kovalentno na proste aminske skupine (najpogosteje lizina) in tvorijo stabilne amidne vezi. Reakcija aciliranja lahko poteče tudi na tiolnih (pri cisteinu) in hidroksilnih skupinah (pri serinu), pri čemer dobimo tioestre in estre maščobnih kislin. Največjo težavo predstavlja topnost reagenta za aciliranje ter proteina v istem mediju (organskem ali vodnem). Poleg tega je problematična uporaba organskih topil zaradi možne denaturacije proteina in s tem izgube njegove biološke aktivnosti. Acilirane proteine lahko nato še vežemo na lipidni dvosloj liposomov ter na ta način podaljšamo njihov razpolovni čas (6, 7).

1.2. PROTEINAZE IN NJIHOVI INHIBITORJI

Cepitev peptidne vezi je eden najbolj pogostih procesov, ki potekajo v vsakem živem organizmu. Encime, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi, imenujemo proteaze. Te razdelimo na eksopeptidaze in endopeptidaze. Endopeptidaze pa lahko razvrstimo glede na mehanizem delovanja na serinske, cisteinske, aspartatne in metaloproteinaze.

1.2.1. CISTEINSKE PROTEINAZE

Pri cisteinskih proteinazah sodelujeta pri hidrolizi peptidne vezi cisteinski in histidinski preostanek. Po Barrettu in Rawlingsu jih razdelimo na pet naddružin, in sicer na naddružine papaina, kalpaina, klostripaina in na streptokokne in virusne cisteinske proteinaze. Najštevilnejša je naddružina papaina, kamor spadajo lizosomski katepsini B, H, L in S. Običajna vloga lizosomskih cisteinskih proteinaz je znotrajcelična razgradnja proteinov, verjetno pa so povezani tudi z nadzorom celičnih funkcij in s katalitskim procesiranjem drugih proteinov. Pomembna je tudi njihova vloga pri najrazličnejših patoloških stanjih, kot so rakava obolenja, mišična distrofija, vnetni procesi, glomerulonefritis in pankreatitis. Pri vseh teh procesih so jih zasledili pretežno zunajcelično (8).

KATEPSIN B deluje kot endopeptidaza z relativno široko specifičnostjo in kot eksopeptidaza z dipeptidil karboksipeptidazno aktivnostjo. Večino aktivnega katepsina B najdemo v obliki dvoverižne molekule, ki je sestavljena iz lahke in težke verige, ki sta med seboj povezani z disulfidno vezjo. Človeškemu katepsinu B so kot prvemu odkritemu lizosomskemu katepsinu določili tudi kristalno strukturo.

Ekspresija mRNA katepsina B je običajno povečana pri bolnikih z možganskim tumorjem, rakom debelega črevesja in danke, prostate in ščitnice. Povečano aktivnost katepsina B so izmerili pri raku dojke, materničnega vratu in jajčnikov. Katepsin B se v normalnih celicah večinoma nahaja perinuklearno (v veziklih okrog jedra), v tumorskih in transformiranih celicah pa tudi v perifernih predelih citoplazme, v bližini celične membrane in na zunanji površini celične membrane (9).

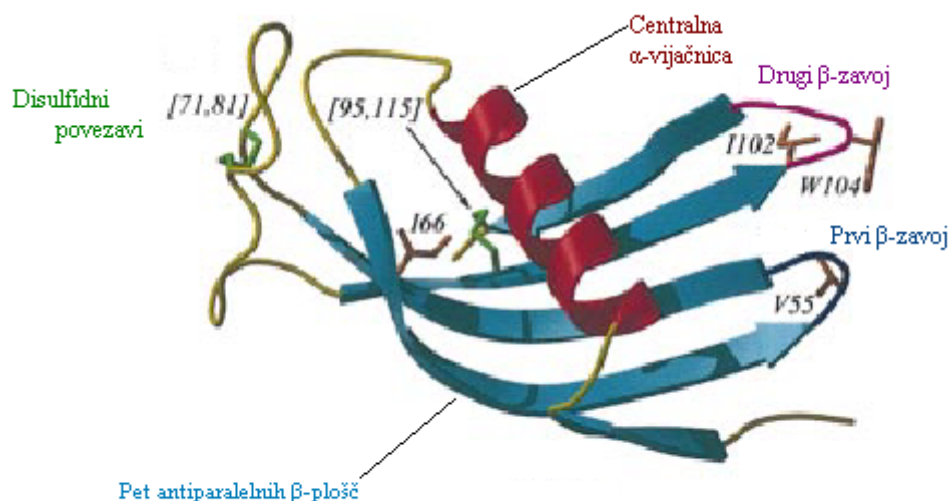
Cisteinske in aspartatne proteinaze, predvsem katepsini B, L in D, sodelujejo neposredno pri razgradnji proteinov bazalne membrane in zunajceličnega matriksa, kar omogoča invazijo in metastaziranje tumorskih celic ter angiogenezo. Katepsin B sodeluje pri razgradnji zunajceličnega matriksa neposredno s kataliziranjem proteolize proteinov matriksa (kolagena IV, laminina in fibronektina) in posredno z aktivacijo encimov (npr. metaloproteinaz) proteolitične kaskade razgradnje zunajceličnega matriksa (7).

1.2.2. CISTATINI – PROTEINSKI INHIBITORJI CISTEINSKIH PROTEINAZ

Za regulacijo aktivnosti cisteinskih proteinaz so zelo pomembni njihovi endogeni inhibitorji iz naddružine cistatinov, ki jo razdelimo na tri družine: stefine, cistatine in kininogene. Cistatini so sestavljeni iz približno 115 aminokislin, imajo molekulsko maso približno 13.000 Da ter dve disulfidni vezi in so pretežno zunajcelični proteini. So reverzibilni kompetitivni inhibitorji z visoko afiniteto do cisteinskih proteinaz. Kot inhibitorji cisteinskih proteinaz lahko celico zaščitijo pred škodljivo notranjo ali zunanjo proteolizo, sodelujejo pa tudi v kontrolnem mehanizmu, ki je odgovoren za znotraj-oziroma zunajcelično razgradnjo proteinov. Delovanje katepsinov je torej uravnovešeno z endogenimi inhibitorji, pri čemer pa porušenje tega ravnovesja vodi do različnih bolezenskih stanj (8).

1.2.3. KOKOŠJI CISTATIN

Kokošji cistatin, izoliran iz jajčnega beljaka, nam je v diplomskem delu služil kot modelni protein, s pomočjo katerega smo proučevali vpliv saponinov na njegovo prehajanje skozi celično membrano. Tridimenzionalno zgradbo kokošjega cistatina (slika 1) so določili s pomočjo rentgenske difrakcijske analize. Zgrajen je iz petih antiparalelnih β -plošč, ki so ovite okoli osrednje, N-končne α -vijačnice. Ima dve disulfidni vezi: vez med cisteinoma Cys-71 in Cys-81 povezuje segment z delno obliko α -vijačnice z osrednjim delom, β -ploščo, medtem ko vez med cisteinoma Cys-95 in Cys-115 povezuje dve antiparalelni verigi znotraj β -plošče (7, 10, 11).



Slika 1: Tridimenzionalna zgradba kokošjega cistatina (12)

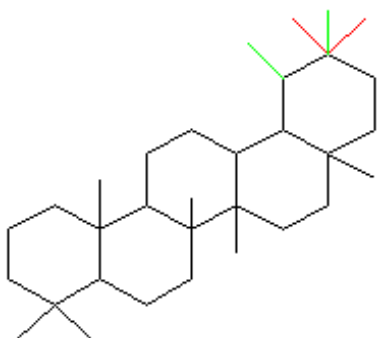
1.3. SAPONINI

1.3.1. ZGRADBA SAPONINOV

Saponini so glikozidi, ki so dobili svoje ime po penjenju, saj se njihove vodne raztopine močno penijo (*sapo* v latinščini pomeni milo). Osnovni skelet predstavlja aglikon, na katerega je vezana ena ali več sladkornih enot.

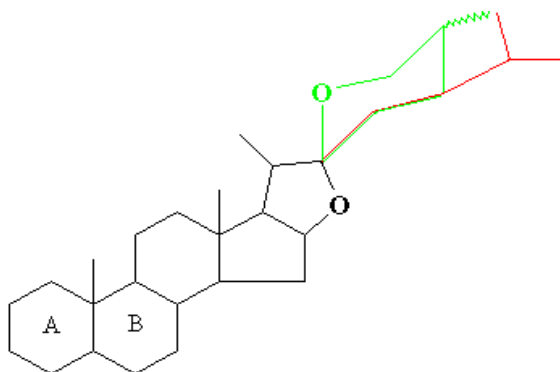
Razdelimo jih glede na aglikon (sapogenin):

a) Najbolj pogosti **triterpenski** aglikoni so pentaciklični triterpeni tipa oleanana in ursana. Pentaciklični je tudi tip lupana, tetraciklični pa tip damarana. Glavne razlike med posameznimi derivati znotraj določenega tipa so v številu in legi hidroksilnih skupin, številu in legi karboksilnih skupin, številu in legi dvojnih vezi ter dodatnih funkcionalnih skupinah in povezavah (aldehidna, etrska, estrska skupina ...).



Slika 2: Osnovna zgradba sapogenina triterpenskih saponinov; oleanan (rdeče), ursan (zeleno)

b) **Steroidne** aglikone razdelimo na spirostane in furostane. Čeprav ima šestobročni spirostanski skelet veliko asimetričnih ogljikovih atomov, se spreminja konfiguracija le na C-25. Tako ločimo neosapogenine(25-*S*) in izosapogenine (25-*R*).



Slika 3: Osnovna zgradba sapogenina steroidnih saponinov; spirostan (zeleno), furostan (rdeče)

Steroidni sapogenini se med seboj razlikujejo še v povezavi obročev A in B (cis ali trans) in po številu ter legi dodatnih hidroksilnih skupin poleg vedno prisotne hidroksilne skupine na C-3. Furostani so stabilni le, če imajo na koncu verige hidroksilno skupino, ki je glikozilirana. Če se sladkor odcepi, furostanska struktura spontano preide v spirostansko. Steroidne sapogenine uporabljamo za pridobivanje steroidnih hormonov z biotehnološkimi in s kemijskimi reakcijami.

c) **Steroidni alkaloidi** so strukturno podobni steroidnim sapogeninom in so značilni za družino razhudnikovk (*Solanaceae*), zlasti za rodova *Solanum* (sem sodi krompir) in *Lycopersicon* (sem spada paradižnik). Nekatere uporabljamo kot izhodne spojine za polsintezo steroidnih hormonov.

Monosaharidi v saponinskih glikozidih so glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, fukoza in samo pri triterpenskih saponinih še glukuronska kislina. Sladkorni del predstavljata ena ali dve linearni ali razvejani verigi oligosaharidov (do 10 monosaharidov). Sladkorne verige so vezane na aglikone preko glikozidne ali estrske vezi. Glikozidna vez je največkrat na hidroksilni skupini triterpenskega ali steroidnega aglikona na mestu C-3 (**monodezmozidi**). Pogosto je prisotna še druga sladkorna veriga (**bidezmozidi**), ki je pri triterpenih etrsko vezana na mestu C-28, pri steroidnih sapogeninih furostanskega tipa pa glikozidno na mestu C-26. Izjemoma je prisotna še tretja sladkorna veriga (13).

1.3.2. LASTNOSTI SAPONINOV

Glavne lastnosti saponinov:

- z vodo dajejo koloidne raztopine;
- so površinsko aktivne spojine (emulgatorji, penilci);
- so amorfní, redkeje kristalinični, beli do rumenkastorjavi praški;
- so grenkega (izjemoma sladkega) okusa;
- dražijo sluznice;
- so kisli (triterpenski), nevtralni (triterpenski in steroidni) ali bazični (alkaloidni);
- topni so v polarnih topilih (vodi, metanolu, etanolu in n-butanolu);
- večina jih povzroča hemolizo;

- so ribji strupi;
- s steroli tvorijo težko razgradljive komplekse.

Pomena saponinov za rastline, ki jih vsebujejo, še niso popolnoma pojasnili. Nekatere rastline s saponini so zelo toksične. Mnogi saponini imajo zaščitno vlogo, saj delujejo antimikrobno in insekticidno. Nekateri so rastlinski hormoni (pospešujejo kalitev ali zavirajo rast). Za človeka so pomembni predvsem kot sekretolitični ekspektoransi (delujejo preko gastro-pulmonalnega refleksa) in diuretiki, nekateri pa imajo povsem specifične učinke; delujejo kot bronhospazmolitiki, veliko pa je tudi dermatikov in se uporabljajo v kozmetiki. Nekatere saponinske droge se uporabljajo kot toniki in geriatriki (13).

1.3.3. SAPONINSKE DROGE, KI SMO JIH UPORABILI PRI DELU

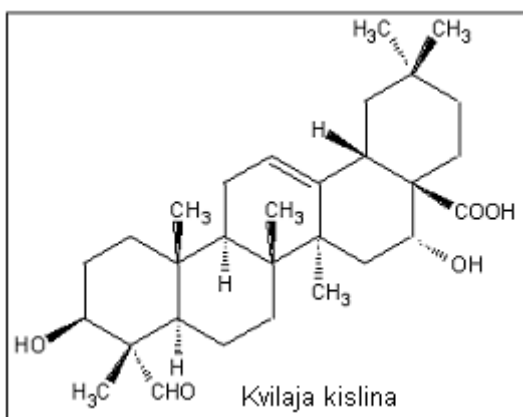
Pri eksperimentalnem delu smo uporabili sedem saponinskih drog, in sicer ginseng, navadni bršljan, pomladanski jeglič, navadno milnico, golostebelni sladki koren, bodečo lobodiko in kvilajo (preglednica I).

Preglednica I: Saponinske droge, ki smo jih uporabili pri delu

Družina	Rastlina	Droga	Slovensko ime
<i>Araliaceae</i> (bršljanovke)	<i>Panax ginseng</i>	Ginseng radix	ginseng (žen-šen)
<i>Araliaceae</i> (bršljanovke)	<i>Hedera helix</i>	Hederae folium	navadni bršljan
<i>Primulaceae</i> (jegličevke)	<i>Primula veris</i>	Primulae radix	pomladanski jeglič
<i>Caryophyllaceae</i> (klinčnice)	<i>Saponaria officinalis</i>	Saponariae radix	navadna milnica
<i>Fabaceae</i> (metuljnice)	<i>Glyzyrrhiza glabra</i>	Glyzyrrhizae radix	golostebelni sladki koren
<i>Liliaceae</i> (lilijevke)	<i>Ruscus aculeatus</i>	Rusci rhizoma	bodeča lobodika
<i>Rosaceae</i> (rožnice)	<i>Quillaia saponaria</i>	Quillaiae cortex	kvilaja

1.3.3.1. *Quillaia saponaria*

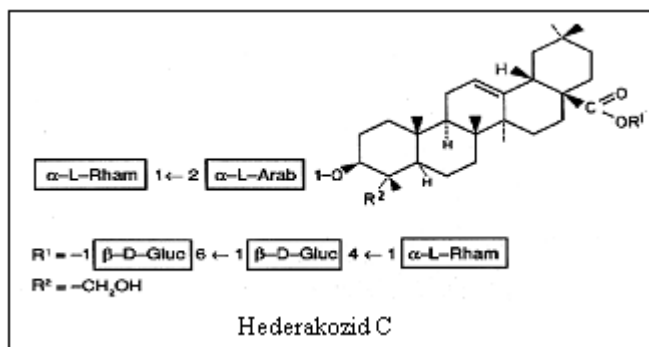
Za drogo uporabljamo notranji del skorje kvilaje, drevesa iz Južne Amerike. Vsebuje 10 odstotkov kompleksne zmesi saponinov s kvilaja kislino (slika 4) kot aglikonom. Včasih so drogo uporabljali kot ekspektorans, danes pa le kot dermatik in za izolacijo saponinov, ki jih uporabljajo v kozmetični industriji.



Slika 4: Kemijska formula kvilaja kisline, glavnega aglikona saponinov v kvilaji

1.3.3.2. *Hedera helix*

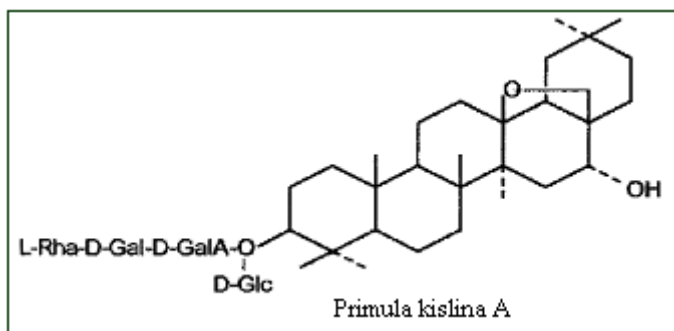
Navadnji bršljan je zimzelena ovijalka. Za zdravljenje uporabljamo samo standardizirane izdelke iz listov. Listi vsebujejo do 8 odstotkov hederasaponinov, med katerimi je največ bidezmozida oleanolne kisline-hederakozida C (slika 5), precej pa je tudi monodezmozidov (α -hederina, β -hederin) (14). Droga je ekspektorans in bronhospazmolitik, zato jo uporabljamo v fitoterapevtikih za akutna obolenja dihal, zlasti pri hudem kašlju (oslovskem kašlju). Izvlečke iz listov uporabljamo tudi v kozmetiki. Topikalno uporabljamo liste za zdravljenje kožnih bolezni in kot dodatek pri hujšanju.



Slika 5: Kemijska formula hederakozida C v navadnem bršljanu

1.3.3.3. *Primula veris*

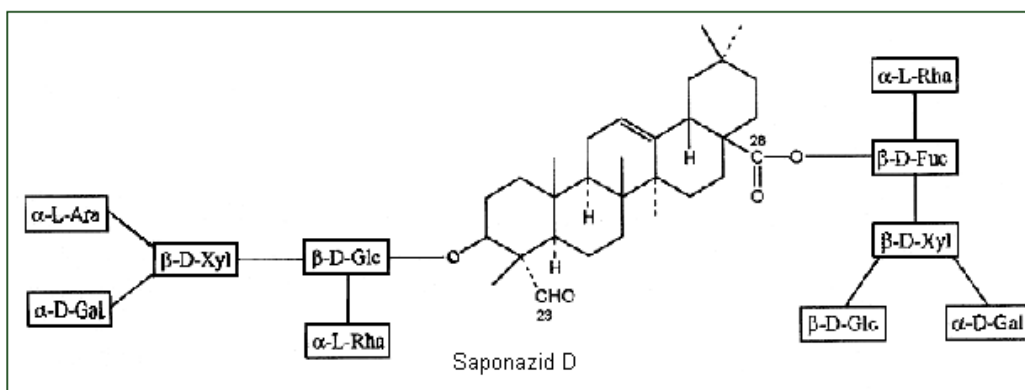
Korenina jegliča vsebuje 5–10 odstotkov saponinov, ki so glikozidi hidroksilirane oleanolne kisline. Glavni saponin je primula kislina A (slika 6). Jeglič je sekretolitični ekspektorans in pri nas nadomešča senego. Najpogosteje ga uporabljamo v obliki sirupa skupaj s timijanom.



Slika 6: Kemijska formula glavnega saponina v jegliču, primule kisline A

1.3.3.4. *Saponaria officinalis*

Navadna milnica je večletna rastlina, ki raste v srednji in južni Evropi. Droga (korenika s koreninami) vsebuje 2–5 odstotkov različnih triterpenskimi saponinov, katerih glavni sapogenin je kvilaja kislina (derivat oleanolne kisline), glavna saponina pa sta saponazid A in D (slika 7). Droga je ekspektorans, vendar se v te namene pri nas manj uporablja kot jeglič.

