

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Eva BLATNIK

**UČINEK EKSTRAKTA OGNJIČA NA KOKOŠJE
MAKROFAGE *in vitro***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Eva BLATNIK

UČINEK EKSTRAKTA OGNJIČA NA KOKOŠJE MAKROFAGE *in vitro*

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**EFFECT OF MARIGOLD EXTRACT ON CHICKEN
MACROPHAGES *in vitro***

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Molekulske in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti, v laboratoriju Oddelka za zootehniko, Rodica.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 20. 2. 2015 sprejela temo in za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat, univ. dipl. biol. in za recenzenta prof. dr. Roka Kostanjška, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Eva Blatnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 582.991.18(043.2)
KG	ognjič/ekstrakt/kokošji makrofagi HD11/oksidativni stres/antioksidant
AV	BLATNIK, Eva, dipl. bioteh. (UN)
SA	NARAT, Mojca (mentor)/KOSTANJŠEK, Rok (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	UČINEK EKSTRAKTA OGNJIČA NA KOKOŠJE MAKROFAGE <i>in vitro</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XI, 66 str., 35 sl., 3 pril., 74 vir.
IJ	Sl
Jl	sl/en
AI	Zaradi prepovedi uporabe antibiotikov v krmi rejnih živali se danes veliko raziskav osredotoča na iskanje naravnih krmnih dodatkov npr. rastlinskih ekstraktov. Za veliko rastlin so že dokazali, da spodbujajo imunski sistem, apetit in prebavo ter delujejo antimikrobno, protivnetno in antioksidativno. Ena izmed takih rastlin je tudi zdravilni ognjič (<i>Calendula officinalis</i>), ki ga tradicionalno uporabljajo za celjenje ran, oteklin, ozeblin in opeklin ter za blaženje vnetja. Znanstvene raziskave so do sedaj dokazale, da ognjičevi ekstrakti delujejo imunostimulatorno, protivnetno, protivirusno, antigenotoksično, protitumorsko in antioksidativno. Namen naloge je bil testirati vpliv ognjičevega ekstrakta v dveh različnih topilih – etanolu in propilen-glikolu – na viabilnost in nivo respiracije kokošjih makrofagov HD11 <i>in vitro</i> . Rezultati so pokazali, da je bil ekstrakt v propilen-glikolu citotoksičen pri koncentraciji 25 µg/ml, medtem ko je bil etanolni ekstrakt (OEE) citotoksičen pri 800 µg/ml. Te rezultate smo potrdili tudi s kolorimetričnim testom za določanje nivoja respiracije celic – test XTT (rumeri derivat tetrazolija). Potrdili smo našo hipotezo o vplivu topila na delovanje ekstrakta in delno potrdili hipotezo, da bodo le višje koncentracije obeh ekstraktov citotoksične. Za preverjanje antioksidativnih lastnosti OEE smo celice izpostavili oksidativnemu stresu s H ₂ O ₂ , nato pa jih tretirali z OEE in opazovali popravljalni učinek na viabilnost celic. Opazili smo manjši porast viabilnosti celic v primerjavi s kontrolo, vendar le-ta ni bil statistično značilen. S testom XTT smo opazovali popravljalni in zaščitni učinek OEE po oz. pred izpostavitvi oksidativnemu stresu. OEE ni pokazal popravljalnega učinka, pri zaščitnem učinku pa rezultati niso bili prepričljivi. Tako smo tretjo in četrto hipotezo, kjer smo predvidevali, da bo ognjičev ekstrakt uspel popraviti škodo oz. zaščititi celice pred oksidativnim stresom, ovrgli. Zaključimo lahko, da uporabljeni ognjičev ekstrakt ni pokazal pričakovanega antioksidativnega delovanja.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDC 582.991.18(043.2)
 CX marigold/extract/chicken macrophages HD11/oxidative stress/antioxidant
 AU BLATNIK, Eva
 AA NARAT, Mojca (supervisor)/KOSTANJŠEK, Rok (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programme of Molecular and Functional Biology
 PY 2016
 TI EFFECT OF MARIGOLD EXTRACT ON CHICKEN MACROPHAGES *in vitro*
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
 NO XI, 66 p., 35 fig., 3 ann., 74 ref.
 LA Sl
 AL sl/en
 AB Due to the ban of antibiotics in animal feed several scientific researches are focused on the search for natural feed additives, like plant extracts. Many of herbs have already been proven to boost immune system, stimulate appetite, metabolism and have antimicrobe, antiinflammatory, and antioxidant abilities. One of these herbs is also marigold (*Calendula officinalis*), which is traditionally used for healing wounds, swellings, frostbites, burns, and reducing inflammation. Up until now, research has proven that marigold extracts have immunostimulatory, antiinflammatory, antigenotoxic, antitumor and antioxidant properties. The goal of this research was to test the effect of marigold extract in two different solvents – ethanol and propylen-glicol – on chicken macrophages HD11 cells' viability and metabolic activity *in vitro*. The results showed that propylen-glycol extract was cytotoxic at concentration 25 µg/ml, whereas ethanol extract (OEE) was cytotoxic at 800 µg/ml. This effect was also confirmed with a colorimetric assay for assessing cell respiration rate - XTT test (yellow tetrazolium derivate). We confirmed our hypothesis on solvent effect on extract activity and partially confirmed hypothesis that only higher concentrations will be cytotoxic. To test OEE antioxidant properties we have exposed cells to oxidative stress with H₂O₂ and then treated them with OEE to observe reparative effect on cell viability. We noticed small increase in sample cell viability comparing to control group, but it was not statistically significant. Using XTT test we investigated the reparative and protective effect of OEE before and after oxidative stress, respectively. OEE did not show reparative effect, whereas the results on protectice effect were not conslusive. We refuted our third and fourth hypothesis, where we expected that marigold extract will succeed in repairing the damage and protecting the cells from oxidative stress. We concluded that marigold ekstrakt in use did not show expected antioxidant activity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 REAKTIVNE KISIKOVE SPOJINE IN OKSIDATIVNI STRES.....	3
2.1.1 Reaktivne kisikove spojine.....	3
2.1.2 Oksidativni stres	5
2.2 ANTIOKSIDANTI.....	8
2.3 ZDRAVILNI OGNJIČ	10
2.3.1 Tradicionalna uporaba ognjiča	11
2.3.2 Znanstvene raziskave o ognjiču	12
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 CELIČNA LINIJA HD11.....	19
3.2 OGNJIČEV EKSTRAKT.....	20
3.3. ŠTETJE CELIC HD11	20
3.3.1 Štetje z Neubauerjevimi števničnimi komorami	20
3.3.2 Štetje v mikrotitrski plošči pod mikroskopom	21
3.3.3 Štetje s polavtomatskim celičnim števcem LUNA-FL™	21
3.3.3.1 Primerjava dveh različnih barvil za štetje z avtomatskim celičnim števcem LUNA-FL™.....	22
3.4 RASTNA DINAMIKA KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11	23
3.5 VPLIV H ₂ O ₂ NA VIABILNOST KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11	25
3.5.1 Določanje orientacijskih vrednosti koncentracij H₂O₂.....	25
3.5.2 Preliminarni poskus viabilnosti celic HD11 tretirane s H₂O₂	25
3.6 VPLIV OGNJIČEVEGA EKSTRAKTA NA VIABILNOST KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11	26
3.6.1 Določanje orientacijskih vrednosti koncentracij ognjičevega ekstrakta.....	26
3.6.2 Preliminarni poskus viabilnosti celic HD11 tretirane z OEE.....	27
3.7 POPRAVLJALNO DELOVANJE ETANOLNEGA OGNJIČEVEGA EKSTRAKTA NA VIABILNOST CELIC HD11 PO POVZROČITVI OKSIDATIVNEGA STRESA S H ₂ O ₂	27