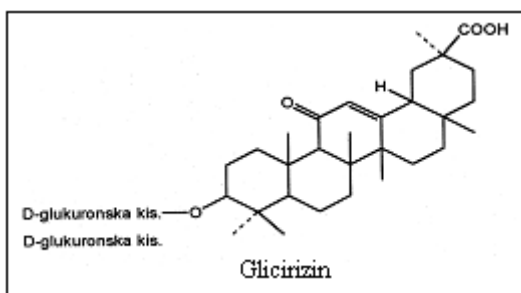


Slika 7: Kemijska formula enega glavnih saponinov v navadni milnici, saponozida D

1.3.3.5. *Glyzyrrhiza glabra*

Golostebelni sladki koren je trajnica in obstaja v več variacijah (španski, ruski in perzijski), vsem pa je skupen močno razvejan podzemni del, ki ga sestavljajo dolge podzemne pritlike in korenine. Farmakološke učinke droge pripisujejo saponinom in flavonoidom. Vsebuje 2–15 odstotkov triterpenskih saponinov, med katerimi prevladuje glicirizin (v obliki kalijeve ali kalcijeve soli glicirizinske kisline), saponin sladkega okusa (50-krat slajši kot saharoza) in derivat oleanana z značilno enonsko strukturo (12-en-11-on) (slika 8).

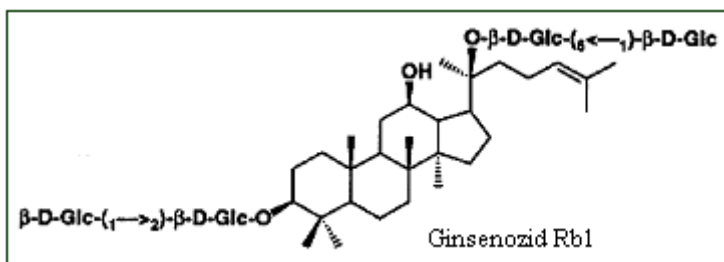
Droga je sekretolitični in sekretomotorni ekspektorans, ki ga uporabljamo pri vnetjih zgornjih dihal. Glicirizin deluje antivirusno, blago antibakterijsko, antihepatotoksično ter imunostimulativno. V farmaciji drogo uporabljamo za čaje, za izdelavo tekočega izvlečka, za izdelavo Succus Glycyrrhizae (do suhega vkuhani vodni izvleček - črni sladkor) in kot korigens okusa. Zaradi flavonoidov droga deluje tudi spazmolitično.



Slika 8: Kemijska formula glavnega saponina v sladkem korenu, glicirizina

1.3.3.6. *Panax ginseng*

Panax ginseng je korejska vrsta in je rastlina, ki ima v orientalski medicini velik ugled kot tonik in afrodiziak, pa tudi kot sredstvo za regeneracijo in pomlajevanje. Droga vsebuje 2–3 odstotke različnih saponinov, imenovanih ginsenozidi Rx (slika 9) (14). Učinkoviti so triterpenski saponini damaranskega tipa. V fitoterapiji zahoda ga uporabljamo kot tonik in geriatrik, zlasti v kombinacijah z vitamini. Nekatere raziskave so pokazale, da znižuje nivo krvnih lipidov, stimulira sintezo RNA in deluje gonadotropno. Ginseng deluje adaptogeno in ugodno vpliva na presnovo, kar se kaže v povečani telesni vzdržljivosti ter boljši umski sposobnosti.

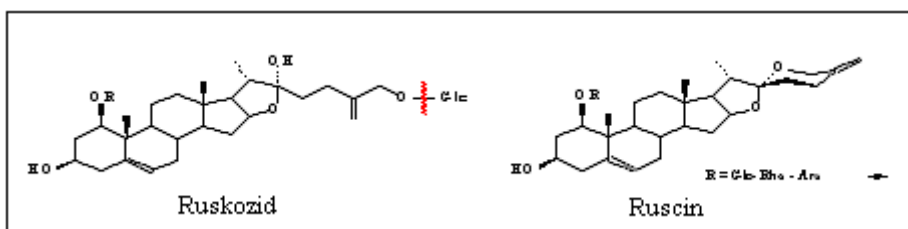


Slika 9: Kemijska formula glavnega saponina v ginsengu, ginsenozida Rb1

1.3.3.7. *Ruscus aculeatus*

Rastlina je zimzeleni polgrmiček toplejših predelov Evrope. Farmakološko aktivne spojine v koreniki in koreninah so steroidni saponini, ki jih je v drogi do 6 odstotkov. So glikozidi ruskogenina in neoruskogenina (slika 10).

Nekateri poskusi so pokazali, da saponini bodeče lobodike preprečujejo razširjanje venskih žil in zmanjšujejo krhkost ter prepustnost kapilar. Izvlečki iz droge so sestavina krem in svečk za blažitev simptomov venske insuficience, uporabljajo pa se tudi pri hemoroidih.



Slika 10: Kemijski formuli glavnih saponinov v bodeči lobodiki, ruskozida in ruscina

1.3.4. VPLIV SAPONINOV NA CELIČNO MEMBRANO

Specifična sposobnost saponinov je tvorba por v membranah celic. Poznamo jih kot snovi, ki povzročijo lizo eritrocitov, zato to lastnost uporabljamo za njihovo detekcijo. Hemolitična aktivnost je rezultat afinitete aglikona do membranskih sterolov, predvsem holesterola, s katerim tvorijo netopne komplekse. Količina glikozidov, ki so potrebni za permeabilizacijo, je veliko nižja za s holesterolom bogate lipidne sloje. V raziskavi, kjer so proučevali permeabilizacijo membrane s saponini iz *Gypsophila* na izoliranih podganjih hepatocitih, so ugotovili, da je potrebna 5-krat večja koncentracija saponinov za permeabilizacijo endoplazemskega retikuluma (ER) kot pa za plazemsko membrano. Razlog je različno razmerje med holesterolom in fosfolipidi v različnih membranah. To

razmerje je namreč precej višje za plazemsko membrano (0,76) kot pa za membrano ER (0,06) (15). Nasprotno so leta 1990 pokazali, da je insercija aglikona v lipidni dvosloj neodvisna od prisotnosti holesterola. Saponini naj bi inducirali permeabilnost na liposomski membrani brez holesterola, če so glikozilirani na C-3 in C-28 oleanolnem aglikonu (16).

V eni izmed raziskav so ugotovili, da so membranske pore, ki jih tvorijo saponini, dolgo obstojne in takšne membrane so permanentno permeabilne za večje molekule. V drugi raziskavi so ugotavljali porazdelitev celotnega kreatina med mitohondrijskim matriksom in citoplazmo v srčni mišici in skeletnih mišicah. Za odprtje zunanje celične membrane so uporabili saponine in ugotovili, da se sprostijo metaboliti iz citoplazme. Membrana je bila izpostavljena saponinom v koncentraciji 50 µg/mL za 30 minut in v drugem poskusu višji koncentraciji saponinov (600µg/mL) za 1 minuto (17).

Različni raziskovalci so proučevali vplive stranskih verig (sladkornih in acilnih) na aglikonu na hemolitično aktivnost saponinov. Učinki le-teh niso enoznačni; nekateri saponini z acilno skupino niso imeli hemolitične aktivnosti, medtem ko so v drugem raziskovalnem delu ugotovili, da lahko le acilirani triterpenoidni saponini v nizkih koncentracijah vplivajo na membransko aktivnost. V raziskavah ugotavljajo, da imajo steroidni in triterpenski saponini z eno sladkorno verigo večjo hemolitično aktivnost kot tisti z dvema. Čeprav monodezmozide prepoznavamo za bolj aktivne kot bidezmozide, pa obstajajo izjeme (16). Ugotovili so torej, da igrata tako aglikon kot sladkorna skupina pomembno vlogo v hemolitični aktivnosti saponinov. Nevtralni in kisli triterpenski saponini ter acilni glikozidi so zelo šibko aktivni, medtem ko so estrski saponini močno hemolitični.

Armah s sodelavci je v svojem raziskovalnem delu ugotovil, da permeabilizacijski učinek nativnega avenacina A-1 popolnoma izgine po hidrolizi ene, dveh ali treh sladkornih enot na položaju C-3 (18). Prav tako so ugotovili, da ima deacilirani kvilaja saponin, ki se od nativnega kvilaja saponina razlikuje le v eni sladkorni enoti, značilno spremenjeno sposobnost stimulacije absorpcije inzulina(19).

Omeniti moramo še, da so saponini v določenih koncentracijah toksični za celice, kar so raziskovalci potrdili v različnih raziskavah. Citotoksično aktivnost so proučevali na človeških levkemičnih celicah HL-60. Uporabili so steroidne saponine iz družine *Liliaceae*. Ugotovili so, da je citotoksičnost posledica nespecifičnega detergentnega učinka s spremembami v zgradbi membrane. V začetni stopnji tretiranja celic s saponini je prišlo

namreč do agregacije tumorskih celic. Stopnja uničenja membrane je bila različna pri različnih saponinih. Izmed 50 izoliranih saponinov so pri dveh ugotovili, da je smrt tumorskih celic posledica apoptoznega procesa. To pa nakazuje, da so poleg uničenja membrane prisotni še drugi mehanizmi (20).

V novejši raziskavi so iz *Lysimachiae capillipes* izolirali tri nove triterpenske saponine in proučevali njihovo citotoksičnost na človeških tumorskih celicah. Kot pozitivno kontrolo so uporabili protitumorsko učinkovino HCPT. Eden izmed saponinov je bil citotoksičen z IC_{50} pri koncentraciji 0,1 $\mu\text{g/mL}$, medtem ko druga dva nista kazala toksičnih učinkov pri koncentracijah, višjih od 10 $\mu\text{g/mL}$ (21).

1.3.5. VPLIV SAPONINOV NA PREHAJANJE SNOVI SKOZI CELIČNO MEMBRANO

Prvi dokazi o afiniteti saponinov do membranskih sterolov so se pojavili že v raziskavah Seemena leta 1974, ki je z elektronskim mikroskopom ugotovil, da saponini povzročijo nastanek permanentnih lezij. V raziskavi iz leta 2004 so ugotovili, da kombiniran vnos saponinov in himernih toksinov izrazito poveča citotoksičnost na ciljnih tumorskih celicah. Pri eksperimentalnem delu so uporabili *Saponinum album* iz vrste *Gypsophila paniculata*. Glavni saponini v tej rastlini so bidezmozidni triterpenski saponini z dvema pripetima sladkorjema. Znano je, da moramo imunotoksine vnašati v visokih odmerkih zaradi nizkega citosolnega privzema, kar ima za posledico veliko neželenih učinkov. V raziskavi so proučevali, ali lahko saponini izboljšajo učinkovitost receptorsko specifičnega himernega toksina, ki ga sestavljajo saporin 3, epidermalni rastni dejavnik in molekulski adapter, ki zmanjša neželene učinke na neciljnih celicah. Predhodno vneseni saponini so povečali ciljano citotoksičnost na celicah med 3560- in 385.000-krat z IC_{50} do 0,67 pM. Na neciljne celice pri teh koncentracijah niso imeli vpliva. Pri optimalnih koncentracijah himernega toksina in saponina vnos enega izmed njiju ni pokazal citotoksičnosti, kar potrjuje sinergistični učinek. Tako torej kombiniran vnos saponinov in himernih toksinov odpira veliko možnosti za tumorsko zdravljenje (22).

Svoje raziskovalno delo je ista skupina nadgradila leta 2005 s proučevanjem vpliva saponinske strukture na privzem saporinskih zdravil. Uporabili so himerni toksin, sestavljen iz saporina (rastlinski ribosome inaktivirajoči toksin), adapterja in človeškega epidermalnega rasnega dejavnika (EGF). Samo dva od preizkušanih saponinov, kvilaja

saponin in saponin album, sta povečala citotoksičnost za več kot 1000-krat, pri ostalih saponinih (glicirizinski kislini, hederasaponinu C, beta escinu, heliantoaidu 2 in ginsenoaidu) je bilo povečanje citotoksičnosti le približno 10-kratno. Hederasaponin C in kvilaja saponin sta kazala preveliko citotoksičnost (pri koncentraciji saponinov 1,5 µg/mL), zato nista idealna kandidata za kombinirano zdravljenje. To je lahko posledica reverzibilnega preoblikovanja membrane ali nastanka por. Saponin album je bil najboljši kandidat za kombinirano zdravljenje, zato so ga preizkusili tudi na miškah, kjer ni povzročil večjih neželenih učinkov. Raziskovalci tako ugotavljajo, da sta kvilaja saponin in saponin album najučinkovitejša pri povečevanju citotoksičnosti. Oba imata strukturno podoben triterpenski aglikon. Tudi sladkorne verige imajo pomemben vpliv, saj pride do izgube permeabilizacijskega učinka, ko le-te odstranimo. Visoko aktivni saponini vsebujejo kislno sladkorno verigo na C-3 in so bidezmozidi. Gipsoaid A iz *Saponinum album* in kvilaja saponin imata formilno skupino na C-4, kar kaže na to, da je formilna skupina prav tako pomembna za interakcije s celično membrano (23).

1.3.6. MEHANIZEM DELOVANJA SAPONINOV NA CELIČNO MEMBRANO

Interakcija med saponini in membranskimi lipidi je zapleten proces, ki je odvisen od vrste stranske verige, narave aglikona in od ciljne membrane. Saponini naj bi intereagirali s polarnimi glavami membranskih fosfolipidov, in sicer naj bi se saponinska hidroksilna skupina na C-3 ali C-28 povezala s hidroksilno skupino holesterola, kar se kaže v sposobnosti tvorbe micelom podobnih agregatov. Hidrofobni aglikon naj bi se vgradil v hidrofobno notranjost lipidnega dvosloja (16).

Ladha je s sodelavci proučeval učinke avenacina A-1 na reorganizacijo holesterola v lipidnem dvosloju. Avenacin se nahaja v žitih in rastline varuje pred glivičnimi patogeni. Proučevali so interakcije avenacina z Montal-Muellerjevim planarnim lipidnim dvoslojem. Holesterol je bil potreben, da je avenacin induciral permeabilizacijo. Permeabilizacijska aktivnost je popolnoma izginila po hidrolizi ene, dveh ali treh sladkornih enot. Avenacin je tudi povzročil majhno, a značilno zmanjšanje lateralne difuzije fosfolipidne sonde. Podobno je bilo s sterolno sondo, kjer je avenacin, ne pa tudi njegovi derivati, povzročil večje zmanjšanje lateralne difuzije kot pri fosfolipidni sondi. Vse to nakazuje, da je

intaktni sladkorni del avenacina potreben za reorganizacijo membranskih holesterolov v pori (18).

Reorganizacija v celični membrani je potekala v treh korakih (slika 11):

1.) Od holesterola neodvisna vstavitev aglikona avenacina A-1 v membrano

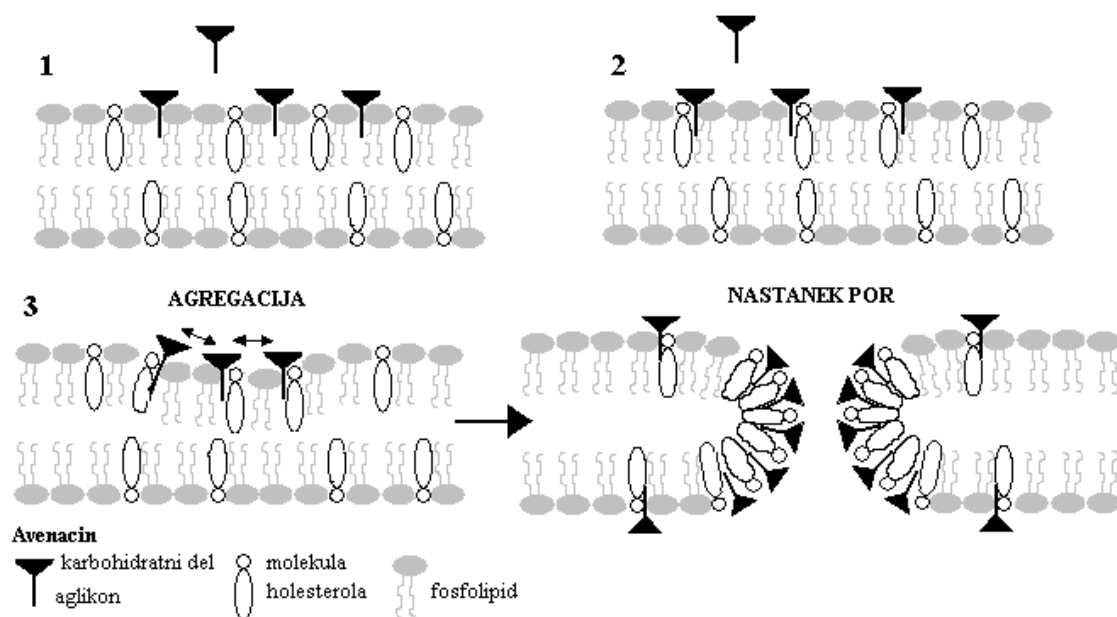
Avenacin se sicer lahko vstavi v membrano brez povezave s holesterolom, vendar pa se to ne odraža kot sprememba lateralnega difuzijskega koeficienta fosfolipida. To pomeni, da avenacin nima možnosti, da bi vplival na lateralni premik fosfolipidov.

2.) Vezava holesterola na avenacin v membrani

Podpora temu mehanizmu je dejstvo, da obstaja absolutna potreba po sterolih, ki morajo biti prisotni v fosfolipidnem dvosloju, da se lahko tvorijo pore. Po odstranitvi sladkorjev ne pride do sprememb membrane, kar kaže na to, da je intaktni sladkorni del potreben za reorganizacijo membranskih sterolov.

3.) Agregacija molekul avenacina in nastanek transmembranske pore

V tej stopnji pride do prerazporeditve membranskih lipidov v transmembransko poro. Mehanizem še ni povsem jasn, vendar pa predvidevajo, da sladkorne enote avenacina interagirajo in povzročijo agregacijo kompleksa med holesterolom in avenacinom.



Slika 11: Mehanizem delovanja saponinov na celično membrano. (1) Od holesterola neodvisna vstavitev aglikona v membrano; (2) Vezava holesterola na saponin; (3) Agregacija saponinov in nastanek por

1.4. SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE

Spektroskopija je veja znanosti, ki kvantitativno in kvalitativno proučuje snov na osnovi absorpcijskega ali emisijskega spektra elektromagnetnega valovanja. Spektroskopske merilne metode so vključene v vsa področja znanosti in tehnike. Glede na opazovani spekter razdelimo spektroskopske metode na emisijske in absorpcijske, glede na vrsto vzorca pa na molekulske in atomske. V emisijski spektroskopiji molekula preide iz višjega energijskega stanja v nižje energijsko stanje in pri tem odda odvečno energijo v obliki fotona. V absorpcijski spektroskopiji molekula absorbira foton z energijo in preide iz nižjega energijskega stanja v višje energijsko stanje.

Fluorescenca je pojav, pri katerem se molekula, ki absorbira svetlobo in s tem preide v višje vzbujeno stanje, vrne v osnovno stanje s sevalnim prehodom. Pri tem se delež absorbirane energije ponovno emitira kot svetloba. Nekatere molekule so dokaj toge in imajo manjše število vibracijskih energijskih stanj. Zato se vibracijska energijska stanja v vzbujenem in osnovnem stanju ne prekrivajo. Take molekule fluorescirajo, imenujemo jih fluori ali fluorofori, saj je prehod iz vzbujenega v osnovno stanje možen le s sevanjem. S fluorescenčnimi merjenji pri makromolekulah dobimo informacije o obliki molekule, vezavnih mestih, stopnji fleksibilnosti in medmolekulskih razdaljah. **Fluorescenčna spektroskopija** je ena glavnih spektroskopskih metod za proučevanje zvijanja proteinov. Fluorescenco pogosto uporabljamo v biologiji celice. Fluorescenčne označevalce pritrdimo na želeni del celice in ti označevalci nato sevajo, kar lahko opazujemo z mikroskopom. Pri tem lahko proučujemo mobilnost proteinov v membranah ali znotraj celice. Fluorescenčno spektroskopijo uporabljamo tudi pri raziskovanju vezave ligandov na proteine, vezave substratov na encime ali vezave hormonov na receptorje (24, 25).

Pri našem delu smo uporabili fluorimetrično metodo. Druga možnost spremljanja razpada produkta bi bila mikroskopska metoda, kjer prav tako opazujemo obarvanje produkta v celicah (7). Prednosti prve, spektrofotometrične metode sta predvsem hitrost, saj lahko kinetične študije opravimo hkrati za 96 različnih vzorcev v mikrotitrski ploščici, in enostavnost (ko je ploščica enkrat v aparaturi, ni potrebno več spremljati analize). Za razliko od spektrofotometrične metode pa je mikroskopsko spremljanje celic veliko bolj zamudno, saj lahko pod mikroskopom proučujemo le eno vrsto vzorca, poleg tega pa je zelo zamudna tudi obdelava podatkov, saj moramo določiti fluorescenco produkta za vsako celico posebej.

2. NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo poskusili razviti metodo, s katero bomo spremljali vpliv saponinov na prehod proteinov v celico. Kot modelni protein bomo uporabili kokošji cistatin, ki v normalnih razmerah ne prehaja v celice. Njegov prehod bomo poskusili izboljšati z dodajanjem saponinskih izvlečkov iz sedmih različnih saponinskih drog.

Saponine bomo najprej ekstrahirali iz drog s pomočjo treh različnih topil (vode, etanola in acetonitrila). Nato bomo njihovo prisotnost v izvlečkih potrdili s tankoplastno kromatografijo (TLC). Pri tem bomo poskušali ugotoviti, katero topilo je najprimernejše za ekstrakcijo. S kapilarno elektroforezo bomo še dodatno potrdili prisotnost glicirizina v izvlečku korenine sladkega korena. Za kontrolo bomo uporabili znano koncentracijo standarda glicirizinske kisline in nato izračunali koncentracijo v izvlečku. Citotoksičnost saponinov bomo preverili s kolorimetričnim preizkusom MTS. Ugotovili bomo, katere razredčitve saponinskih izvlečkov so toksične za tumorske celice MCF-10A neo T in netoksične uporabili za poskuse na celicah.

V prvem delu diplomske naloge bomo poskusili razviti fluorimetrično metodo, s pomočjo katere bi lahko posredno spremljali inhibitorno aktivnost cistatina v celici. Za poskuse na celicah MCF-10A neo T bomo uporabili specifični substrat za katepsin B, Z-Arg-Arg-AMC.

V drugem delu bomo poskušali potrditi hipotezo, da saponini izboljšajo prehajanje cistatina skozi celično membrano. Uporabili bomo različne razredčitve saponinskih izvlečkov in jih dodali celicam pred dodatkom cistatina. Uporabili bomo nemodificirani cistatin in acilirani cistatin z različno dolgimi maščobnimi kislinami. Uspešnost prehoda cistatina bomo posredno spremljali z merjenjem fluorescence. Če bo cistatin zaradi delovanja saponinov prišel v celico, bo uspešno inhibiral katepsin B in nastalo bo manj fluorescenčnega produkta, kar bomo zaznali s pomočjo spektrofotometra.

3. MATERIALI IN METODE DELA

3.1. REAGENTI, PUFRI, RAZTOPINE, TOPILA IN VZORCI

VZORCI – SAPONINSKE DROGE IN STANDARDI

- *Ruscus aculeatus*, rhizoma, izvor Albanija, samonikla, Farmex d.o.o., Nova Gorica, Solkan;
- *Panax ginseng*, radix, izvor Kitajska, kultivirana, Farmex d.o.o., Nova Gorica, Solkan;
- *Liquiritiae radix*, izvor Italija, kultivirana, Farmex d.o.o., Nova Gorica, Solkan;
- *Quillaciae cortex*, izvor Čile, kultivirana, Farmex d.o.o., Nova Gorica, Solkan;
- *Saponariae radix*, izvor Poljska, samonikla, Farmex d.o.o., Nova Gorica, Solkan;
- *Hedera helix*, folium, izvor Maroko, samonikla, Farmex d.o.o., Nova Gorica, Solkan;
- *Primulae radix*, Katedra za farmacevtsko biologijo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija;
- Amonijeva sol glicirizinske kisline, analizne čistote, Fluka, Buchs, Švica;
- Beli saponin, analizne čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija;

TOPILA ZA EKSTRAKCIJO SAPONINOV

- 96 % etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;
- Acetonitril E Chromasolv[®] za HPLC, Sigma, St. Louis, ZDA;

TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

MOBILNA FAZA: kloroform : metanol : voda = 65 : 50 : 10

- Kloroform, stabiliziran z 0,75 % etanola, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska;
- Metanol, analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;

DETEKCIJA: vanilinski orositveni reagent

- Vanilin, za HPLC, Fluka, Steinheim, Nemčija;
- 96 % etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;

- Orto-fosforna kislina 85% (H_3PO_4), kemično čista, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;

Priprava orositvenega reagenta: V 12,5 mL etanola raztopimo 0,5 g vanilina, nato pa dodamo 12,5 mL destilirane vode in 17,5 mL o-fosforne kisline.

KAPILARNA ELEKTROFOREZA

- Boratni pufer s SDS (50 mM borat, 100 mM SDS), elektroforezne čistote, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija;

CITOTOKSIČNOST SAPONINOV

- Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS reagent), Promega, Madison, WI, ZDA;

POSKUSI NA CELIČNIH KULTURAH

- Celice MCF-10A neo T (prof. Bonie F. Sloane, Državna Univerza Wayne, Detroit, MI);
- Substrat *Z-Arg-Arg-AMC*; Sigma, St.Louis, ZDA;
- Nigrozin, epidermalni rastni dejavnik, inzulin, hidrokortizon, antibiotika streptomycin in penicilin, Sigma, St. Louis, MO, ZDA;
- Zarodni goveji serum, HyClone, Logan, UT, ZDA;
- Medij za celične kulture, F12 in DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, ZDA;
- Raztopina kokošjega cistatina (1,0 mg/mL) (Nina Kočever, mag. farm, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija);
- Vzorci aciliranega cistatina (kaproiliranega, oktanoiliranega, dekanoiliranega, lavroiliranega, miristoiliranega, palmitoiliranega, stearoiliranega) (Nina Kočever, mag. farm, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija);
- Natrijev klorid (NaCl), analizne čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška;
- Kalijev klorid (KCl), analizne čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija;
- Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), analizne čistote, Fluka, Buchs, Švica;
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), analizne čistote, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska.
- Vsi ostali reagenti so bili »p.a.«

PBS, pH = 7,4:

Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	5,4 g
KH ₂ PO ₄	0,72 g
NaCl	24 g
KCl	0,6 g
H ₂ O	do 3 L

3.2. OPREMA IN APARATURE

OPREMA IN APARATURE ZA EKSTRAKCIJO SAPONINOV

Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija;

Centrifuga Centric 150, Tehnica, Slovenija;

Tehnica, KERN ALS 120-4, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija;

Ultrazvočna kopel, Sonis 2GT, Iskra, Šentjernej, Slovenija;

Aparat za mletje drog, Eberbach corporation, Michigan, ZDA.

OPREMA IN APARATURE ZA TLC

Silikagel, DC-Platten 10x20cm, Kieselgel 60 F 254, Merck, Darmstadt, Nemčija;

Linomat, Camag, Muttenez, Švica;

Kadička za razvijanje TLC-plošč, Camag, Muttenez, Švica;

Plošča za segrevanje TLC-plošč, Plate Heater III, Camag, Muttenez, Švica;

UV-svetilka, Reprostar 3, Camag, Muttenez, Švica.

OPREMA IN APARATURE ZA KAPILARNO ELEKTROFOREZO

Kapilarna elektroforeza HP^{3D} Capillary Electrophoresis System, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija;

Računalniški program 3D-CE ChemStation;

Steklena kapilara z mehurčno detekcijsko celico, 56 cm × 50 µm (50 cm do detektorja).

OPREMA IN APARATURE ZA POSKUSE NA CELIČNIH KULTURAH

Mikrotitrne ploščice, TPP, Trasadingen, Švica;

8-kanalna pipeta 5–100 µL, Biohit, Helsinki, Finska;

Pipete, Biohit, Helsinki, Finska;

Mikrotitrski čitalec Tecan Safire 2, Tecan Group, Männedorf, Švica;
Računalniški program Magellan, verzija 4.1.

3.3. METODE DELA

3.3.1. EKSTRAKCIJA SAPONINOV

Ekstrakcija je metoda, s katero izvlečemo želene snovi iz trdne zmesi ali raztopine. Ekstrakcija temelji na različni topnosti posameznih spojin v ekstrakcijskem topilu. Topnost neke spojine je odvisna od tega, v kolikšni meri so njene molekule sposobne tvoriti vezi s topilom. Polarne spojine so praviloma dobro topne v polarnih topilih, nepolarne spojine pa v nepolarnih topilih. Izberemo tako topilo, ki najbolje topi želeno spojino, ostale pa topi čim manj (26).

POSTOPEK EKSTRAKCIJE SAPONINOV

Najprej smo uprašili sedem različnih saponinskih drog, in sicer: korenine spomladanskega jegliča, korenine navadne milnice, korenine golostebelnega sladkega korena, liste navadnega bršljana, korenike bodeče lobodike, skorjo kvilaje in korenine ginsenga. Nato smo natehtali 1 g vsake droge v epruvete in jim dodali 5 mL destilirane vode, 70-odstotnega etanola ali 70-odstotnega acetonitrila. Epruvete smo nato postavili za 10 minut v ultrazvočno kadičko. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 5000 rpm in 20 °C. Pri večini vodnih izvlečkov je bilo potrebno še dodatno centrifugiranje za 10 minut, saj so delci droge ostali v supernatantu. Po uspešnem centrifugiranju smo supernatante odpipetirali v mikrocentrifugirke in jih shranili v hladilnik. Vodne izvlečke, ki smo jih uporabljali za poskuse na celičnih kulturah, smo pripravljali sproti, tako da smo se izognili možnim kemijskim spremembam v samem izvlečku.

3.3.2. DETEKCIJA SAPONINOV – TLC

TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA je kromatografija na odprti mikrokoloni tanke plasti adsorbenta, ki je fizikalno vezan na steklene, polietilenske ali aluminijaste plošče. Kromatografski sistem je sestavljen iz stacionarne in mobilne faze ter

vzorca. Med kislimi adsorbenti uporabljamo predvsem silikagel. To je posušen gel silicijevega dioksida, ki ima veliko specifično površino ($450 \text{ m}^2/\text{g}$). Silikagelu na ploščah je lahko primešan fluorescenčni indikator fluorescein, ki pri valovni dolžini 254 nm zeleno fluorescira (plošče imajo oznako GF 254). Ker veliko spojin pri tej valovni dolžini absorbira UV-svetlobo, jih zato vidimo kot temne lise na zeleno-rumeni podlagi. Na plošči so seveda lahko še druge komponente, ki niso vidne pri UV-svetlobi. Le-te napravimo vidne z raznimi reagenti, ki jih razpršimo po plošči in ki dajo po reakciji z določeno funkcionalno skupino takoj ali po toplotni obdelavi obarvane produkte. Za obarvanje nekaterih funkcionalnih skupin so na voljo specifični orositveni reagenti (27). Velikost delcev adsorbenta in debelina premaza sta pomembna dejavnika, ki vplivata na retencijski faktor, ki ga pri TLC definiramo kot razmerje med potjo spojine in potjo mobilne faze. Retencijski faktor je odvisen od nasičenosti komore s parami mobilne faze, temperature, količine vzorca in stacionarne faze. R_f je za določene spojine konstanten v določenem kromatografskem sistemu le v primeru, če so vsi dejavniki, ki nanj vplivajo pod nadzorom in v zahtevanih mejah. Ker vse dejavnike, ki vplivajo na R_f , težko nadzorujemo, za določanje prisotnosti določene spojine v vzorcu hkrati nanesemo na isto ploščo preiskovani vzorec in znano komponento (standard). Na ta način lahko hitro preverimo prisotnost določene spojine v vzorcu (27).

POSTOPEK DETEKCIJE SAPONINOV

Na TLC-ploščo smo s pomočjo linomata nanesli po 5 μL različnih saponinskih izvlečkov (v vodi, etanolu in acetonitrilu). Razvijanje je potekalo v nasičeni kadički z mobilno fazo kloroform : metanol : voda = 65 : 50 : 10. Ko je mobilna faza dosegla označen konec TLC-plošče, smo ploščo vzeli iz kadičke in jo posušili. Ploščo smo najprej pogledali pod UV-svetlobo pri 254 nm in si označili vidne lise. Ker vse komponente niso vidne pri UV-svetlobi, smo le-te napravili vidne s specifičnim orositvenim reagentom za saponine, z vanilinskim orositvenim reagentom (14). Vse sestavine zanj smo dobro premešali in prenesli v bučko za orositev. Ploščo smo nato enakomerno orosili in segreli na grelni plošči, tako da so lise postale vidne. Izračunali smo še retencijske faktorje.

Pripravili smo raztopine razpoložljivih standardov v metanolu. Vzeli smo 1 mg standarda glicirizinske kisline (v obliki amonijeve soli) in 1 mg standarda čistega belega saponina. Oba smo raztopili v 1 mL metanola in ju nanesli na TLC-ploščo. Hkrati pa smo

na ploščo nanesti tudi saponinske izvlečke korenin sladkega korena in korenin navadne milnice.

3.3.3. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Ločitev analita poteka v stekleni kapilari, ki je napolnjena z elektroforeznim pufrom, ob priključitvi visoke napetosti. Razlika v napetosti med anodo in katodo povzroči potovanje nabitih delcev, poleg tega pa na način njihovega potovanja vpliva še dodatni tekočinski tok – elektroosmozni tok. Ta nastane zaradi silanolnih skupin z negativnim nabojem, ki so prisotne na notranji površini steklene kapilare. Silanolne skupine privlačijo katione (predvsem oksonijeve ione), ki začnejo potovati po priključitvi napetosti proti katodi in s seboj potegnejo celotno raztopino. Elektroosmozni tok je ponavadi močnejši od elektroforezne mobilnosti molekul, zato proti elektrodi z negativnim nabojem potujejo tako molekule s pozitivnim kot tudi z negativnim nabojem ter nevtralne molekule. Hitrost molekul je odvisna od naboja, velikosti molekule, električnega polja, viskoznosti pufru in zamreženosti eventualno prisotnega gela (4, 7).

Pogoji analize so bili: injiciranje $40 \text{ mbar} \times 20 \text{ s}$, napetost 25 kV, temperatura 30 °C, pufer 20 mM SDS v 50 mM boratu s pH 9,3. Spiranje pred analizo 2 minuti s pufrom ter po analizi 1 minuto z metanolom, 1 minuto z 0,1 M NaOH in 1 minuto z vodo.

PRIPRAVA VZORCEV IN POSTOPEK ANALIZE

Vzorec smo pripravili tako, da smo 0,5077 g korenin sladkega korena natehtali v epruveto in dodali 5 mL H₂O. Nato je 5 minut potekalo sonificiranje na sobni temperaturi, sledilo je centrifugiranje 2-krat po 5 minut pri 5000 rpm in 20 °C. Odvzeli smo supernatant, ga 10-krat razredčili z vodo in analizirali. Standard (glicirizin) smo pripravili kot vodno raztopino v osnovni koncentraciji 1 mg/mL, ki smo jo razredčili z vodo do koncentracije 50 µg/mL.

3.3.4. DOLOČEVANJE CITOTOKSIČNOSTI SAPONINOV S PREIZKUSOM MTS

Citotoksično aktivnost saponinov smo preverjali s kolorimetričnim preizkusom MTS (6). Preizkus izkorišča reduktivno sposobnost celic, da metabolizirajo rumeno 5-(karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetiltiazol)-3-(4-sulfenil) tetrazolijevo sol (MTS) do vijoličnega, v vodi topnega formazanskega produkta. Približno 5×10^4 celic, suspendiranih v 100 μL rastnega medija, smo razporedili v luknjice mikrotitrne plošče. Po enem dnevu inkubacije smo rastnemu mediju dodali vodne izvlečke različnih saponinskih drog v različnih koncentracijah. Inkubacija je potekala 24 ur pri 37 °C in v atmosferi s 5 odstotki CO_2 . Nato smo saponinske izvlečke odstranili in dodali svež rastni medij. Kontrolni vzorci so vsebovali le rastni medij. Dodali smo 20 μL MTS (0,5 mg/mL) in inkubirali 2 uri pri 37 °C. Absorbanco smo izmerili pri 592 nm. Celično viabilnost izračunamo po enačbi 1:

$$\text{Celična viabilnost (\%)} = \frac{A_{\text{testnih celic}}}{A_{\text{kontrolnih celic}}} \times 100$$

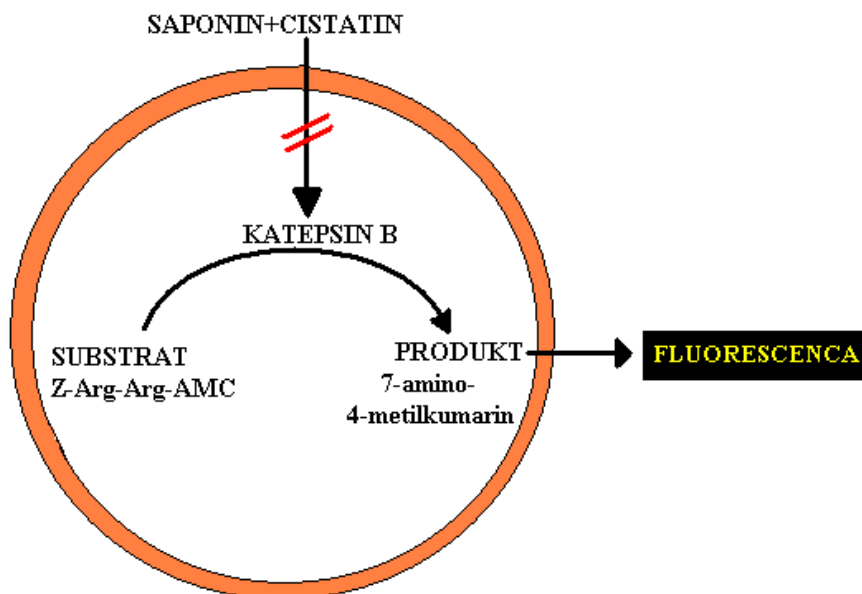
Enačba 1: Izračun celične viabilnosti

$A_{\text{testnih celic}}$... absorbanca za celice, izpostavljene različnim koncentracijam saponinskih izvlečkov

$A_{\text{kontrolnih celic}}$... absorbanca za kontrolne celice

3.3.5. POSKUSI NA CELIČNIH KULTURAH

Poskuse smo izvajali na celicah MCF-10A neo T, za katere je značilno povečano izražanje katepsina B. Kot modelni protein smo izbrali cistatin, ki je reverzibilni inhibitor katepsina B, vendar v normalnih razmerah ne more vstopiti v celico. Saponini naj bi omogočili prehod cistatina skozi celično membrano. Cistatin bi tako znotraj celice inhibiral katepsin B, ki zato ne bi bil sposoben razgraditi specifičnega kumarinskega substrata Z-Arg-Arg-AMC do 7-amino-4-metilkumarina, ki je za razliko od nerazgrajenega substrata močno fluorescenčen. Zato bi nastalo manj produkta in zaznali bi nižjo fluorescenco. Proučevani sistem je shematsko prikazan na sliki 12.