3.8 VPLIV OGNJIČEVEGA EKSTRAKTA NA NIVO RESPIRACIJE CELIC HD11 – TEST XTT	29
3.8.1 Umeritvena krivulja	29
3.8.2 Preliminarni test XTT delovanja različnih ognjičevih ekstraktov na nivo respiracije kokošjih makrofagov HD11	30
3.9 ZAŠČITNI IN POPRAVLJALNI UČINEK ETANOLNEGA OGNJIČEVEGA EKSTRAKTA NA RESPIRACIJO CELIC HD11	31
3.10 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	33
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	34
4.1 VIABILNOST KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11	34
4.1.1 Optimizacija poskusov	34
4.1.1.1 Rastna dinamika kokošjih makrofagov HD11.....	34
4.1.1.2 Vpliv H ₂ O ₂ na viabilnost kokošjih makrofagov HD11	36
4.1.1.3 Vpliv dveh ekstraktov ognjiča in njunih topil na viabilnost kokošjih makrofagov HD11	37
4.1.2 Preliminarni poskusi o viabilnosti celic HD11	39
4.1.2.1 Primerjava dveh različnih barvil za štetje s polavtomatskim celičnim števcem LUNA-FL™	39
4.1.2.2 Vpliv višjih koncentracij H ₂ O ₂ na viabilnost kokošjih makrofagov HD11	41
4.1.2.3 Vpliv višjih koncentracij etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) na viabilnost kokošjih makrofagov HD11.....	42
4.1.3 Popravljivo delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) na viabilnost celic HD11 po povzročitvi oksidativnega stresa s H₂O₂	43
4.2 OPAZOVANJE NIVOJA RESPIRACIJE KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11 ...	46
4.2.1 Umeritvena krivulja	46
4.2.2 Preliminarni test XTT delovanja različnih ognjičevih ekstraktov na nivo respiracije kokošjih makrofagov HD11	47
4.2.3 Zaščitni in popravljalni učinek etanolnega ognjičevega ekstrakta na respiracijo kokošjih makrofagov HD11	49
5 SKLEPI	55
6 POVZETEK	57
7 VIRI	60
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Možne poškodbe v celici, ki nastanejo zaradi prostih radikalov.....	3
Slika 2: Redukcija kisika s štirimi elektroni do vode in vmesni intermedijati.	4
Slika 3: Metabolizem ROS v mitohondrijih.....	5
Slika 4: Shematični prikaz celične obrambe pred različnimi stopnjami oksidativnega stresa.....	7
Slika 5: Mesta nastajanja ROS in obrambni mehanizmi.....	9
Slika 6: Sveži ognjičevi cvetovi (levo) in nasad ognjiča (desno).....	11
Slika 7: Priprava tinkture ognjiča iz cvetov in 50 % tropinovca (levo) ter izdelava ognjičevega mazila na osnovi svinjske masti (desno).....	12
Slika 8: Primeri različnih oranžnih in rumenih ognjičevih cvetov za kvantitativno analizo karotenoidov.	13
Slika 9: Števna ploščica za vidno svetlobo za štetje s celičnim števcem LUNA-FL™ (levo, Luna Bright Field ..., 2014) in slika vzorca (desno) pridobljena z LUNA-FL™.....	21
Slika 10: Razporeditev vzorcev na 24-lukenjski gojitveni plošči.	22
Slika 11: Primer štetja vzorca s celičnim števcem LUNA-FL™ pod fluorescenčno svetlobo z barvili AO/PI.....	23
Slika 12: Razporeditev vzorcev na 24-lukenjski gojitveni plošči za štetje celic za rastno dinamiko.....	24
Slika 13: Razporeditev vzorcev na 24-lukenjski gojitveni plošči.....	26
Slika 14: Razporeditev vzorcev in kontrol na prvi izmed dveh 24-lukenjskih gojitvenih plošč za poskus o popravljalnem delovanju OEE po oksidativnem stresu povzročnim s H ₂ O ₂	28
Slika 15: Razporeditev kontrol na drugi izmed dveh 24-lukenjskih gojitvenih plošč za poskus o popravljalnem delovanju OEE po oksidativnem stresu povzročnim s H ₂ O ₂	28
Slika 16: Razporeditev na 96-lukenjski mikrotitrski plošči za umeritveno krivuljo XTT testa.....	29
Slika 17: Razporeditev vzorcev na 96-lukenjski mikrotitrski plošči za preliminarni poskus treh različnih ekstraktov in treh različnih topil na respiratorno aktivnost celic HD11.....	31
Slika 18: Razporeditev vzorcev za XTT poskus o zaščitnem/popravljalnem delovanju OEE pred/po oksidativnem stresu povzročnim s H ₂ O ₂	32
Slika 19: Časovni potek glavnih poskusov o zaščitnem (A) in popravljalnem (B) učinku etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) pred (A) oz. po (B) povzročitvi oksidativnega stresa s H ₂ O ₂	32
Slika 20: Rastna dinamika celic HD11 v 24-lukenjski mikrotitrski plošči.	34
Slika 21: Viabilnost celic HD11 v 24-lukenjski mikrotitrski plošči po času.....	35