Slika 12: Shema proučevanega sistema

Celice MCF-10A neo T izvirajo iz celične linije človeških epitelijskih prsnih celic. Vstavili so jim gen za rezistenco na neomicin in onkogen c-Ha-ras. Celične kulture smo gojili v monosloju v mediju DMEM/F12 (1 : 1, v/v) z dodatki: 2 mM glutamin, 10 µg/mL inzulina, 0,5 µg/mL hidrokortizona, 20 ng/mL epidermalnega rastnega dejavnika, 12,5 mM HEPES, antibiotiki in 5-odstotni zarodni goveji serum pri 37 °C, v atmosferi s 5 odstotki CO₂. Pred uporabo smo jih odcepili od podlage z 0,05-odstotnim tripsinom in 0,02-odstotno EDTA v PBS (pH = 7,4). Vitalna sposobnost celic je bila okoli 90 odstotkov, kar smo preverili z barvilom nigrozin (6, 7).

Pred poskusom smo razporedili v vsako luknjico mikrotitrne plošče približno 2×10^4 celic, suspendiranih v 100 µL rastnega medija, in inkubirali 2 dneva v celičnem mediju pri 37 °C ter atmosferi s 5 odstotki CO₂. Nato smo medij odstranili in dodali medij brez seruma, ki je vseboval saponinske vzorce in cistatin, kar podrobno opisujemo v naslednjem odstavku. Vse poskuse smo izvajali v štirih ponovitvah. Fluorescenco smo merili pri valovni dolžini ekscitacije 380 nm in emisije 460 nm. Šlo je za kinetično meritev znotraj 45 minut pri 37 °C. Ker gre za zvezno metodo, smo opazovali reakcijsko mešanico ves čas reakcije-spremljali smo torej kinetiko procesov. Spektrofotometer je meril fluorescenco vsako minuto v nekem časovnem obdobju in na koncu je program Excel izrisal grafe fluorescence v odvisnosti od časa. Na podlagi teh podatkov smo izračunali naklone krivulj

za različne vzorce, ki smo jih primerjali med sabo. V prisotnosti cistatina bi se naj nakloni krivulj znižali, saj je le-ta posredno onemogočal nastajanje produkta.

POSTOPEK

Iz delovne raztopine cistatina (s koncentracijo cistatina 1 mg/mL) in vode smo pripravili 12,8 μ M osnovno raztopino cistatina (s koncentracijo 167 μ g/mL), ki smo jo nato razredčili s PBS do naslednjih koncentracij: 0,2 μ M, 0,4 μ M, 1 μ M in 2 μ M. Na enak način smo pripravili raztopine aciliranih cistatinov z različno dolgimi maščobnimi kislinami (kaproiliranega, oktanoiliranega, dekanoiliranega, lavroiliranega, miristoiliranega, palmitoiliranega in stearoiliranega).

V nadaljevanju smo uporabili oznake:

- **C0** za nemodificirani cistatin;
- **C6** za kaproilirani cistatin, aciliran s **šest** ogljikovih atomov dolgo kaprinsko kislino;
- **C8** za oktanoilirani cistatin, aciliran z **osem** ogljikovih atomov dolgo oktanojsko kislino;
- **C10** za dekanoilirani cistatin, aciliran z **deset** ogljikovih atomov dolgo dekanajojsko kislino;
- **C12** za lavroilirani cistatin, aciliran z **dvanajst** ogljikovih atomov dolgo lavrinsko kislino;
- **C14** za miristoilirani cistatin, aciliran s **štirinajst** ogljikovih atomov dolgo miristinsko kislino;
- **C16** za palmitoilirani cistatin, aciliran s **šestnajst** ogljikovih atomov dolgo palmitinsko kislino, in
- **C18** za stearoilirani cistatin, aciliran z **osemnajst** ogljikovih atomov dolgo stearinsko kislino.

Raztopino substrata Z-Arg-Arg-AMC smo pripravili v 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M in 200 μ M koncentraciji.

Najprej smo poskušali ugotoviti, katera koncentracija substrata je najprimernejša. Poskus smo izvedli tako, da smo celicam dodali različne koncentracije substrata (5 μ M, 50 μ M, 100 μ M ali 200 μ M) ter 45 minut spremljali fluorescenco. Kot kontrola so nam služile same raztopine substrata v PBS (brez celic) v enakih koncentracijah kot pri poskusu s celicami.

Prvi poskus s cistatini smo izvedli tako, da smo celicam dodali po 100 μL 0,2 μM raztopine C0, C6, C8, C10, C12, C14, C16 ali C18. Celice smo inkubirali 15 minut in jim nato odvzeli raztopine cistatina. V vse luknjice smo dodali 100 μL 5 μM raztopine substrata in 45 minut spremljali spreminjanje fluorescence. Za kontrolo smo uporabili same celice brez medija, celice, ki smo jim tik pred merjenjem celični medij zamenjali s substratom, in sam substrat v PBS. Na enak način smo postopek ponovili, le da smo uporabili 100 μM raztopino substrata.

Nato smo poskusili »razbiti« celično steno z dodatkom 1 M NaOH. V ta namen smo celice najprej inkubirali 20 min z raztopinami različno aciliranih cistatinov in neacilirane cistatina, jih nato sprali in dodali 100 μL 5 μM substrata za 15 minut. Nato smo vse odstranili in dodali NaOH ter izmerili fluorescenco. Kontrole so bile enake kot v prejšnjem poskusu.

V naslednji stopnji smo spremenili tudi koncentracijo cistatina. Tokrat smo uporabili 0,2 μM in 1 μM raztopine C0, C8, C12, C16 in C18. Po 15-minutni inkubaciji smo raztopine odstranili in dodali 100 μL 5 μM ali 10 μM raztopine substrata. Za kontrolo smo uporabili celice z dodatkom substrata in samo raztopino substrata.

Po optimizaciji metode smo pričeli celicam dodajati raztopine različno razredčenih vodnih izvlečkov saponinskih drog. Pri vseh poskusih smo na koncu dodali 100 μL 5 μM raztopine substrata (v nadaljevanju substrat).

Najprej smo uporabili vodni izvleček jegliča. Pripravili smo 10-, 100-, 1000- in 2000-krat s PBS razredčene izvlečke. Celicam smo najprej odstranili medij in jim dodali 100 μL različno razredčenih saponinskih izvlečkov za 15 minut (v dveh ponovitvah). Nato smo polovici celic dodali 100 μL 0,4 μM cistatina, drugo polovico pa sprali in dodali 200 μL 0,2 μM cistatina, zato da sta bili končni koncentraciji cistatina v raztopinah enaki. Inkubacija celic je potekala 15 minut, nakar smo raztopine odstranili in dodali v vse luknjice substrat ter 45 minut merili fluorescenco. Za kontrolo smo po prvi 15-minutni inkubaciji še netretiranim celicam odstranili medij in jim dodali 200 μL 0,2 μM raztopine cistatina (C0). Po 15 minutah smo jih obravnavali enako kot celice, ki smo jim dodali saponine. Drugo kontrolo so predstavljale celice, ki smo jim tik pred meritvijo odstranili medij in jim dodali substrat, ter tretjo same celice z dodatkom 100 μL PBS. Naredili smo še poskuse z dodatnimi kontrolami, kjer smo predvsem ugotavljali medsebojne možne vplive saponinov, substrata in cistatina. Celicam smo najprej odstranili medij. V 4 luknjice

Sledil je poskus z različnimi koncentracijami glicirizinskega standarda v vodi. 5 mg glicirizinskega standarda smo raztopili v 1 mL tople vode. Z razredčenjem z vodo smo pripravili raztopine s koncentracijami 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ in 10 $\mu\text{g/mL}$. Tokrat smo pričeli vse celice tretirati istočasno in tako poskušali dobiti čim bolj primerljive rezultate. Medij smo odstranili vsem celicam. Nato smo prvi skupini celic dodali po 100 μL različno koncentriranih raztopin glicirizinskega standarda (tako celicam, ki jim ne odstranimo saponinov, kot tudi celicam, ki jim speremo saponine). Kontrola tej skupini so bile celice, ki smo jim dodali samo 100 μL PBS. Inkubirali smo 15 minut. Nato smo polovico celic s saponini sprali (saponine odstranili) in jim dodali 200 μL 0,2 μM raztopine cistatina. Ostalim celicam s saponini pa smo dodali 100 μL 0,4 μM raztopine cistatina. Celicam s PBS smo raztopino odvzeli in jim dodali 100 μL raztopine saponinov. Drugim celicam, ki smo jim prav tako odstranili PBS, smo zdaj dodali 200 μL PBS, saj so služile za kontrolo celicam, ki smo jim na tej stopnji dodali 200 μL 0,2 μM raztopine cistatina. Inkubacija je spet potekala 15 minut. Na koncu smo odstranili vse raztopine in celicam dodali substrat ter merili fluorescenco.

Nato smo naredili poskus z različnimi koncentracijam glicirizinskega standarda v PBS. Preglednica II prikazuje zaporedje dodatkov različnih raztopin celicam. Oznaka SAP(številka) pomeni koncentracijo raztopine saponina v $\mu\text{g/mL}$, C0 pomeni raztopino nemodificiranega cistatina in oznaka SUB predstavlja raztopino substrata. Spiranje pomeni, da smo po 15 minutah inkubacije raztopino odstranili. Vedno smo dodali 100 μL raztopine, razen ko je označeno drugače. Po prvem dodatku je inkubacija potekala 15 minut, prav tako po drugem. Enako velja za vse naslednje preglednice.

Preglednica II: Zaporedje dodatkov raztopin celicam pri uporabi glicirizinskega standarda v PBS

SAP1+ C0 0,4 μ M + SUB
SAP1 + PBS + SUB
SAP5 + C0 0,4 μ M + SUB
SAP5 + PBS + SUB
SAP10 + C0 0,4 μ M + SUB
SAP10 + PBS + SUB
SAP1(spiranje) + C0 0,2 μ M (200 μ L) + SUB
SAP5(spiranje) + C0 0,2 μ M (200 μ L) + SUB
SAP10(spiranje) + C0 0,2 μ M (200 μ L) + SUB
PBS(spiranje) + C0 0,2 μ M (200 μ L) + SUB
PBS + SAP1 + SUB
PBS + SAP5 + SUB
PBS + SAP10 + SUB
PBS + PBS + SUB
PBS + PBS + PBS

Sledila je serija poskusov, v katerih smo uporabili raztopino glicirizinskega standarda v PBS s koncentracijo 1 μ g/mL. Najprej smo tretirali celice po zaporedju, ki ga prikazuje preglednica III. Na isti ploščici smo hkrati naredili poskus, v katerem smo celice na koncu najprej 2-krat sprali s 100 μ L PBS in šele nato dodali substrat.

Preglednica III: Zaporedje dodatkov raztopin celicam pri uporabi glicirizinskega standarda v PBS pri spiranju celic pred dodatkom substrata

SAP1 + C0 + SUB
SAP1 + PBS + SUB
SAP1(spiranje) + C0 0,2 μ M (200 μ L) + SUB
PBS(spiranje) + C0 0,2 μ M (200 μ L) + SUB
PBS + SAP1 + SUB
PBS + PBS + SUB
PBS + PBS + PBS

Nato smo naredili enake poskuse za vse saponinske izvlečke, le da smo uporabili različne s PBS razredčene izvlečke, odvisno od tega, pri kateri razredčitvi so bili izvlečki toksični. Zaporedje dodatkov raztopin celicam prikazuje preglednica IV. Uporabili smo 100-krat razredčene vodne izvlečke korenin sladkega korena in korenin navadne milnice ter 50-krat in 100-krat razredčene izvlečke listov navadnega bršljana, korenin ginsenga in korenin bodeče lobodike.

Preglednica IV: Zaporedje dodatkov raztopin celicam pri uporabi saponinskih izvlečkov

PBS + C0 + SUB
SAP + C0 + SUB
SAP + PBS + SUB
SAP(spiranje) + C0 0,2 μ M (200 μ L) + SUB
PBS(spiranje) + C0 0,2 μ M (200 μ L) + SUB
PBS + SAP + SUB
PBS + PBS + SUB
PBS + PBS + PBS

Na koncu smo poskusili še z višjo koncentracijo nemodificiranega in palmitoiliranega cistatina. Uporabili smo 1 μ M in 2 μ M raztopino proteina. Zaporedje dodatkov je bilo enako kot v preglednici IV, uporabili pa smo 100-krat razredčen izvleček korenin sladkega korena. Podobno smo naredili, ko smo uporabili 100-krat razredčen izvleček korenin navadne milnice, le da smo celicam na koncu dodali vodo za 5 minut. 10 μ M raztopino substrata (ki je dala končno koncentracijo 5 μ M) smo nato dodali kar celicam v vodi in nato merili fluorescenco.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. EKSTRAKCIJA IN DETEKCIJA SAPONINOV

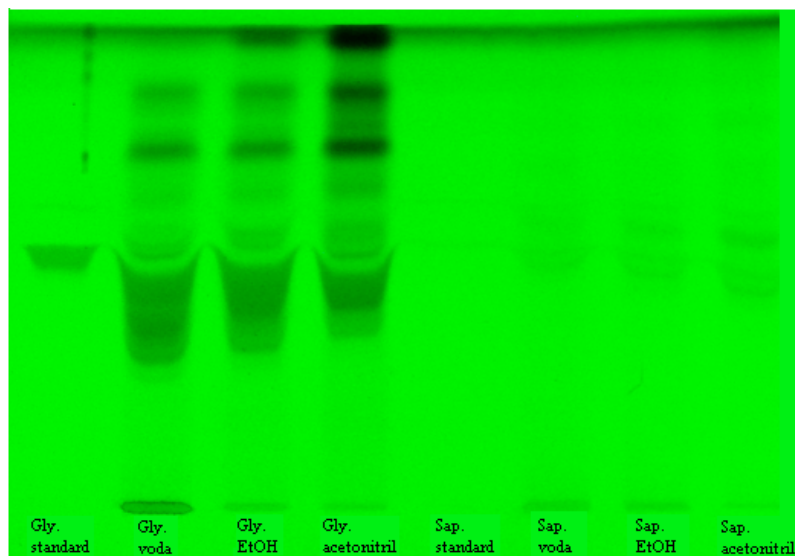
Za ekstrakcijo smo uporabili tri različna topila; vodo, etanol in acetonitril. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo preverili, kako učinkovito so se saponini izločili iz droge. Ker pri uporabi različnih topil ni bilo večjih vidnih razlik med lisami na TLC-ploščah, smo se odločili za nadaljnjo uporabo vodnih izvlečkov. Domnevali smo, da bo voda pri tako majhni količini (izvlečke smo kasneje razredčili s PBS) najmanj vplivala na celice. Po primerjavi dobljenih retencijskih faktorjev (R_f) z referenčnimi retencijskimi faktorji iz literature (14), smo ugotovili, da se le-ti razlikujejo. Na naših TLC-ploščah so bili običajno nekoliko višji, kar pa je najverjetneje posledica različnih razmer, predvsem različne temperature.

Po nanosu izvlečkov korenin jegliča in razvijanju, lis nismo videli pod UV-svetlobo. Uporabiti smo morali orositveni vanilinski reagent in nato segrevati. Pojavile so se vijolične lise pri R_f 0,73 za vodni izvleček in nekoliko nižje še lise etanolnega in acetonitrilnega izvlečka (slika 13).

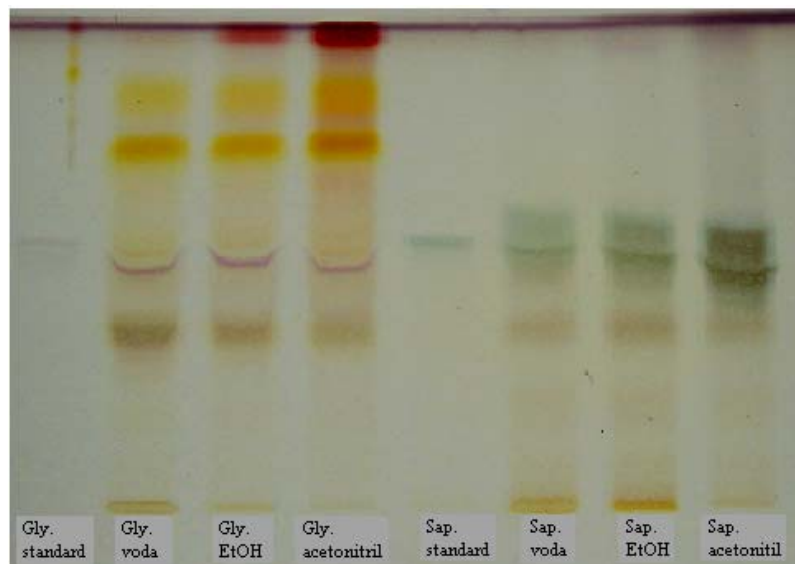


Slika 13: TLC-plošča za izvlečke korenin jegliča (na sliki označeno kot Primula) po orositvi z vanilinskim reagentom

Sliki 14 in 15 prikazujeta rezultate za izvlečke sladkega korena in navadne milnice ter njuna standarda v metanolu, prva po detekciji pri UV-254 in druga po orositvi z vanilinskim reagentom.



Slika 14: TLC-plošča pod UV-254 nm za izvlečke korenin sladkega korena (Gly.) in korenin navadne milnice (Sap.) z različnimi topili ter njuna standarda v metanolu

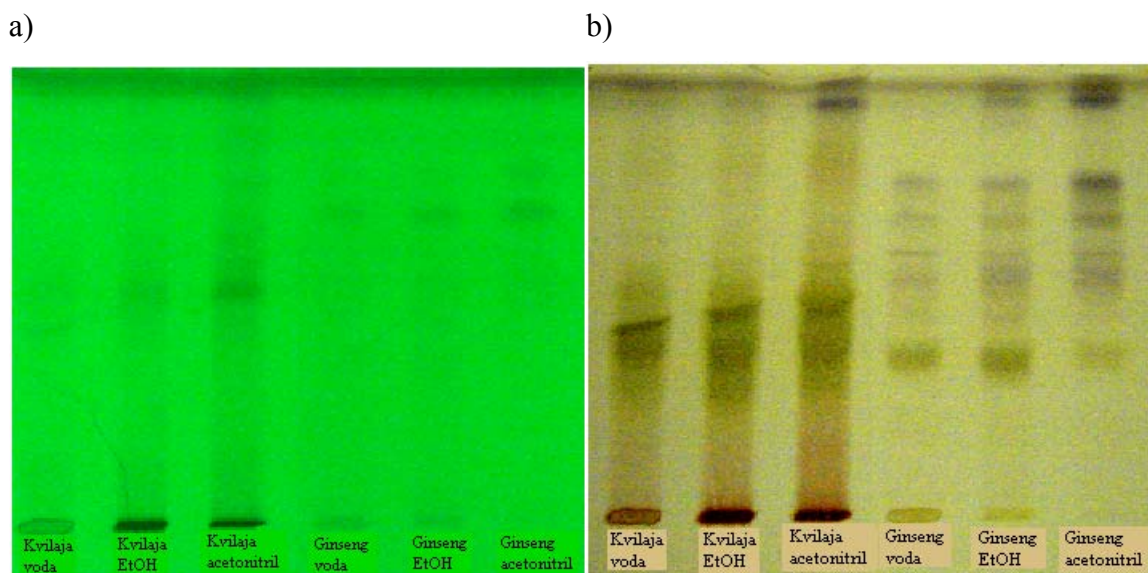


Slika 15: TLC-plošča po orositvi z vanilinskim reagentom za izvlečke korenin sladkega korena (Gly.) in korenin navadne milnice (Sap.) ter njuna standarda v metanolu

Retencijski faktor glicirizinskega standarda je 0,55. R_f-ji za različne izvlečke sladkega korena se ujemajo z R_f standarda, le da so pod UV-svetlobo vidne podaljšane lise. Vzrok je najverjetneje velika koncentracija saponinov v izvlečku. Vijolične lise po

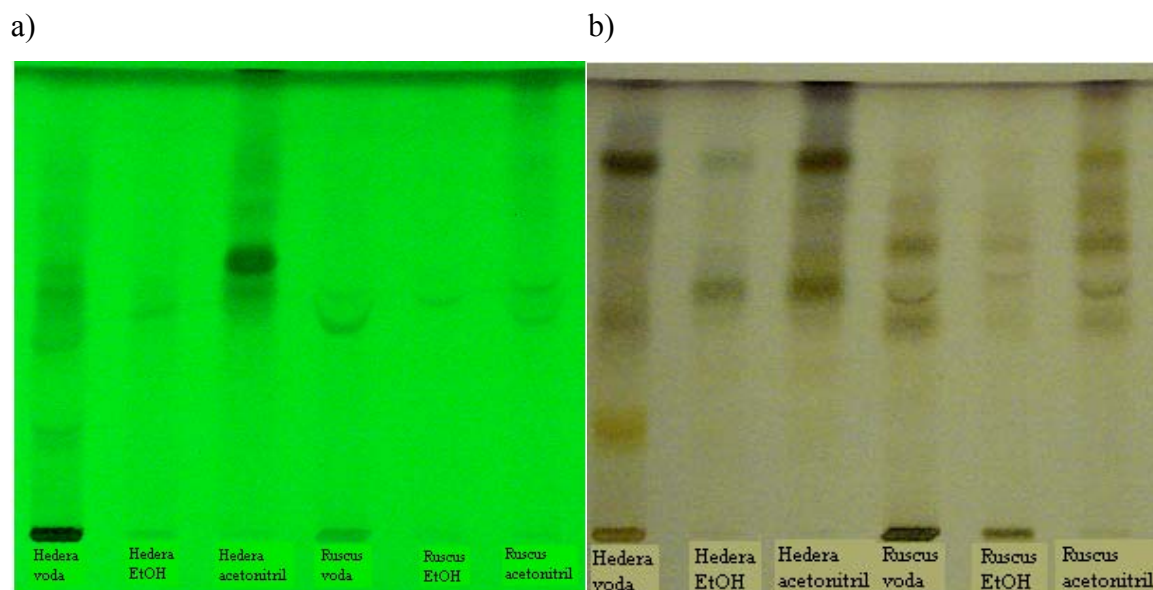
orositvi z vanilinskim reagentom se prav tako ujemajo z liso standarda. Pri R_f 0,75 opazimo rumene lise, ki dokazujejo prisotnost flavonoidov v izvlečkih sladkega korena. R_f standarda belega saponina je 0,55. Po orositvi vidimo na TLC-plošči zeleno-rjave lise, ki potrjujejo prisotnost saponinov v izvlečkih.

Lise za izvlečke kvilaje in ginsenga so pod UV-svetlobo zelo slabo vidne (slika 16a), zato smo tudi v tem primeru uporabili orositveni reagent (slika 16b). Pri kvilaji se pojavijo temnorjave lise pri R_f 0,44–0,47. Ginseng daje večje število temnovijolično obarvanih lis pri R_f 0,45–0,75. Intenzivnost lis je največja za acetonitrilni izvleček in najmanjša za vodni izvleček, kar kaže na to, da acetonitril omogoči najučinkovitejšo ekstrakcijo.



Slika 16: TLC-plošča pod UV-254 nm (a) in po orositvi z vanilinskim reagentom (b) za izvlečke ginsenga in kvilaje

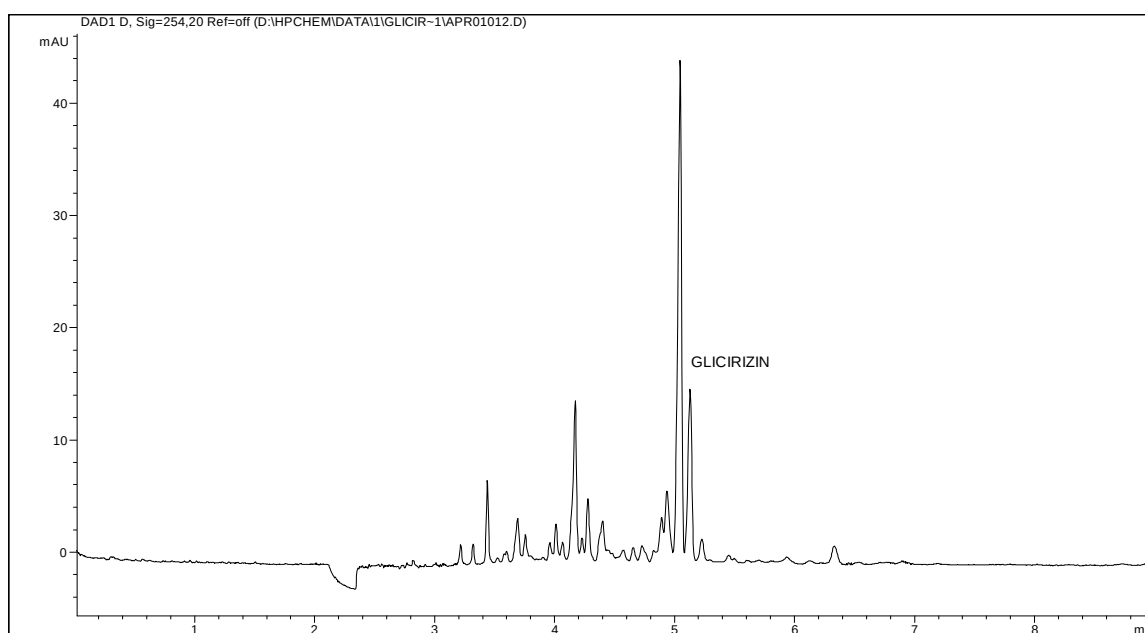
Bršljanovi izvlečki dajejo pod UV-svetlobo vidne lise pri R_f 0,64 za vodo in 0,54 za acetonitril (slika 17a). Pri vseh izvlečkih so po orositvi vidne modro-črne lise pri enakih R_f kot pod UV-svetlobo in dodatno še pri R_f 0,85, vendar te lise najverjetneje predstavljajo druge spojine (slika 17b). Pri izvlečkih bodeče lobodike lahko pod UV-svetlobo vidimo lise pri R_f 0,50 (slika 17a), ki se po orositvi obarvajo temno vijolično (slika 17b).



Slika 17: TLC-plošča pod UV-254 nm (a) in po orositvi z vanilinskim reagentom (b) za izvlečke navadnega bršljana in bodeče lobodike

4.2. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

S kapilarno elektroforezo smo določili koncentracijo glicirizina v vodnem izvlečku korenin sladkega korena. Iz podatkov o površini pod vrhom standarda glicirizina in vrhom glicirizina v izvlečku smo izračunali koncentracijo saponinov v vodnem izvlečku korenine sladkega korena.



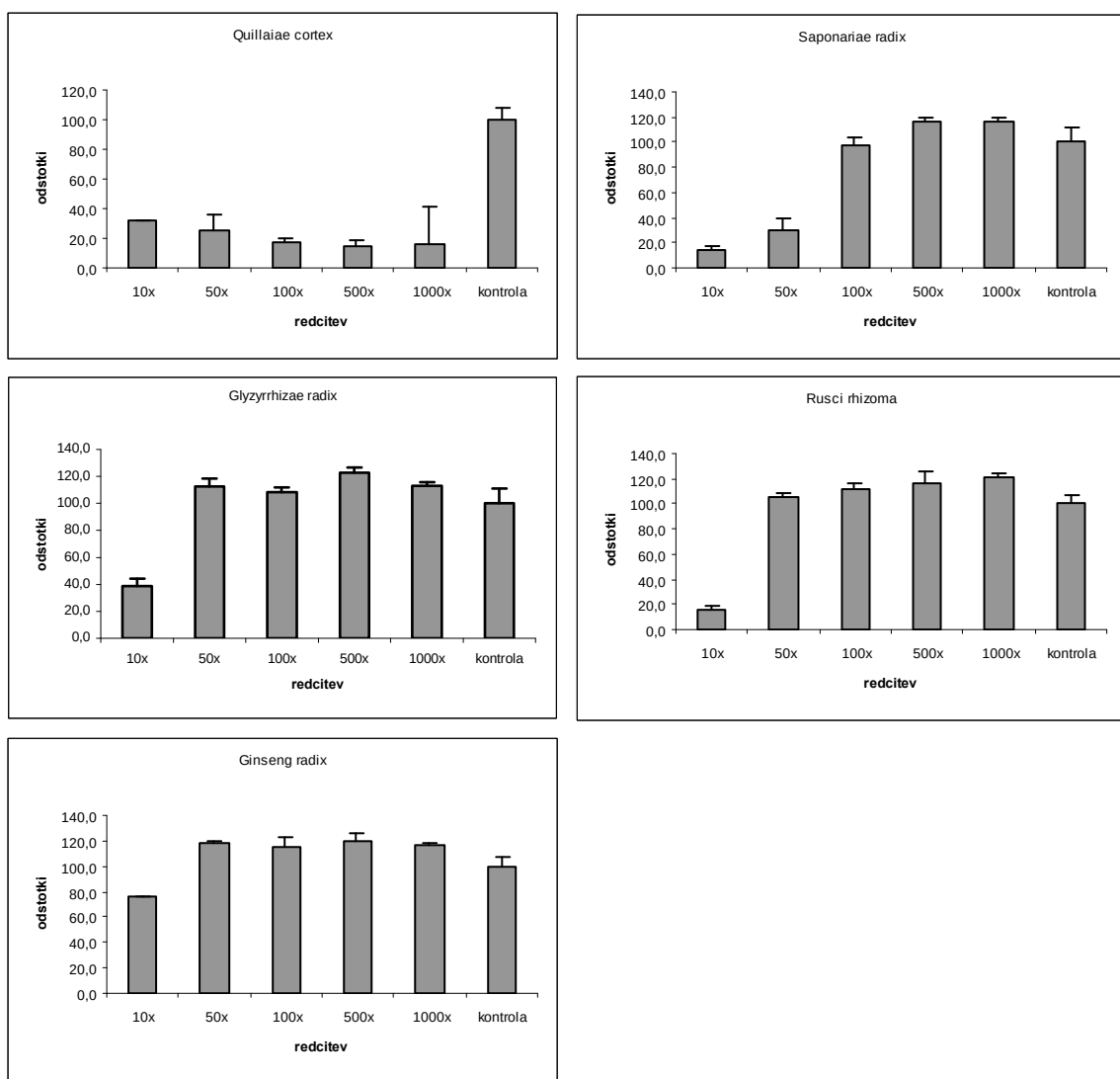
Slika 18: Elektroferogram vodnega izvlečka sladkega korena; označen je vrh, ki predstavlja glicirizin

Preglednica V: Rezultati kapilarne elektroforeze

	Glicirizin – standard (c = 50 µg/mL)	Glicirizin – izvleček
Migracijski čas	5,023 min	5,131 min
Površina	54,2 mAU × min	32,2 mAU × min

Iz podatkov v preglednici V smo izračunali, da je koncentracija saponinov v 10-krat razredčenem izvlečku 29,7 µg/mL, kar pomeni, da je koncentracija glicirizina v nerazredčenem izvlečku skoraj 0,3 mg/mL.

4.3. CITOTOKSIČNOST SAPONINOV



Slika 19: Grafi prikazujejo odstotek preživelih celic v odvisnosti od dodatka vodnih izvlečkov iz saponinskih drog v različnih razredčitvah. Kontrolo predstavljajo celice, ki jim niso bili dodani saponinski izvlečki.

S kolorimetričnim preizkusom MTS smo ugotovili, katere koncentracije saponinskih izvlečkov so primerne za proučevanje vpliva saponinov na prehajanje cistatina skozi celično membrano. Saponini, ki v določeni koncentraciji uničijo celice, so neprimerni za spremljanje prehoda cistatina. Rezultate preizkusa MTS prikazuje slika 19.

Izвлеčki kvilaje so bili toksični za celice v vseh razredčitvah. Saponini izvlečka navadne milnice, ki smo ga razredčili 10-krat, so ubili večino celic, medtem ko je 50-krat razredčen izvleček omogočil preživetje le 30 odstotkom celic. Izvlečka sladkega korena in bodeče lobodike sta bila toksična le pri 10-kratni razredčitvi, pri ostalih razredčitvah pa nista imela večjega vpliva na preživetje celic. Ginseng je bil izmed vseh drog najmanj toksičen, saj je tudi pri 10-kratni razredčitvi preživel skoraj 80 odstotkov celic. Ker v času izvajanja preizkusa MTS nismo imeli na razpolago listov navadnega bršljana in korenin jegliča, citotoksičnosti teh izvlečkov nismo ugotavljali.

Glede na rezultate preizkusa o cistotoksičnosti saponinov smo pri nadaljnjih poskusih uporabljali saponinske izvlečke v netoksičnih koncentracijah.

4.3. POSKUSI NA CELIČNIH KULTURAH

Za poskuse na celičnih kulturah smo uporabili celice MCF-10A neo T. Po dodatku različnih raztopin saponinov oziroma cistatina smo inhibicijo aktivnega katepsina B določili fluorimetrično z merjenjem razgradnje za katepsin B specifičnega sinteznega kumarinskega substrata Z-Arg-Arg-AMC. Katepsin B cepi substrat in sprosti se 7-amino-4-metilkumarin. Njegova koncentracija je merilo za aktivnost katepsina B, ki smo jo določili posredno preko fluorescence. Po dodatku cistatina celicam in njegovem uspešnem prehodu vanje pride v celici do začasne inhibicije katepsina B, ta pojav pa zaznamo kot počasnejše naraščanje fluorescence, saj nastaja manj fluorescenčnega produkta. Ker pa cistatin sam težko prehaja v celice, smo mu prehod poskusili olajšati z dodatkom saponinov.

Rezultate smo prikazali kot povprečne naklone štirih ponovitev za vsak posamezen vzorec znotraj določenega časovnega intervala. Če je bila inhibicija katepsina B uspešna, je nastalo manj fluorescenčnega produkta, kar se je pri rezultatih pokazalo kot manjši naklon. Poudariti moramo tudi, da poskusi na različnih mikrotitrskih ploščah med sabo niso neposredno primerljivi. To lahko pripišemo samim celicam, ki so živ sistem in opravljajo

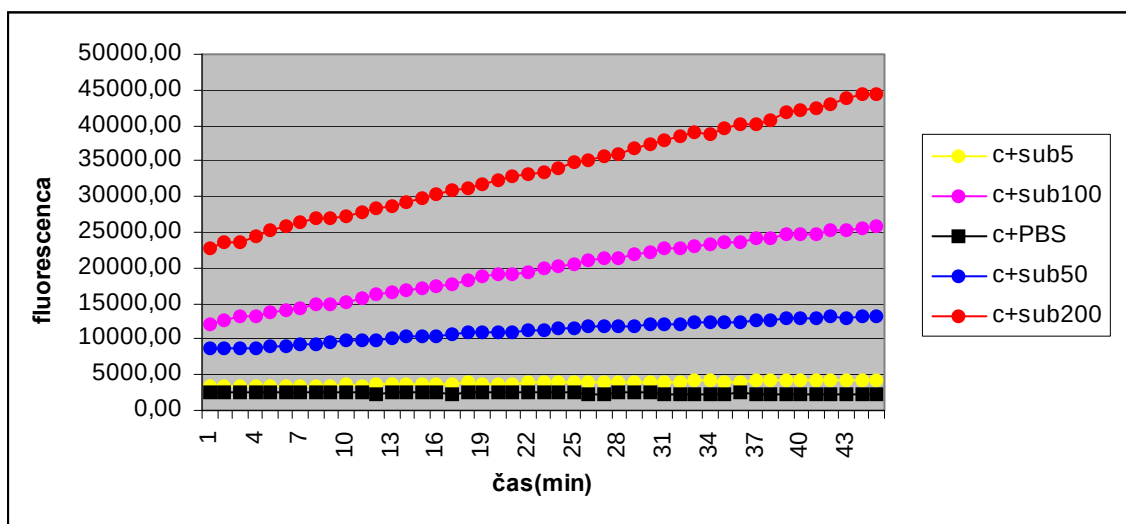
vsaka zase svoje življenjske procese, zato se nekoliko razlikujejo tudi njihove metabolične sposobnosti (več endosomov s proteolitičnimi encimi, bolj intenzivno se barvilo cepi).

Oznake, ki smo jih uporabili v nadaljevanju:

ccelice

sub(številka) ...raztopina substrata v PBS z določeno koncentracijo (μM)

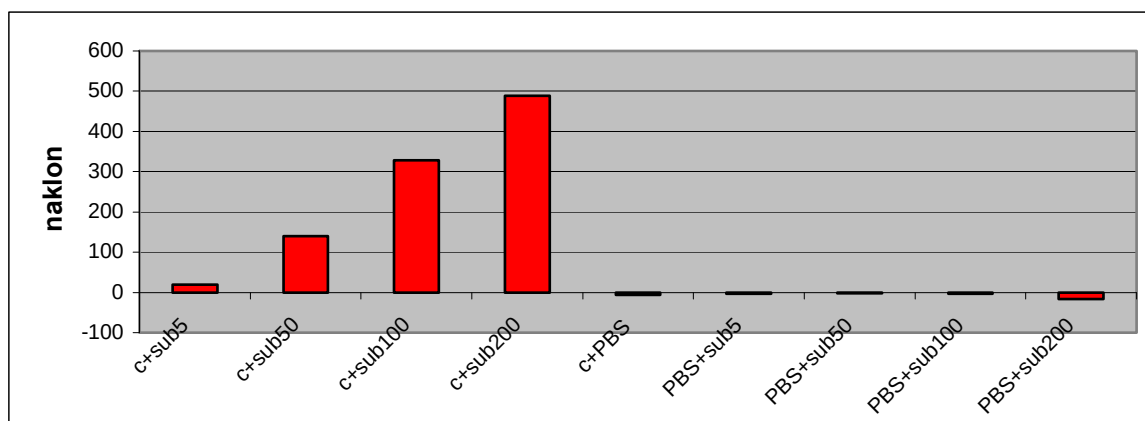
Na sliki 20 vidimo, da fluorescenca narašča s časom, in sicer hitreje pri celicah, ki smo jim dodali višjo koncentracijo substrata. Za kontrolo tem celicam smo uporabili celice, ki smo jim dodali le PBS. Pri teh pa, podobno kot pri celicah, ki smo jim dodali najnižjo koncentracijo substrata, intenziteta fluorescence s časom ne raste.