Slika 22: Vpliv različnih koncentracij in časovnih izpostavitv H ₂ O ₂ na viabilnost kokošjih makrofagov HD11.....	37
Slika 23: Vpliv ognjičevega ekstrakta v dveh različnih topilih na viabilnost kokošjih makrofagov HD11.....	38
Slika 24: Vpliv H ₂ O ₂ na viabilnost celic HD11 in primerjava dveh različnih barvil za štetje celic – Tripan modro in AO/PI.....	40
Slika 25: Vpliv različnih koncentracij in časovnih izpostavitv H ₂ O ₂ na viabilnost kokošjih makrofagov HD11.....	42
Slika 26: Vpliv različnih koncentracij in časovnih izpostavitv OEE in topila EtOH na viabilnost celic HD11.....	43
Slika 27: Popravlano delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) na viabilnost kokošjih makrofagov HD11 po 4-urnem tretiranju s 1600 μM H ₂ O ₂	44
Slika 28: Popravlano delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) na viabilnost kokošjih makrofagov HD11 po 4-urnem tretiranju s 800 μM H ₂ O ₂	45
Slika 29: Umeritvena krivulja za XTT teste.....	46
Slika 30: Vpliv različnih koncentracij ognjičevega ekstrakta v treh topilih na nivo respiracije celic HD11 po 24-urnem tretiranju.....	48
Slika 31: Popravlano delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta – OEE po 24-urnem tretiranju na celice v oksidativnem stresu.....	50
Slika 32: Popravlano delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta – OEE po 48-urnem tretiranju na celice v oksidativnem stresu.....	50
Slika 33: Zaščitno delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta – OEE po 24-urnem tretiranju na celice pred oksidativnim stresom.....	51
Slika 34: Zaščitno delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta – OEE po 48-urnem tretiranju na celice HD11 pred oksidativnim stresom.....	52
Slika 35: Zaščitno delovanje OEE po 48-urnem tretiranju na celice HD11 pred oksidativnim stresom.....	53

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Shematični prikaz poteka poskusa o popravljalnem delovanju OEE na HD11 po oksidativnem stresu povzročenim s H₂O₂
- PRILOGA B: Shematični prikaz poteka XTT poskusa o zaščitnem delovanju OEE na HD11 pred oksidativnim stresom povzročenim s H₂O₂
- PRILOGA C: Shematični prikaz poteka XTT poskusa o popravljalnem delovanju OEE na HD11 po oksidativnem stresu povzročenim s H₂O₂