Slika 20: Graf spreminjanja intenzitete fluorescence po dodatku različnih koncentracij substrata celicam

Slika 21 je grafični prikaz naklonov spreminjanja intenzitete fluorescence v 10-minutnem intervalu med deseto in dvajseto minuto. Najprej smo iz rezultatov, ki so prikazani na sliki 20, izračunali relativne standardne deviacije intenzitet fluorescence za posamezne vzorce, saj smo meritve izvedli v štirih ponovitvah. S tem smo želeli ugotoviti, v katerem časovnem intervalu so odstopanja od povprečja najmanjša. Za celice z dodatkom substrata v koncentracijah 100 in 200 μM je relativna standardna deviacija ves čas približno 10 odstotkov ali manj, medtem ko je pri nižjih koncentracijah tudi do 50 odstotkov. Za izračun naklona smo tako uporabili časovni interval med deseto in dvajseto minuto, saj se nahaja v območju najnižjih relativnih standardnih deviacij in je za vse

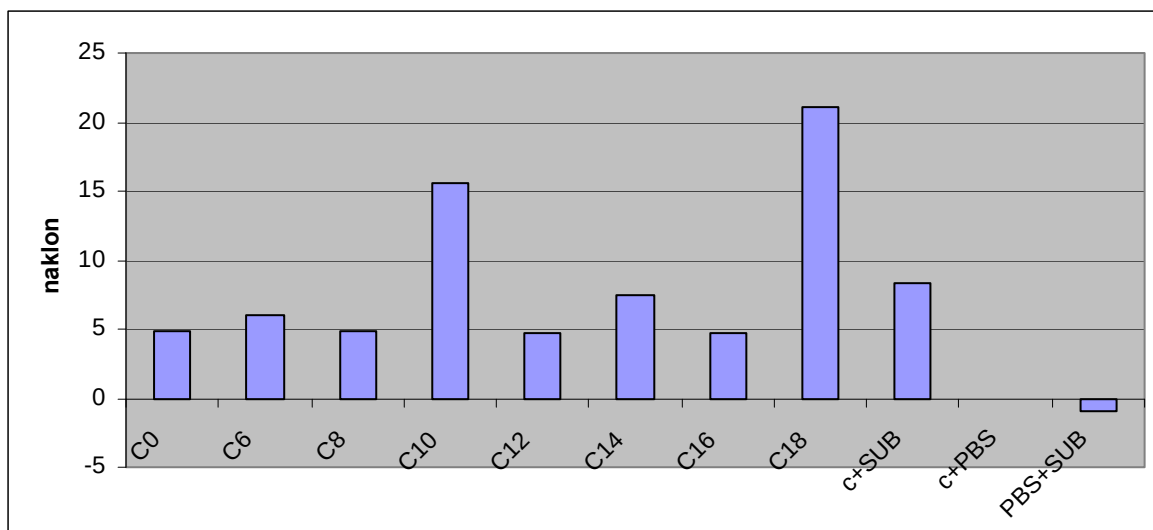
vzorke 20 odstotkov ali manj. Na grafu vidimo, da je naraščanje naklona sorazmerno z naraščanjem koncentracije substrata. V luknjicah, kjer ni bilo celic, so nam za kontrolo služile raztopine PBS in različnih koncentracij substrata. Pri vseh vidimo, da ni prišlo do povečanja intenzitete fluorescence. Iz tega lahko sklepamo, da sam substrat ne razpada in da ne prihaja do interakcij med substratom in medijem, ki bi značilno vplivale na izmerjeno intenziteto fluorescence.



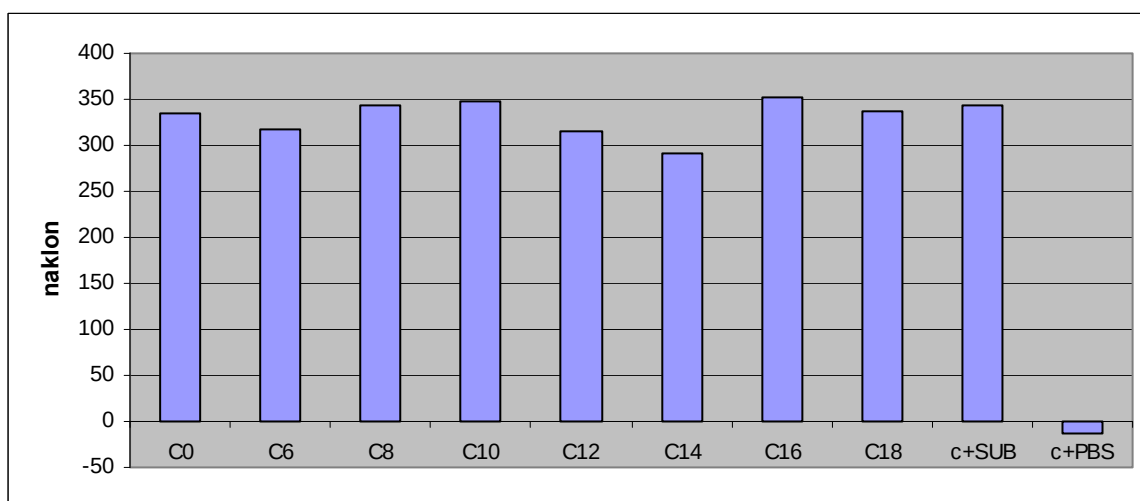
Slika 21: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 10. in 20. minuto po dodatku različnih koncentracij substrata celicam in kontrole brez celic

Tudi v nadaljevanju smo izbirali časovne intervale za prikaz rezultatov na podlagi izračunanih relativnih standardnih deviacij štirih ponovitev za posamezne časovne odseke na grafu spreminjanja intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa. Kinetična meritev je vedno potekala 45 minut, vendar pa smo glede na prejšnje raziskave (7) za obdelavo podatkov izbrali območje, v katerem naj bi cistatin še aktivno deloval (do dvajsete minute). Ugotovili so namreč, da se po približno tridesetih minutah njegova inhibitorna aktivnost popolnoma izgubi, zato nastaja spet več obarvanega produkta. To je najverjetneje posledica dejstva, da se cistatin v tem času razgradi in nima več učinka na katepsin B.

Sliki 22 in 23 sta grafični prikaz naklonov spreminjanja intenzitet fluorescence po dodatku raztopin acilirane cistatina celicam. V prvem primeru smo dodali 5 μM , v drugem pa 100 μM raztopino substrata. Zaradi večje količine nastalega produkta, se je v drugem primeru povečal tudi naklon.



Slika 22: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin cistatina (nemodificiranega C0 in aciliranega C6–C18) celicam in kontrole; 0,2 μM raztopina cistatina; **5 μM raztopina substrata**



Slika 23: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin cistatina (nemodificiranega C0 in aciliranega C6–C18) celicam in kontrole; 0,2 μM raztopina cistatina; **100 μM raztopina substrata**

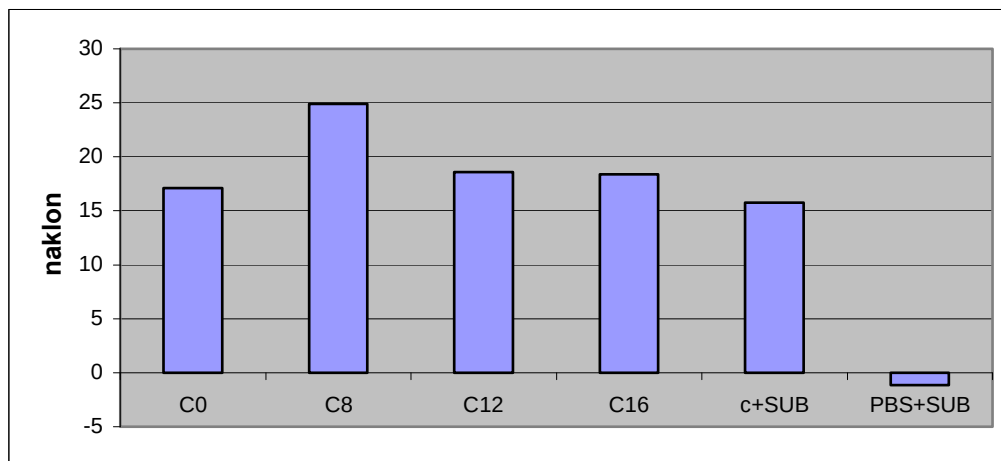
Stolpec c+SUB na sliki 22 predstavlja osnovno kontrolo. Tem celicam smo dodali le substrat, kar pomeni, da bi moral biti naklon največji, saj lahko katepsin B neovirano cepi substrat in obarvani produkt nastaja najhitreje. Če predpostavimo, da nemodificirani cistatin ne prehaja v celice, bi moral biti stolpec C0 enak c+SUB, česar pa s temi rezultati nismo potrdili. Pri aciliranih oblikah cistatina C6, C8, C12 in C16 je prišlo do značilnega

znižanja naklona glede na c+SUB, medtem ko znižanje naklona za C14 ni bilo značilno. Pri C10 in C18 je prišlo do zelo velikih odstopanj v intenzivnosti fluorescence med celotno meritvijo, zato ti rezultati niso primerljivi z ostalimi. Domnevamo, da so bila ta odstopanja posledica prisotnosti zračnih mehurčkov v celici.

V drugem poskusu (slika 23), ko smo celicam na koncu dodali 100 μM raztopino substrata, pa razlike med posameznimi stolpci niso bile značilne. Do največjega padca v naklonu je prišlo ob dodatku C14, vendar pa to znižanje ni značilno glede na C0 ali c+SUB.

Na podlagi teh rezultatov bi lahko zaključili, da tudi sam cistatin v manjši meri prehaja v celice, med aciliranimi oblikami pa ni večje razlike, čeprav bi pričakovali, da cistatin, aciliran z najdaljšo maščobno verigo, najlažje premaga oviro, kot je lipofilna membrana celice. S pomočjo mikroskopskega spremljanja dogajanja v celicah so že v predhodnih raziskavah dokazali, da acilirani cistatin pride v celico ter ohrani biološko aktivnost (7).

Glede na to, da s prikazanimi rezultati nismo uspeli potrditi razlik med različno aciliranimi cistatini, smo v nadaljevanju uporabili le tri različno acilirane cistatine. Poleg tega smo spremenili koncentracijo cistatina in jo povečali 5-krat, tako da smo dobili 1 μM raztopino. Rezultate tega poskusa prikazuje slika 24.



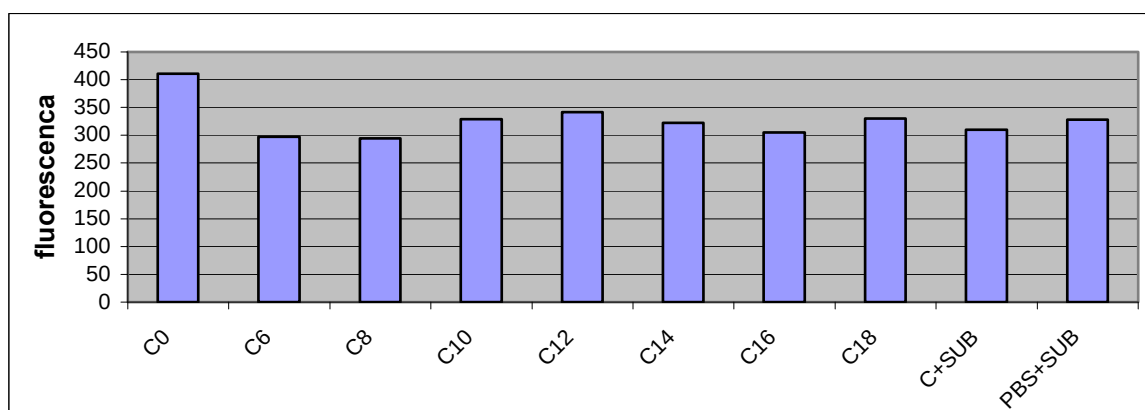
Slika 24: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 10. in 20. minuto po dodatku raztopin cistatina (nemodificiranega C0 in aciliranega C8, C12 in C16) celicam in kontrole; **1 μM raztopina cistatina; 5 μM raztopina substrata**

Kontrola, kjer smo celicam dodali le substrat (c+SUB), se je tokrat ujemala s celicami, ki smo jim predhodno dodali nemodificirani cistatin. V tem primeru lahko torej

trdimo, da cistatin sam ne prehaja v celice in zato ne more inhibirati katepsina B. Nenavadno pa je dejstvo, da so v tem primeru vsi ostali nakloni večji kot naklon kontrole, kar pomeni, da je nastalo več produkta, čeprav naj bi acilirani cistatin prehajal v celice in katepsinu B preprečil cepitev substrata.

To nas je napeljalo na domnevo, da s spektrofotometrom ne moremo učinkovito spremljati spreminjanja intenzitete fluorescence, kar bi lahko bila posledica tega, da ves produkt ostaja v celici. Zato smo celicam po inkubaciji s cistatinom in dodatku substrata dodali NaOH, da bi razbili celično membrano ter omogočili sprostitvev znotrajceličnih elementov v okoliško raztopino. Namesto s kinetično meritvijo smo tokrat izmerili fluorescenco le na koncu, po dodatku NaOH.

Na sliki 25 vidimo, da je stolpec C0 najvišji, kar je v skladu s pričakovanji. Vsi ostali stolpci, ki predstavljajo acilirane oblike cistatina so nižji. S tem lahko potrdimo, da sam cistatin ni uspel priti v celico in je zato katepsin B neovirano cepil substrat v produkt, medtem ko so acilirani cistatini to preprečili in je nastalo manj produkta. Med različno aciliranimi cistatini ni opaziti značilnih razlik. Zadnja dva stolpca na sliki 25 (c+SUB in PBS+SUB) pa odstopata od pričakovanj. c+SUB bi moral biti enako visok kot C0, saj v obeh primerih ne pričakujemo inhibicije katepsina B. Tudi kontrola brez celic kaže nenavadno visok odziv. Vzrok bi lahko bil tudi posledica različnega pričetka tretiranja celic. Celice, ki smo jim dodali samo substrat, so bile namreč tretirane le 15 minut, medtem ko smo vsem ostalim predhodno dodali raztopino cistatina za 20 minut. V nadaljevanju smo zato celoten postopek nekoliko spremenili, in sicer tako, da smo vse celice pričeli tretirati istočasno.



Slika 25: Intenziteta fluorescence celic, izmerjena kot končna meritev po dodatku NaOH. Celice so bile 20 minut izpostavljene raztopinam cistatina (0,2 μ M), nato pa še 15 minut raztopini substrata (5 μ M).

Pri naslednjem poskusu z izvlečki korenin spomladanskega jegliča smo spremljali tudi spremembe fluorescence v kontrolnih luknjicah brez celic, s katerimi smo ugotavljali morebitne medsebojne interakcije med saponini, cistatinom in substratom. V polovici teh luknjic so bile različne razredčitve raztopin saponinov, cistatina in PBS, v drugi polovici pa namesto PBS raztopina substrata. Pri vseh kontrolah je prišlo do minimalnih sprememb.

Glede na predhodne ugotovitve smo v nadaljevanju uporabili raztopino substrata z najnižjo koncentracijo (5 μM), saj višje koncentracije niso dale boljših rezultatov. Prav tako smo uporabili raztopino cistatina z nižjo koncentracijo (0,2 μM).

Oznake, ki smo jih uporabili v nadaljevanju:

SAP(1, 2, 5 ali 10) ...raztopina glicirizinskega standarda z določeno koncentracijo ($\mu\text{g/mL}$)

SAP(100x ali 50x) ...raztopina saponinskega izvlečka, razredčena 100- ali 50-krat s PBS

SUB5 μM raztopina substrata v PBS

C00,2 μM raztopina nemodificiranega cistatina v PBS (če ni navedeno drugače)

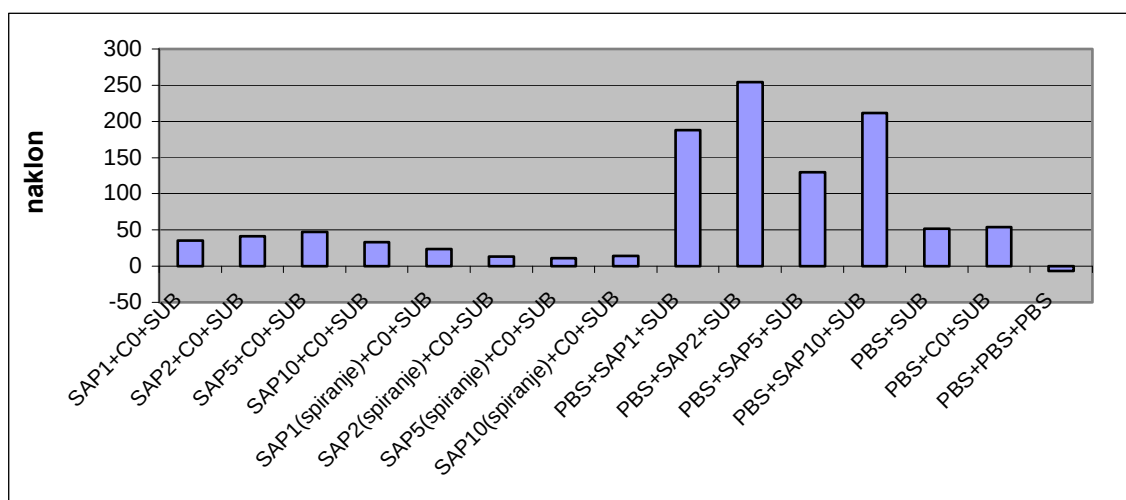
C16 raztopina palmitoiliranega cistatina v PBS

Najprej smo izvedli poskuse z znanimi koncentracijami glicirizinskega standarda v vodi ali PBS in še dodatno poskušali optimizirati metodo.

Kot prikazuje slika 26, se kontrolna stolpca PBS+SUB in PBS+C0+SUB ujemata, kar pomeni, da cistatin sam ne prehaja v celico in zato ni inhibicije katepsina B. Ko smo celicam najprej za 15 minut dodali raztopine glicirizinskega standarda in nato brez spiranja (brez odstranitve saponinov) še raztopine cistatina, se je naklon zmanjšal. Še večji padec naklona smo opazili pri poskusih, kjer smo po 15 minutah celicam odstranili raztopine saponinov in jim nato dodali raztopine cistatina. Iz tega lahko sklepamo, da so saponini, ki so bili v raztopini skupaj s cistatinom, sicer povzročili nastanek por in cistatinu omogočili prehod, vendar pa so ta prehod tudi nekoliko ovirali. Morda je prišlo do interakcij med saponini in cistatinom. Pri poskusu, kjer smo saponine po 15 minutah odstranili, pa je prišlo do značilnega znižanja naklona glede na kontrole, medtem ko znižanje naklona pri celicah, ki jim saponinov nismo odstranili, ni bilo značilno. Med stolpci, ki predstavljajo različno koncentrirane raztopine saponinov, ni signifikantne razlike. Na podlagi teh

razultatov lahko zaključimo, da so saponini uspešno pomagali cistatinu pri prehodu v celice.

Večje presenečenje pa predstavljajo kontrole, kjer smo celicam dodali le PBS in nato raztopine glicirizinskega standarda. Pri teh je namreč prišlo tudi do 5-kratnega povečanja naklona, kar pomeni, da je nastalo veliko več fluorescenčnega produkta. Ti rezultati kažejo na to, da naj bi saponini tudi substratu omogočili lažje prehajanje v celice, čeprav je znano, da sam substrat brez ovir prehaja skozi celično membrano.

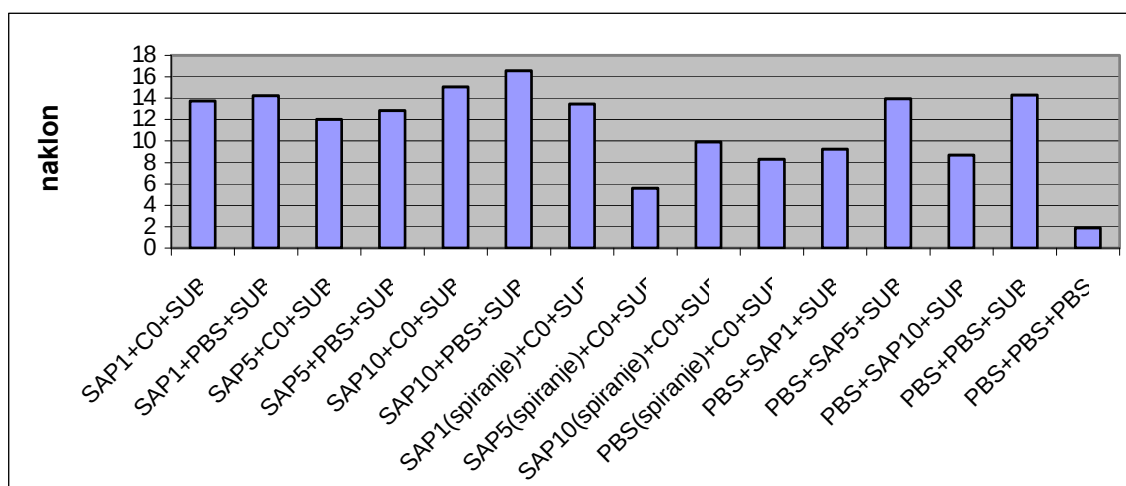


Slika 26: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin glicirizinskega standarda v vodi (v različnih koncentracijah) celicam

Čeprav so bili rezultati tega poskusa najbolj obetavni, pa žal ostajata dve težavi. Prva je ta, da nimamo podatkov o citotoksičnosti uporabljenih raztopin glicirizinskega standarda v vodi. Druga pa je ta, da smo uporabili raztopine glicirizinskega standarda v vodi in ne PBS kot običajno. Voda je v določenih primerih toksična za celice, saj nima ustreznega pH niti ni izotonična. V času, ko so bile celice izpostavljene vodi, je lahko prišlo do pokanja celične membrane in večje znotrajcelične strukture so se morda izločile iz celic. Lizosomi, v katerih se nahaja katepsin B, so tako lažje prišli v stik s cistatinom in inhibirali encim. V tem primeru bi bili torej vsi ugodni rezultati posledica vpliva vode na celično membrano, zato ne moremo z zagotovostjo trditi, da so saponini tisti, ki so povzročili formacijo por v celični membrani in olajšali prehod cistatinu.