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

8-okso-dG	8-okso-deoksigvanozin
ABTS	Azino etilbenzotiazolin sulfonska kislina
AO/PI	Akridin oranžno / Propidijev jodid
ATP	Adenozin trifosfat
$\cdot\text{CCl}_3$	Triklorometilni radikal
CE	Ognjičev ekstrakt brez laserskega tretiranja
Cox-2	Ciklooksigenaza 2
CS	Kokošji serum (ang. Chicken serum)
Cu/Zn-SOD	Baker/cinkova superoksidna dismutaza
dA	Deoksiadenozin
DEN	Dietilnitrozamin
DMSO	Dimetil sulfoksid, krioprotektant
DPPH	Difenil pikrihidrazil
EtOH	Etanol
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FBS	Fetalni goveji serum (ang. Fetal bovine serum)
FR	Fiziološka raztopina
FRAP	Redukcija železovega iona (ang. Ferric ion reducing antioxidant power)
GPx	Glutationska peroksidaza
H ₂ O ₂	Vodikov peroksid
HD11	Trajna celična linija kokošjih makrofagov
HIV-1	Človeški virus imunske pomanjkljivosti
HO ₂ \cdot	Hidroperoksilni radikal
HPLC	Visokotlačna tekočinska kromatografija
IFN- γ	Interferon gama
Koencim Q	Ubikvinon
Koencim QH ⁺	Ubisemikvinon
Koencim QH ₂	Ubikvinol
LACE	Z laserjem aktiviran ognjičev ekstrakt
LO \cdot	Alkoksilni radikal
LOO \cdot	Peroksilni radikal
LPLC	Nizkotlačna tekočinska kromatografija
LUNA-FL™	Polavtomatski celični števec
MC29	Kokošji virus mielocitomatoze, okvarjen virus akutne levkemije
Mn-SOD	Mangan superoksidna dismutaza
MTT	Rumeni tetrazolij
Myh	MutY DNK glikozilaza
NADH	Reducirani nikotinamid adenin dinukleotid

NADH + H ⁺	Reducirani nikotinamid adenin dinukleotid z nabitim vodikovim protonom
NADPH	Reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaHCO ₃	Natrijev hidrogenkarbonat
NO [•]	Dušikov oksid
O ₂ ^{•-}	Superoksidni anion
OEE	Ognjičev etanolni ekstrakt
OFR	Ognjičev ekstrakt v fiziološki raztopini
Ogg1	8-oksogvanin glikozilaza
•OH	Hidroksilni radikal
OPGE	Ognjičev propilen-glikolski ekstrakt
PBS	Fosfatni pufer (ang. Phosphate-buffered saline)
PG	Propilen-glikol
R [•]	Alkilni radikal
R ²	Koeficient determinacije
ROOH	Hidroperoksid
ROS	Reaktivne kisikove spojine (ang. Reactive oxygen species)
RPMI-1640	Osnovno gojišče (ang. Roswell Park Memorial Institute medium)
RS [•]	Tiolni radikal
SOD	Superoksidna dismutaza
t _{gen}	Podvojitveni čas
TLC	Tankoplastna kromatografija
UVB	Ultravijolični žarki B
XTT	Rumeni derivat tetrazolija
μ	Konstanta hitrosti rasti

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Zadnje čase se ljudje vse bolj zavedajo pomembnosti zdravega načina življenja s pravilno prehrano, veliko gibanja in izogibanjem stresu. Pri vsem tem je hrana ključnega pomena in zato so potrošniki na tem področju čedalje bolj osveščeni ter zahtevajo kakovostna, okusna in hranljiva živila. Iz tega razloga se prehranska industrija poslužuje novih tehnologij in načinov pridelave hrane, ki še vedno omogočajo visoko proizvodnjo, hkrati pa so nastala živila varna, z manj kemikalijami in ohranjajo svoje hranilne lastnosti.

Zdravo in kvalitetno hrano živalskega izvora lahko pridelamo le iz zdravih živali (Saxena, 2008). Zato se pri reji živali primerno okolje, higiena in kakovostna krma, odraža na kvaliteti živalskih produktov. Vendar so ravno rejne živali bolj občutljive na stresne dejavnike v okolici in tako bolj dovzetne za različne bolezni. Najpogostejša in najbolj učinkovita metoda borbe proti razvoju bolezni pri rejnih živalih je bila dodatek različnih antibiotikov v krmo. Toda zaradi naraščajoče odpornosti bakterij na antibiotike je Evropska unija s 1. januarjem leta 2006 prepovedala uporabo antibiotikov kot dodatkov v krmi za rejne živali (Ban on antibiotics ..., 2005). Posledično se je začelo iskanje naravnih prehranskih dodatkov, ki bi izboljšali imunsko odpornost rejnih živali in s tem izboljšali proizvodnjo živalskih produktov. Številne raziskave se tako osredotočajo na določanje biokemijskih struktur in fizioloških lastnosti različnih krmnih dodatkov kot npr. probiotiki, prebiotiki, organske kisline in rastlinski ekstrakti (Frankič in sod., 2009).

Veliko ekstraktov različnih zelišč in začimb ima dolgoletno tradicijo uporabe v prehrani ljudi zaradi svoje arome in različnih medicinskih lastnosti (Greathead, 2003). Toda za uporabo teh ekstraktov v prehranski industriji so potrebni konkretni in zanesljivi podatki o njihovih učinkih in načinu delovanja, kar je danes tema različnih raziskovalnih projektov.

Do zdaj so različnim zdravilnim rastlinam in začimbam uspešno dokazali, da delujejo kot spodbujevalci imunskega sistema, apetita in prebave, poleg tega pa izkazujejo še antimikrobno, protivnetno in antioksidativno delovanje (Frankič in sod., 2009). Slednje je najpomembnejši učinek zdravilnih rastlin, saj je oksidacija glavni proces, ki kvari hrano med shranjevanjem, v živalih pa povzroča različne celične poškodbe. To ima posledice na dveh ravneh – živali imajo oslabilen imunski sistem, hkrati pa je njihova produktivnost nižja (mleko, jajca) in prehranski izdelki slabše kakovosti (mesni in mlečni izdelki) (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

V celici je vedno prisotno naravno ravnovesje med prostimi radikali (povzročitelji oksidativnega stresa) in antioksidanti. Različni zunanji dejavniki pa lahko to ravnovesje porušijo in takrat lahko prosti radikali s svojo reaktivnostjo in vezavo na makromolekule

(nukleinske kisline, proteini, itd.) povzročajo škodo v celici. V kolikor se ta škoda ne popravi ali ne izolira od ostalih zdravih celic in tkiv, lahko to privede do nastanka različnih bolezni. Celice se proti oksidativnemu stresu borijo na različne načine – lahko prestrežejo proste radikale še preden povzročijo škodo, popravijo že nastale poškodbe ali pa preidejo v programirano celično smrt – apoptozo.

Antioksidanti so glavni lovci prostih radikalov in jih lahko najdemo v številnih zdravilnih rastlinah. Ena izmed njih je tudi zdravilni ognjič, ki je postal glavni predmet različnih znanstvenih študij zaradi svojih različnih farmakoloških aktivnosti, med katerimi so protivnetno, protitumorsko, protivirusno, imunostimulatorno in antioksidativno delovanje.

1.2 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Namen magistrske naloge je bil kvantitativno določiti učinek ognjičevega ekstrakta na kokošje makrofage HD11 *in vitro*. Želeli smo preveriti, kakšen učinek ima sam ekstrakt na celice in ugotoviti, ali je sposoben celice po oksidativnem stresu regenerirati ter ali je sposoben zaščititi celice pred omenjenim stresom z antioksidativnim delovanjem.

Na voljo smo imeli ognjičev ekstrakt v dveh različnih topilih, etanolu in propilen-glikolu, zato smo testirali vpliv ekstraktov na celice HD11.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

1. Zaradi različnih topil se bosta ekstrakta razlikovala v svojem delovanju na celice.
2. Nizke koncentracije ekstraktov v obeh topilih ne bodo citotoksične, višje koncentracije ekstraktov pa bodo citotoksične.
3. Oba ognjičeva ekstrakta bosta imela antioksidativen učinek na celice, ki so izpostavljene oksidativnemu stresu, in jih bosta uspešno regenerirala.
4. Oba ognjičeva ekstrakta bosta imela antioksidativen učinek na celice in jih zaščitila pred oksidativnim stresom.

2 PREGLED OBJAV

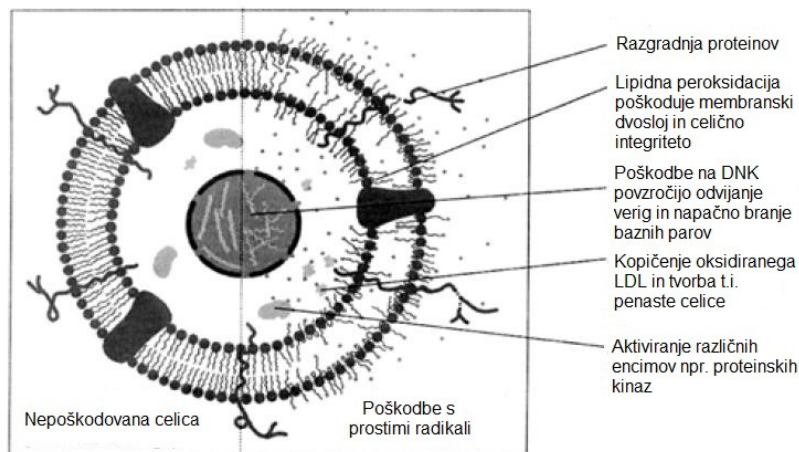
2.1 REAKTIVNE KISIKOVE SPOJINE IN OKSIDATIVNI STRES

2.1.1 Reaktivne kisikove spojine

Redoks reakcije so kemijski procesi oddajanja in sprejemanja elektronov in so ene izmed sestavnih reakcij v celičnem metabolizmu, pri čemer nastajajo različni oksidanti. Le-ti v celici predstavljajo vlogo endogenih signalnih molekul, ki nadzorujejo različne glavne kaskadne reakcije kot npr. apoptozo in vnetje (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Glavni celični oksidant, ki sprejema elektrone v oksidacijski reakciji, je kisik (O_2). Ta lahko po sprejemu elektrona tvori različne kisikove proste radikale. Prosti radikali so snovi, ki imajo dodatni neparni elektron, in jih uvrščamo v več različnih skupin, glede na to, kateri kemijski element je tisti, ki sprejema elektrone. Tako poznamo:

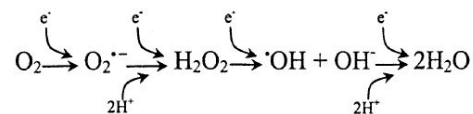
- kisikove radikale (superoksidni anion – $O_2^{\cdot-}$, hidroksilni radikal – $\cdot OH$, hidroperoksilni radikal – HO_2^{\cdot} , peroksilni radikal – LOO^{\cdot} in alkoksilni radikal – LO^{\cdot});
- ogljikove radikale (alkilne radikal – R^{\cdot} in triklorometilne radikal – $\cdot CCl_3$);
- žveplove radikale (tiolni radikal – RS^{\cdot});
- dušikove radikale (dušikov oksid – NO^{\cdot}) (Đilas in sod., 2002).

Ti prosti radikali so nujno potrebni za normalno delovanje celičnega metabolizma. Težava pa nastane, ko teh radikalov nastane preveč in se zaradi svoje močne reaktivnosti vežejo na ostale makromolekule v celici (proteini, sladkorji, maščobe in nukleinske kisline) in tako povzročajo škodo v celici (Slika 1). Poleg prostih radikalov lahko v celicah povzročajo škodo tudi nekateri drugi oksidanti npr. H_2O_2 in $ROOH$, ki sicer nimajo prostega elektrona, vendar so vseeno zelo reaktivni. To skupino kisikovih prostih radikalov in oksidantov imenujemo tudi reaktivne kisikove spojine (ang. Reactive Oxygen Species – ROS).