Zaradi možnega vpliva vode smo naredili podoben poskus, vendar smo tokrat glicirizinski standard raztopili v PBS. Rezultati so bili tokrat povsem drugačni (slika 27).

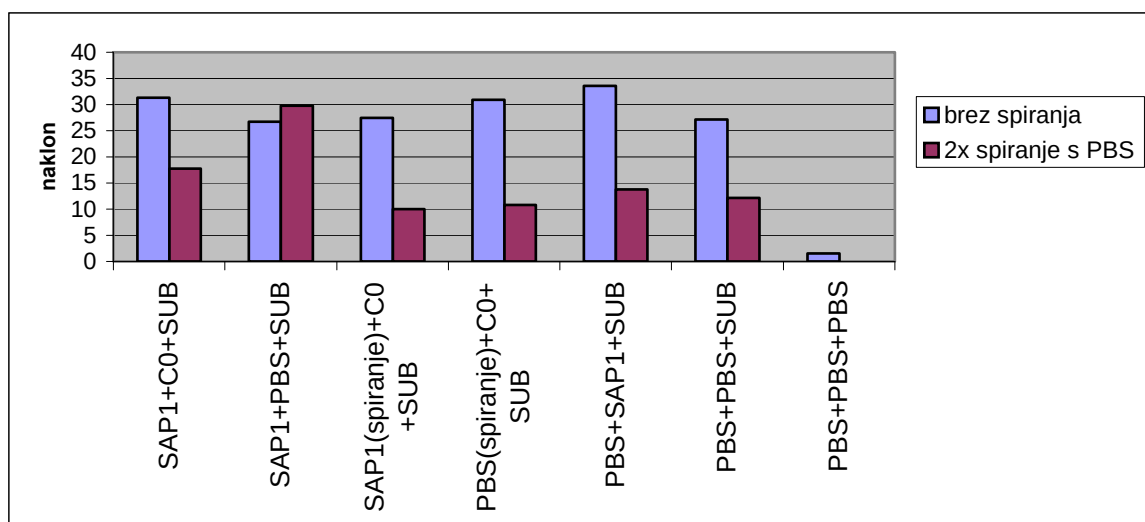
Stolpci, ki predstavljajo celice, ki smo jim dodali PBS, saponine in substrat so tokrat veliko nižji kot na sliki 26. Iz tega lahko sklepamo, da je bila res voda tisti odločilni dejavnik, ki je vplivala na tako visok naklon. Na grafu opazimo manjše naklone pri celicah, kjer smo saponine po 15 minutah sprali in šele nato dodali raztopino cistatina. Še vedno torej ostaja domneva, da saponin glicirizin res intereagira s cistatinom in mu oteži prehod v celico. Vsi stolpci, ki predstavljajo celice z dodatkom saponinov in cistatina, so nekoliko nižji (vendar ne značilno) kot stolpci, ki predstavljajo celice z dodatkom saponinov in PBS. Ob primerjavi kontrolnih stolpcev, kjer smo enim celicam dodali PBS (in ga po 15 minutah sprali), cistatin in substrat, drugim pa le PBS in substrat, vidimo, da je prisotnost cistatina močno znižala naklon, kar bi lahko pomenilo, da tudi sam cistatin prehaja v celice in inhibira katepsin B.



Slika 27: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin glicirizinskega standarda v PBS (v različnih koncentracijah) celicam

Poskus smo ponovili in uporabili le najnižjo koncentracijo glicirizinskega standarda (slika 28). Modri stolpci predstavljajo rezultate enakega poskusa kot na sliki 27, vendar pa posamezne vrednosti iz obeh poskusov med seboj niso neposredno primerljive zaradi različnosti celic. Primerljiva so lahko le razmerja med posameznimi stolpci, ki pa niso enaka. Pri poskusu smo zaradi možnega vpliva preostanka raztopin v luknjicah, ki jih pred dodatkom substrata z multikanalno pipeto ne uspemo odstraniti, izvedli dvakratno spiranje celic pred dodatkom substrata. Pri vseh, razen pri drugem stolpcu, je prišlo do značilnega znižanja naklona. Sklepamo lahko torej, da smo s spiranjem dejansko odstranili ali pa vsaj zmanjšali prisotnost predhodnih dodatkov. Zato so morda saponini res olajšali tudi prehod

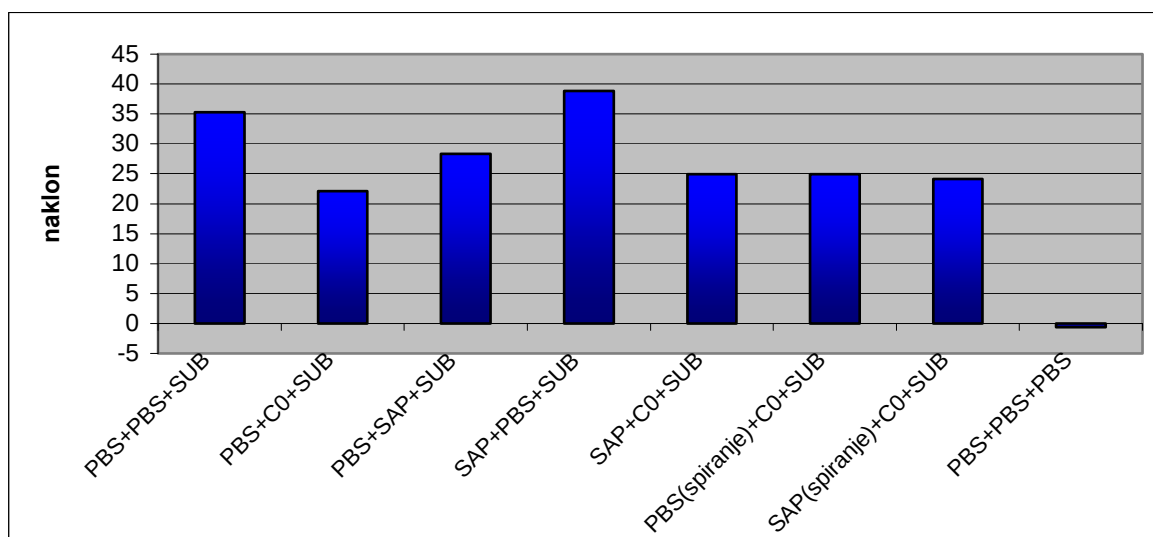
substrata in ko smo s spiranjem odstranili minimalne ostanke, je prišlo manj substrata v celice, zato se je naklon močno znižal. Obstaja pa še druga razlaga. Če je bila koncentracija glicirizina prevelika, je lahko le-ta povzročil nastanek večjih por v membrani in izločitev lizosomov s katepsinom B v zunanjo raztopino. Pri poskusu brez spiranja je tako substrat hitro prišel v stik s katepsinom B in se razcepil, medtem ko smo s spiranjem odstranili večino raztopine zunaj celic, zato je bilo manj katepsina B na razpolago za proteolizo substrata, kar lahko vidimo kot manjši naklon na sliki 28.



Slika 28: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku raztopin glicirizinskega standarda v PBS (s koncentracijo 1 $\mu\text{g/mL}$) celicam; primerjava med običajnim postopkom (modro) in postopkom, pri katerem pred dodatkom substrata celice 2-krat speramo s PBS (vijolično)

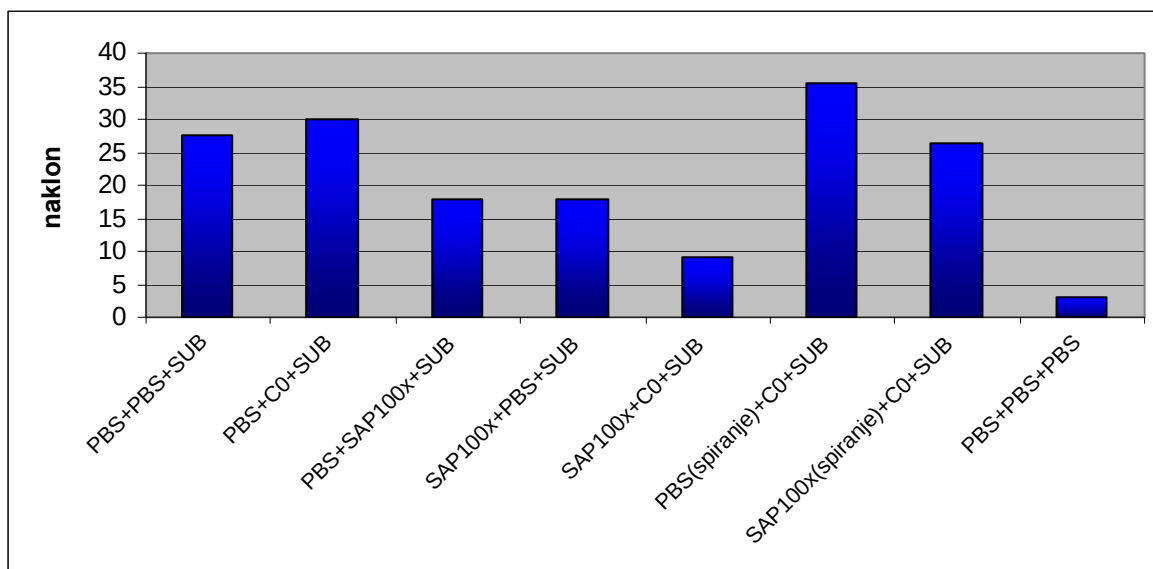
Sledil je sklop poskusov, kjer smo uporabili različne izvlečke iz saponinskih drog, razredčene s PBS. Slika 29 prikazuje naklone za poskus, pri katerem smo uporabili 100-krat razredčen izvleček korenine sladkega korena. Glede na rezultate kapilarne elektroforeze je bila koncentracija glicirizina v tem poskusu približno 3 $\mu\text{g/mL}$ in ni citotoksična. Iz rezultatov ne moremo ugotoviti, ali imajo saponini sladkega korena vpliv na prehod cistatina. Najvišji stolpec (SAP+PBS+SUB) predstavlja celice, ki smo jim dodali saponine, PBS in substrat, kar bi lahko pomenilo, da imajo saponini vpliv na prehod substrata. Vendar pa smo pri spremenjenem zaporedju istih dodatkov dobili manjši naklon (PBS+SAP+SUB). Opazimo lahko, da se ob dodatku saponinov, cistatina in substrata (SAP+C0+SUB) naklon celo nekoliko poveča glede na kontrolo brez saponina, vendar pa te razlike niso značilne. Stolpca, ki predstavljata celice s spiranjem, se med seboj ne razlikujeta, zato lahko rečemo, da saponini v tem primeru niso imeli vpliva na prehod

cistatina. Opazimo pa, da so vsi stolpci, kjer je bil dodan cistatin, nižji od ostalih. To bi lahko pomenilo, da je cistatin uspel priti v celico ne glede na prisotnost saponinov.



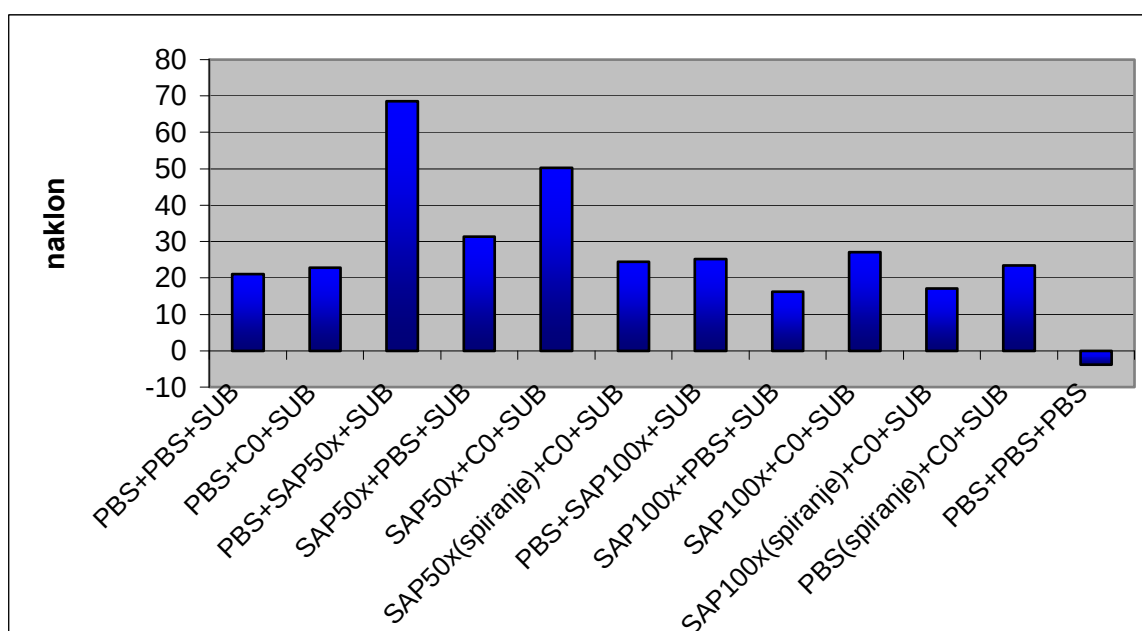
Slika 29: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku **izvlečka sladkega korena**, razredčenega 100-krat

V naslednjem poskusu smo uporabili 100-krat razredčen izvleček navadne milnice. Na grafu 30 vidimo, da so vsi stolpci, kjer smo dodali saponine in jih nismo spirali, nižji od ostalih. Prva dva stolpca predstavljata kontroli, ki naj bi bili enako visoki, če sam cistatin ne prehaja v celice. Ko smo celicam najprej dodali saponine in nato cistatin, smo opazili zmanjšanje naklona za več kot polovico glede na ustrezno kontrolo (PBS+C0+SUB). Vendar pa je nenavadno, da se je naklon prav tako zmanjšal, če ni bilo prisotnega cistatina. Poleg tega se je naklon zmanjšal tudi pri dodatku saponinov, ki smo jih sprali, v primerjavi z ustrezno kontrolo, kjer smo po 15 minutah sprali PBS in nato tem celicam dodali cistatin in na koncu še substrat. Kljub temu da se kontrole povsem ne ujemajo, bi lahko zaključili, da so saponini navadne milnice olajšali prehod cistatina v celico. Najboljše rezultate smo dobili takrat, ko saponinov nismo sprali, medtem ko je spiranje saponinov imelo manjši vpliv na prehod cistatina.



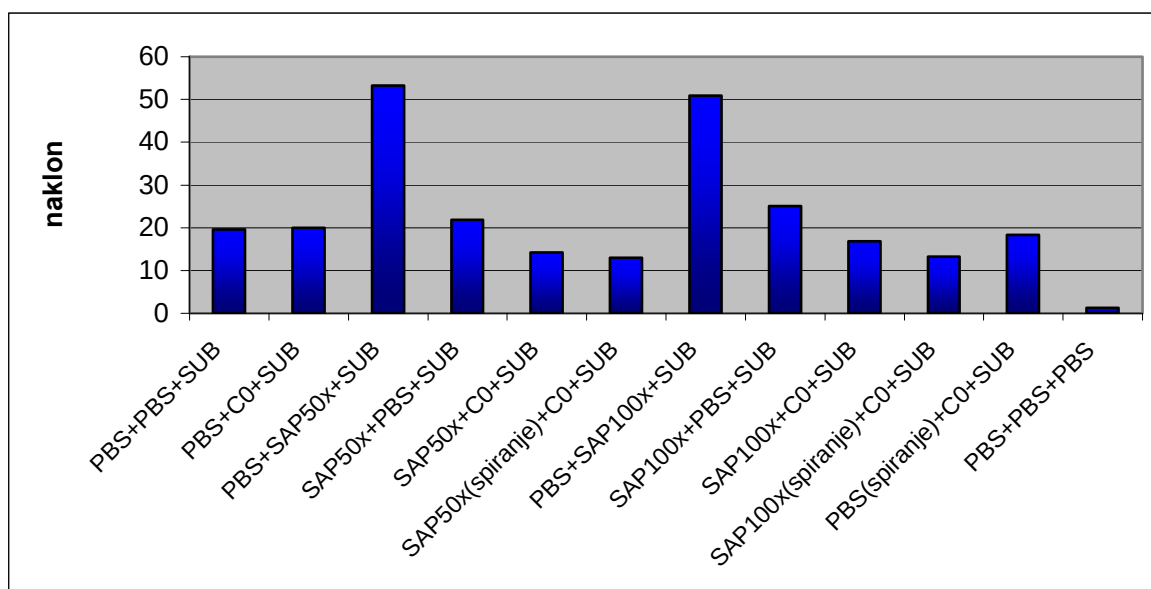
Slika 30: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku **izvlečka navadne milnice**, razredčenega 100-krat

Slika 31 prikazuje rezultate za izvlečke ginsenga. Med večino stolpcev, razen med tretjim in petim, ni značilne razlike, zato na podlagi tega poskusa ne moremo trditi, da saponini iz ginsenga izboljšajo prehod cistatina v celice.