Slika 1: Možne poškodbe v celici, ki nastanejo zaradi prostih radikalov (Đilas in sod., 2002).

Največji proizvajalci ROS v celicah so mitohondriji, kjer se med procesom dihanja približno 1–2 % kisika pretvori v superoksidni anion $O_2^{\cdot-}$ (Boveris in Chance, 1973). Razlog za nastanek $O_2^{\cdot-}$ se skriva v elektronski transportni verigi oz. dihalni verigi, ki poteka v mitohondrijski notranji membrani. Sestavni deli elektronske transportne verige so štiri različni kompleksi: kompleks I (NADH dehidrogenaza), kompleks II (sukcinat dehidrogenaza), koencim ubikvinon, kompleks III (ubikvinol-citokrom C oksireduktaza) in kompleks IV (citokrom C oksidaza), pri čemer elektroni prehajajo iz enega kompleksa na drugega (Slika 3). To poteka do kompleksa IV, kjer se štiri elektroni iz citokroma povežejo s kisikom in se pri tem tvori voda (Slika 2) (Nordberg in Arnér, 2001).

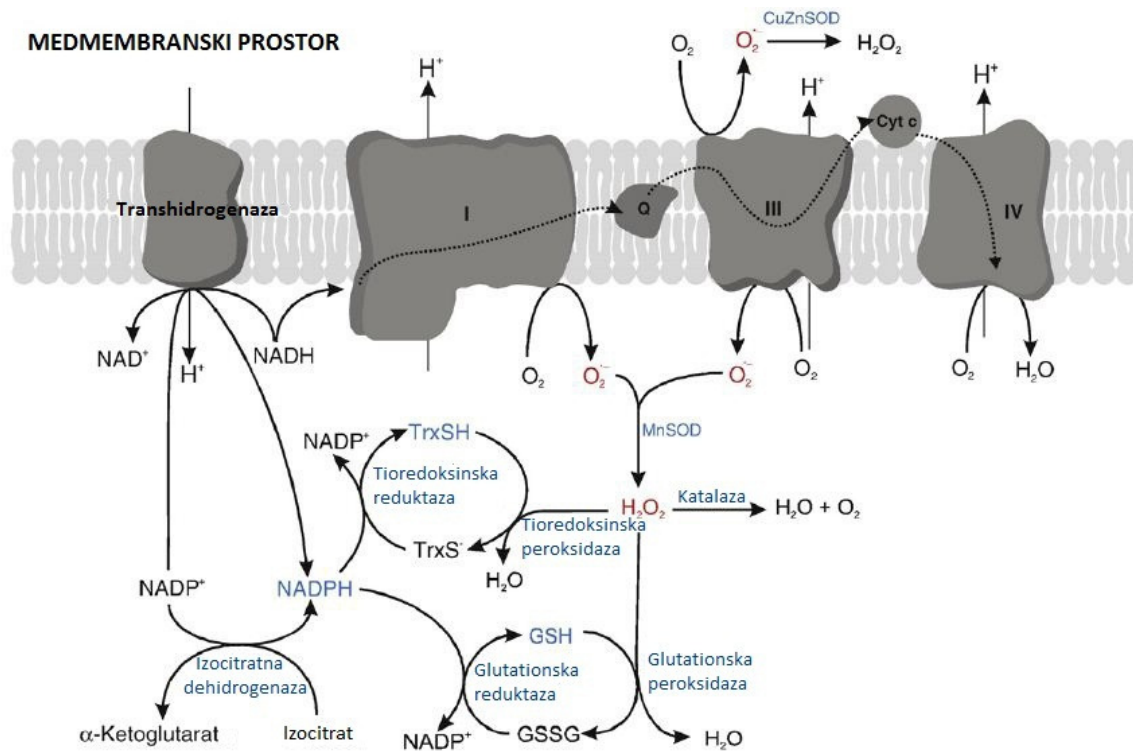


Slika 2: Redukcija kisika s štirimi elektroni do vode in vmesni intermedii (Nordberg in Arnér, 2001).

Na začetku dihalne verige se dva elektrona iz $NADH + H^+$ vežeta na kompleks I oz. se vzporedno dva elektrona iz sukcinata vežeta na kompleks II. Nato se oba elektrona prestavita na ubikvinon (koencim Q), kjer se najprej tvori ubisemikvinon (koencim QH^+) nato pa ubikvinol (koencim QH_2). Ubikvinol nato prenese svoje elektrone na kompleks III, ta pa jih nato prenese na citokrom C. Iz citokroma C se elektroni transportirajo do kompleksa IV, kjer se iz štirih elektronov (iz štirih citokromov C) kisik pretvori v vodo (Wallace, 2005). V kompleksih I in III lahko med transportom pride do spontane izgube elektronov in se povežejo s kisikom, ki je v okolici. Tako z monoelektronsko redukcijo kisika nastane $O_2^{\cdot-}$, ki je precej nestabilen, zato se nato z encimom superoksidna dismutaza (SOD), bodisi v matriksu mitohondrija bodisi v medmembranskem prostoru, pretvori v H_2O_2 , ki pa je relativno stabilna molekula in lahko prehaja skozi membrano. Tako lahko potuje v citosol celice, kjer se odstrani s pomočjo antioksidativnih encimov npr. katalaze, glutationske peroksidaze in tioredoksinke peroksidaze (Nordberg in Arnér, 2001). H_2O_2 pa lahko v citosolu deluje kot signalna molekula in vpliva na delovanje različnih celičnih procesov npr. celični cikel, odziv na stres, energijski metabolizem in redoks ravnotežje (Dröge, 2002). H_2O_2 , ki ostane v mitohondrijih, pa se lahko pretvori v kisik in vodo s pomočjo različnih encimov, ki se tam nahajajo npr. katalaze, različne reduktaze in peroksidaze (Slika 3).