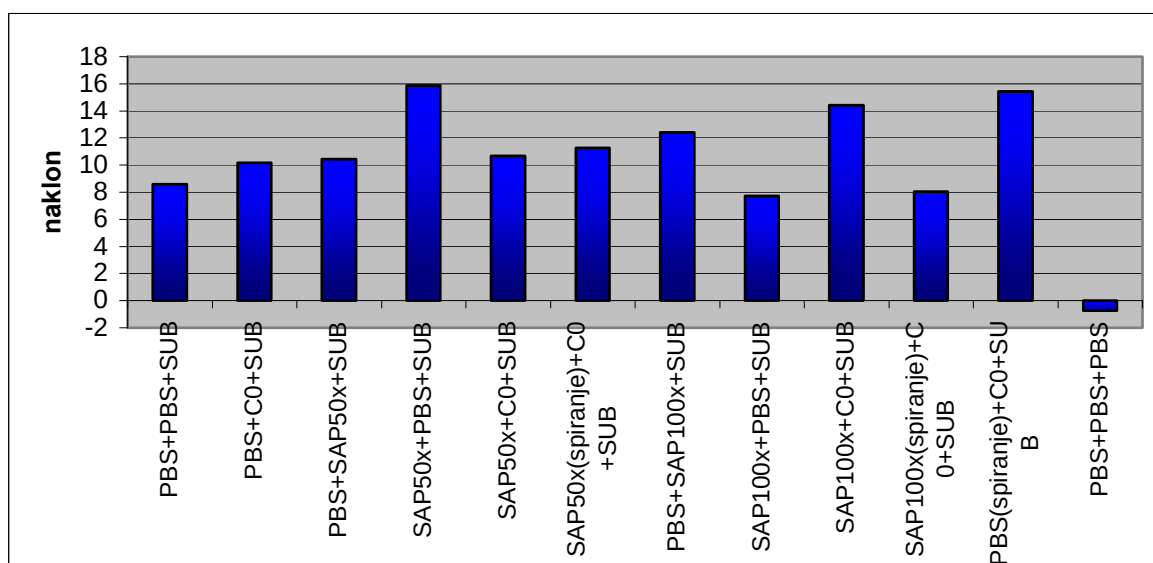
Slika 31: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku **izvlečka ginsenga**, razredčenega 50-krat in 100-krat

Slika 32 prikazuje rezultate za izvlečke navadnega bršljana. Kontrole, pri katerih smo dodali najprej PBS (ga sprali ali ne), potem pa cistatin (ali pa samo PBS), se ujemajo in imajo naklon velik približno 20 enot. Najvišja stolpca predstavljata celice, ki smo jim najprej dodali PBS, nato pa razredčeno raztopino saponina ter pred dodatkom substrata vse odstranili. Ko pa smo najprej dodali raztopini saponinov in šele nato PBS, je prišlo do padca naklona, zato se torej približno ujemata z ostalimi kontrolami. Saponini navadnega bršljana torej ne vplivajo na prehod substrata oziroma ga le minimalno izboljšajo. Sklepali smo, da lahko med sabo primerjamo le rezultate, pri katerih so bili saponini ves čas prisotni ali sprani. Višja stolpca (PBS+SAP50x+SUB in PBS+SAP100x+SUB) nista primerljiva z ostalimi, ker so bili saponini pri teh celicah prisotni le 15 minut pred dodatkom substrata. Manj produkta je nastalo v celicah, ki smo jim najprej dodali saponine in nato cistatin. Še večji učinek je imelo spiranje, s katerim smo še dodatno zmanjšali nastajanje produkta. Med obema razredčitvama saponinskega izvlečka ni bilo značilne razlike, čeprav so stolpci pri manjši razredčitvi (50-kratni) nižji od stolpcev pri večji razredčitvi (100-kratni). Ti rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je v raztopini, ki je manj razredčena, višja koncentracija saponinov in zato je vpliv na prehod cistatina večji. Na podlagi slike 32 lahko torej sklepamo, da saponini navadnega bršljana olajšajo prehod cistatina skozi celično membrano. Pri tem moramo poudariti, da za izvleček navadnega bršljana nismo imeli rezultatov citotoksičnosti in zato ne moremo dokončno potrditi hipoteze o izboljšanju prehoda cistatina v celice.



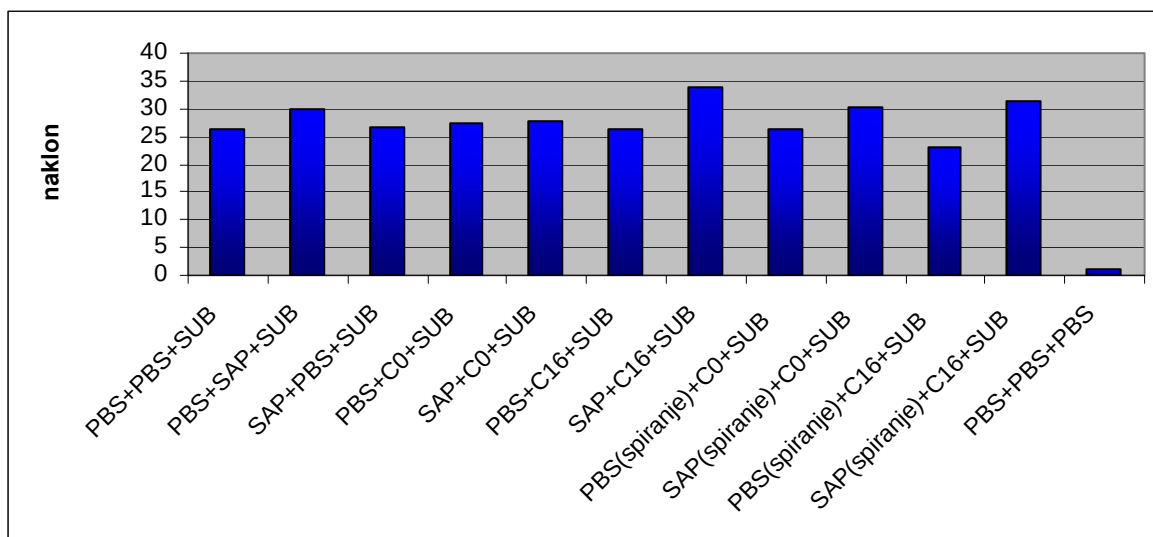
Slika 32: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku **izvlečka navadnega bršljana**, razredčenega 50-krat in 100-krat

Slika 33 prikazuje rezultate za izvlečke bodeče lobodike. Iz rezultatov ne moremo sklepati, da saponini iz bodeče lobodike olajšajo prehod cistatina v celico. Najnižji je stolpec, ki predstavlja celice po dodatku saponinov, ki smo jim sprali in nato dodali cistatin ter na koncu še substrat. V primerjavi z ustrežno kontrolo, kjer namesto saponinov dodamo PBS in ga speremo, se je naklon sicer zmanjšal na polovico, vendar pa samo iz tega podatka ne moremo potrditi hipoteze, saj se kontrola s spiranjem ne ujema z ostalimi kontrolami.



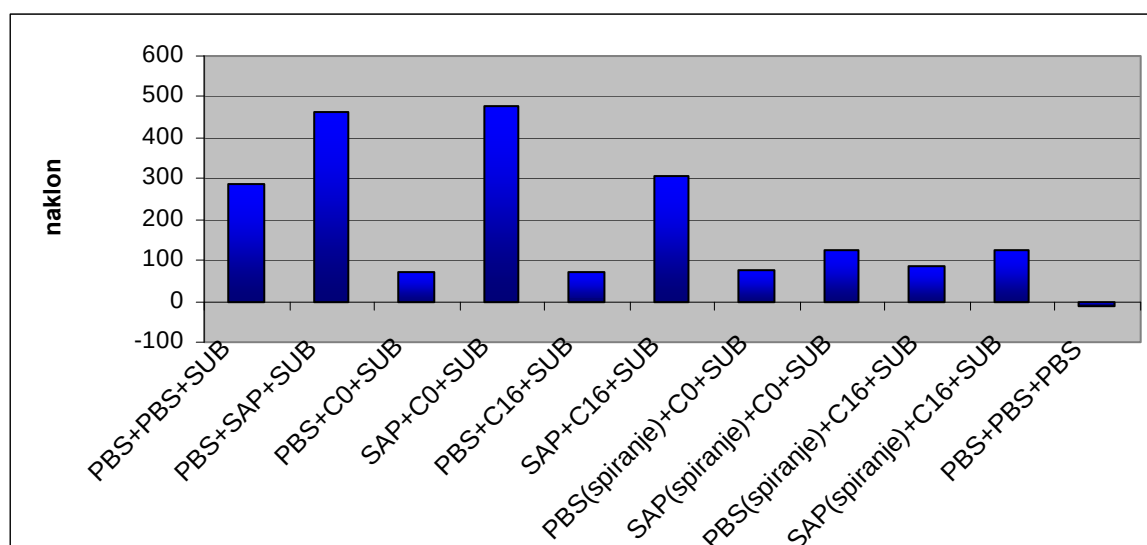
Slika 33: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku **izvlečka bodeče lobodike**, razredčenega 50-krat in 100-krat

Na sliki 34 je prikazan poskus, v katerem smo primerjali učinkovitosti nemodificiranega in palmitoiliranega cistatina pri inhibiciji Katepsina B. Kot vidimo, med različnimi nakloni ni značilne razlike, zato iz teh rezultatov ne moremo dobiti ustreznih zaključkov.



Slika 34: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku **izvlečka sladkega korena**, razredčenega 100-krat; primerjava med učinkom **neacilirane**ga cistatina (C0) in **palmitoiliranega** cistatina (C16) (1 μ M raztopini)

Za konec smo poskusili še z dodatkom vode pred dodatkom substrata. S tem smo želeli lizirati celice in sprostiti znotrajcelično vsebino ter tako olajšati merjenje fluorescence. Dobili smo nenavadne rezultate. Vsi stolpci, ki predstavljajo celice z dodatkom raztopine saponinov, so višji od ustreznih kontrol brez saponinov. S tem poskusom prav tako ne moremo potrditi domneve, da palmitoilirani cistatin bolje prehaja v celice, saj med stolpcema PBS+C0+SUB in PBS+C16+SUB ni značilne razlike. Razlika se je pojavila le, ko smo namesto PBS dodali saponine. V tem primeru je palmitoilirani cistatin značilno znižal naklon glede na nemodificirani cistatin, vendar pa med stolpcema ni razlike v primeru, ko smo saponine po 15 minutah odstranili. Glede na te rezultate bi lahko rekli, da že sam cistatin prehaja v celice. Trditev lahko potrdimo s primerjavo prvega stolpca, ki predstavlja osnovno kontrolo, in stolpci, ki predstavljajo celice z dodatkom PBS in cistatina ali pa acilirane cistatina. Med tema oblikama cistatina ni opaziti razlike v inhibiciji katepsina B, je pa očitno opazno znižanje naklona, kar pomeni, da je cistatin v celici uspešno inhibiral encim. Pri dodatku saponinske raztopine pa so saponini navadne milnice morda ovirali prehod cistatina v celico in po odstranitvi raztopin je substrat prišel v celico in katepsin B ga je neovirano cepil do produkta. Pomislili pa smo tudi na to, da bi lahko saponini ovirali prehod cistatina, a olajšali prehod substratu, zaradi česar smo dobili nenavadno visoke odzive ob dodatku saponinov celicam.



Slika 35: Naklon spreminjanja intenzitete fluorescence med 5. in 15. minuto po dodatku **izvlečka navadne milnice**, razredčenega 100-krat; primerjava med učinkom **nemodificiranega cistatina** in **palmitoiliranega cistatina** (1 μ M raztopini); na koncu spiranje in **dodatek** 100 μ L **vode** za 5 minut ter dodatek substrata v vodo

5. ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo poskusili razviti fluorimetrično metodo za spremljanje vpliva saponinov na prehod cistatina v celico. Najprej smo izbrali sedem različnih saponinskih drog in pripravili izvlečke s tremi različnimi topili. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo potrdili prisotnost saponinov v drogah in za nadaljnje poskuse na celicah izbrali vodne izvlečke. V izvlečku sladkega korena smo s kapilarno elektroforezo še dodatno potrdili prisotnost glicirizina in izračunali njegovo koncentracijo.

Pripravili smo različne razredčitve izvlečkov in izvedli kolorimetrični preizkus MTS na celicah MCF-10A neo T, s pomočjo katerega smo določili v katerih razredčitvah so izvlečki toksični za celice. Izvlečke v netoksičnih razredčitvah smo uporabili za nadaljnje poskuse.

Pri poskusih na celicah smo uporabili sistem inhibitor-encim-substrat. Kot modelni protein nam je služil kokošji cistatin, ki je inhibitor lizosomskega encima katepsina B. Sam cistatin težko prehaja v celice, zato smo mu prehod želeli olajšati z dodatkom saponinov, ki povzročijo nastanek por v celični membrani. Če je cistatin uspešno prešel v celico, je inhibiral katepsin B in nastajalo je manj fluorescenčnega produkta. Fluorescenco smo merili v časovnem obdobju 45 minut in nato primerjali naklone med posameznimi celicami. Manj kot je nastalo produkta, nižji je bil naklon, kar je pomenilo, da je cistatin uspešno inhibiral katepsin B.

V prvem delu smo poskusili metodo optimizirati s spreminjanjem različnih dejavnikov. Rezultati so bili primerljivi med seboj le takrat, ko smo celice pričeli tretirati istočasno. Pri optimizaciji metode smo ugotovili, da različno acilirani cistatini ne dajejo značilno različnih naklonov. Glede na predhodne raziskave smo namreč pričakovali, da bo cistatin, aciliran z najdaljšo maščobno verigo, najlažje prehajal v celice in inhibiral katepsin B. Na podlagi teh rezultatov smo zato zaključili, da metoda najverjetneje ni dovolj občutljiva za spremljanje majhnih sprememb v celicah.

V drugem delu pa smo ugotavljali, ali saponini vplivajo na prehod cistatina skozi celično membrano. Znano je namreč, da se povežejo s holesterolom v celični membrani in tvorijo pore, skozi katere bi lahko cistatin neovirano prišel v notranjost celice. Najboljše rezultate smo dobili pri uporabi glicirizinskega standarda v vodi. Zaključili smo, da so saponini verjetno olajšali prehod cistatina, vendar pa moramo poudariti, da smo poskuse

izvajali z vodnimi raztopinami, pri čemer je voda že sama najverjetneje povzročila nastanek por v membrani. Tako je cistatin sicer prišel v stik s katepsinom B, ne moremo pa trditi, da so mu pri tem pomagali le saponini.

Med saponinskim izvlečki sta se najbolje izkazala izvlečka listov navadnega bršljana in korenine navadne milnice. Glede na rezultate lahko domnevamo, da so saponini iz teh dveh drog cistatinu omogočili prehod v celico, saj je bilo zmanjšanje naklona glede na kontrole brez saponinov značilno. Žal pa nismo imeli informacij o citotoksičnosti različnih razredčitev izvlečkov bršljana in zato ne moremo z zagotovostjo potrditi ugodnih rezultatov pri poskusih s to saponinsko drogo.

Pri našem delu nismo uspeli razviti metode, ki bi bila dovolj občutljiva in ponovljiva za spremljanje majhnih sprememb v celicah. V predhodnih raziskavah so raziskovalci potrdili, da saponini olajšajo prehod večjih molekul v celice, zato domnevamo, da so imeli takšen učinek na cistatin tudi naši izvlečki. Morda so imeli izvlečki nekaterih drog na prehod le minimalen vpliv, ki pa ga z našo metodo nismo uspeli zaznati.

Še vedno torej ostaja ideja o uporabi saponinov kot enem izmed možnih pristopov za povečanje biološke uporabnosti proteinov. Razviti bo potrebno občutljivejše in ponovljive metode za spremljanje vpliva saponinov na prehod proteinov v celice in morda se bo lahko v prihodnosti takšen pristop izboljšanja biološke uporabnosti proteinov uporabil tudi v terapiji.

6. LITERATURA

- 1) Šegula, M., Vrečer, F. Nove farmacevtske oblike za peroralno dostavo peptidov in proteinov (Novel dosage forms for oral delivery of peptides and proteins). Farm Vestn, 2003, let. 54, str. 25-35.
- 2) Gantar, M., Štrukelj, B. Mehanizmi delovanja in oblikovanje biotehnoških produktov (Mechanisms of action and formulation of biotech products). Farm Vestn, 2000, let. 51, str. 491-498.
- 3) Planinšek, O., Srčič, S. Kritične fizikalno-kemijske lastnosti peptidov in proteinov za načrtovanje farmacevtskih oblik (Critical physicochemical properties of peptides and proteins for drugs formulation). Farmacevtska tehnologija na prelomu tisočletja, 10. posvetovanje, str. 33-44.
- 4) Štrukelj, B., Kos, J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1.izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007, str. 4-24, 149-150.
- 5) Cegnar, M., Kristl, J., Kos, J. Oblikovanje nanodelcev s proteini (Designing of protein-loaded nanoparticles). Farm Vestn, 2003, let. 54, str. 37-46.
- 6) Kočever, N., Obermajer, N., Štrukelj, B., Kos, J., Kreft, S. Improved acylation method enables delivery of functional palmitoylated cystatin into epithelial cells. Chemical Biology & Drug Design, 2007, let. 69, št. 2, str. 124-131.
- 7) Petelinšek, B. Vpliv dolžine maščobnokislinske verige na aciliranem cistatinu na njegovo prehajanje v celice (Influence of the fatty acyl chain length on acylated cystatin on its internalization into the cell), diplomska naloga, 2008, str. 1-55.
- 8) Turk, B. Inaktivacija cisteinskih proteinaz katapsinov B in L v alkalnem mediju in vloga cistatinov pri tem procesu, doktorska disertacija, Ljubljana, 1993, str. 12-30.
- 9) Premzl, A. Vpliv monoklonskih protiteles proti katapsinu B in proteinaznih inhibitorjev na proliferacijo, invazijo in angiogenezo tumorskih celic in vitro, magistrsko delo, Ljubljana, 2001.
- 10) Turk, V., Turk, B., Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. The EMBO Journal, 2001, let. 20, št. 17, str. 4629-4633.
- 11) Kos, J. Interakcije različnih oblik kurjega cistatina z endogenimi cisteinskimi proteinazami, doktorska disertacija, Ljubljana, 1992, str.66-72.

- 12) Staniforth, R. A., Giannini, S., Higgins, L. D., Conroy, M. J., Hounslow, A. M., Jerala, R., Craven C. J., Waltho, J. P. Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *The EMBO Journal*, 2001, let. 20, št. 17, str. 4774-4781.
- 13) Umek, A. Saponini- projekcije s predavanj iz farmakogonoziije, www.farmadrustvo.si/gradivo_p/Farmakognozija/predavanja2005-2006/v_glikozidi_saponini.ppt, 2008
- 14) Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M. Drogen analyse; Dunnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1983, str. 225-244.
- 15) Wassler, M., Jonasson, I., Persson, R., Fries, E. Differential permeabilization of membranes by saponin treatment of isolated rat hepatocytes. Release of secretory proteins, *The Biochemical Journal*, 1987, let. 247, str. 407-415.
- 16) Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H., Becker, K. The biological action of saponins in animal system: a review, *British Journal of Nutrition*, 2002, let. 88, str. 587-605.
- 17) Menin, L., Panchichkina, M., Keriell, C., Olivares, J., Braun, U., Seppet, E.K., Saks, V.A. Macrocompartmentation of total creatine in cardiomyocytes revisited, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001, let. 220, str. 149-159.
- 18) Armah, C.N., Mackie, A.R., Roy, C., Price, K., Osbourn, A.E., Bowyer, P., Ladha, S. The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol, *Biophysical Journal*, 1999, let. 76, str. 281-290.
- 19) Pillion, D.J., Amsden, J.A., Kensil, C.R., Recchia, J. Structure-function relationship among Quillaja saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, let. 85(5), 518-524.
- 20) Mimaki, Y., Yokosuka, A., Kuroda, M., Sashida, Y. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins, *Biologica & Pharmaceutical Bulletin*, 2001, let. 24, str. 1286-1289.
- 21) Tian, J.K., Xu, L.Z., Zou, Z.M., Yang, S.L., Three novel triterpenoid saponins from *Lysimachia capillipes* and their cytotoxic activities, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, let 54, str. 567-569.
- 22) Heisler, I., Sutherland, M., Bachran, C., Hebestreit, P., Schnitger, A., Melzig, M.F., Fuchs, H. Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances

- the targeted cytotoxicity on tumor cells, *Journal of Controlled Release*, 2005, let. 106, str. 123-137.
- 23) Bachran, C., Sutherland, M., Heisler, I., Hebestreit, P., Melzig, M.F., Fuchs, H. The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure, *Society for Experimental Biology and Medicine*, 2006, let. 231, str. 412-420.
- 24) Pokrižnik, A., Fajmut, A. Spektroskopske metode v biofiziki. http://fizika.uni-mb.si/biofizika/projekt/spektro_metode/fluoro.htm, 2008
- 25) http://fizika.pfmb.uni-mb.si/biofizika/projekt/spektro_metode/vrste.htm, 2008
- 26) www.gimvic.org/projekti/timko/2003/2c/naravnabarvila/ekstrakcija_in_locitev.htm, 2008
- 27) Sollner Dolenc, M., Pečar. S. Vaje iz farmacevtske kemije III, druga dopolnjena izdaja, Ljubljana, 2003, str.6-10.