Najbolj pomembna sistema za odstranjevanje H_2O_2 sta sistema glutationske peroksidaze in reduktaze ter tioredoksinke peroksidaze in reduktaze. Oba sistema uporabljata reducirani glutation oz. tioredoksin kot vir elektronov. Glutacion in tioredoksin pa sta reducirana s pomočjo NADPH (Kowaltowski in sod., 2009). Tako je odstranjevanje H_2O_2 odvisno od količine nastalega NADPH v mitohondrijih, s tem pa je povezana tudi mitohondrijska antioksidativna sposobnost. Namreč, če se H_2O_2 v mitohondriju ne razgradi s pomočjo

antioksidativnih sistemov (katalaze, glutationske peroksidaze ...), se lahko preko t. i. Felton reakcije (katalizacija s kovinskimi ioni Fe^{2+} ali Cu^+) pretvori v hidroksilni radikal $\cdot\text{OH}$. Le ta je močno reaktiven in glavni krivec za različne poškodbe v bioloških sistemih (Nordberg in Arnér, 2001).



Slika 3: Metabolizem ROS v mitohondrijih (Kowaltowski in sod., 2009).

Mitohondriji niso edini vir ROS, saj lahko nastanejo tudi v citosolu kot produkti različnih t. i. flavoencimov. Tak je npr. ksantinska oksidaza (Nordberg in Arnér, 2001), ki sodeluje pri reperfuzijski poškodbi tkiva. To je poškodba, ki nastane, ko ima tkivo za dalj časa prekinjen krvni obtok (ishemija) in s tem prekinjen dotok kisika, potem pa nenadoma ponovno vzpostavimo krvni pretok obogaten s kisikom. Posledično zaradi povečane količine kisika nastane več ROS in tako lahko reperfuzija povzroči celo več škode kot sama ishemija (Ishemična nekroza ..., 2005). Povečano količino ROS lahko proizvedejo tudi nekatere fagocitotske celice (nevtrofilci in makrofagi), kjer NADPH oksidaze namenoma proizvajajo velike količine ROS, predvsem $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Nordberg in Arnér, 2001). Namreč ravno $\text{O}_2^{\cdot-}$ je tisti, ki nato uniči bakterije med fagocitozo (Valko in sod., 2007).

2.1.2 Oksidativni stres

Kljub temu da lahko ROS poškodujejo celice, so ROS nujno potrebne za normalno delovanje celičnih procesov in ohranjanje homeostaze (Finkel in Holbrook, 2000). Tako lahko v citosolu delujejo kot signalne molekule pri različnih procesih npr. pri uravnavanju

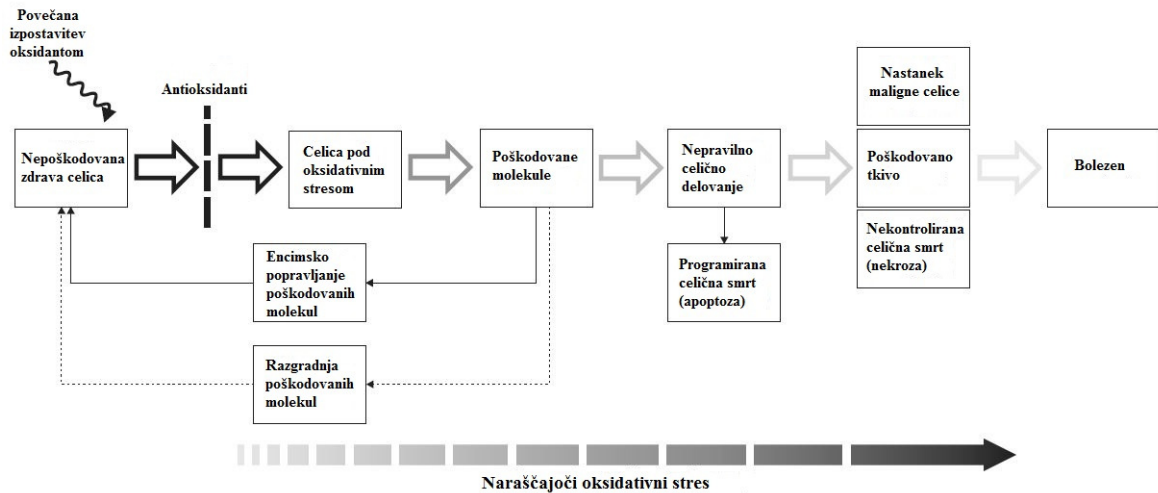
pomnoževanja celic (Finkel, 1998) ali pa sodelujejo pri fagocitozi (Valko in sod., 2007). V normalnih fizioloških pogojih tako nastane le majhna koncentracija ROS. Težava pa nastane, kadar je, zaradi različnih stresnih dejavnikov in povečanega metabolizma celic, razmerje med ROS in antioksidanti porušeno. Takrat se celica ne more več braniti pred posledicami reagiranja ROS z makromolekulami, kar celico vodi v t. i. oksidativni stres.

Glede na to, da so reakcije dihalne verige v mitohondrijih glavni izvor ROS, so tudi glavni izvor oksidativnega stresa. Mitohondriji so še posebej občutljivi na različne dražljaje iz okolja. Tako lahko višji kalorični vnos hrane poviša nivo celičnega dihanja, s tem pa tudi poviša proizvodnjo ROS. Na mitohondrijsko proizvodnjo ROS vpliva tudi količina prisotnega kisika. Več kot bo kisika v okolici, več bo nastalih ROS (Kowaltowski in sod., 2009). V primeru ishemije, ko zaradi prekinjenega dotoka krvi primanjkuje kisika, bo po vzpostavitvi krvnega obtoka prišlo do nenadne reoksigenacije celic in se bo tako tvorilo več ROS (Ishemična nekroza ..., 2005). Tudi določene kemikalije lahko povzročijo povišan nastanek ROS, npr. rotenon. Gre za insekticid širokega spektra, ki inhibira delovanje kompleksa I v mitohondrijski dihalni verigi in tako prepreči normalen transport elektronov (Li in sod., 2003).

Oksidativni stres lahko nastane kot posledica različnih zunanjih dejavnikov. V primeru rejnih živali so to neprimerni prostori za rejo, nekvalitetna prehrana, prekomerno ali nezadostno krmljenje, neustrezni pogoji v reji itd. Vsi ti stresni dejavniki vodijo v oslabitev homeostaze celotnega organizma, kar lahko vpliva na produktivnost živali in kakovost živalskih produktov (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Poleg tega pa lahko izgubijo sposobnost obrambe pred patogeni, kar nato vodi v različne bolezni in celo smrt živali. Najbolj pogoste bolezni, ki se pojavijo pri rejnih živalih kot posledica spremenjenega ravnovesja med oksidanti in antioksidanti, so pljučnica (Lauritzen in sod., 2005) in sepsa pri prašičih (Basu in Eriksson, 2000) ter obstruktivne bolezni dihal pri konjih (Deaton in sod., 2004).

Tarče ROS so lahko praktično katerekoli makromolekule, ki se nahajajo v celici (nukleinske kisline, proteini, lipidi ...) (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Oksidacija DNK vodi v različne mutacije, napačna vstavljanja nukleotidnih baz, prekinitve ene ali obeh verig DNK in posledično celično smrt. Oksidativne poškodbe DNK so najbolj resne izmed posledic oksidativnega stresa, saj so težko popravljive (Poulsen, 2005). Zaradi oksidacije proteinov, katerih najpomembnejši predstavniki so encimi, pride do nepravilnega delovanja in spremembe v aktivnosti, zaradi česar niso sposobni opravljati svojih funkcij. ROS lahko napadejo tudi lipide, ki so sestavni del membranskega lipidnega dvosloja. Nenasičene maščobne kisline so še posebej občutljive na oksidacijo, poleg tega pa pri tem nastanejo lipidni peroksilni radikali, ki so sposobni oksidirati še več lipidov ter tako sprožijo verižno reakcijo lipidne peroksidacije (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Ker se ROS preko celičnega metabolizma konstantno proizvajajo, so celice razvile tudi mehanizme, s katerimi se učinkovito bojujejo proti oksidativnemu stresu. Glede na način delovanja lahko te sisteme razdelimo na lovilce prostih radikalov, popravljalne oz. odstranjevalne sisteme in mehanizme, ki vodijo v apoptozo. Shematičen pregled, kako naraščajoči oksidativni stres deluje na celico in kateri mehanizmi obrambe pri tem sodelujejo, je predstavljen na sliki 4.



Slika 4: Shematični prikaz celične obrambe pred različnimi stopnjami oksidativnega stresa (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Prvo linijo celične obrambe pred oksidativnimi stresom (Slika 4) predstavljajo celični antioksidanti, ki so opisani v poglavju 2.2.

Druga linija celične obrambe so sistemi za popravljanje in odstranjevanje oksidiranih in poškodovanih molekul npr. lipidov in proteinov. Mednje spadajo tudi DNK popravljalni encimi, ki lahko zaznajo oksidirane ali nepravilno vstavljene nukleotidne baze, jih odstranijo in zamenjajo s pravilno, nepoškodovano bazo. V vsaki celici naj bi bila DNK dnevno izpostavljena med 10 000 in 100 000 modifikacij kot posledica oksidacije. Od tega jih več kot 99,99 % popravijo encimi (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Primera takih encimov sta 8-oksogvanin glikozilaza (Ogg1) in MutY DNK glikozilaza (Myh) (Slika 5). Eden glavnih produktov oksidacije DNK je 8-okso-deoksigvanozin (8-okso-dG), ki je pokazatelj nivoja oksidativnega stresa. V DNK molekuli je 8-okso-dG nepravilno povezan z deoksiadenozinom (dA). Ogg1 in Myh skupaj odstranjujeta dA iz verige in tako preprečita, da bi 8-okso-dG tvoril transverzne mutacije iz gvanina v timin (Muller in sod., 2007).

Kadar je oksidativni stres premočan in so poškodbe prehude, pa celice aktivirajo svoj zadnji obrambni mehanizem, apoptozo (Lykesfeldt in Svendsen, 2007). Gre za proces programirane celične smrti, ki je reguliran s številnimi signalnimi potmi, ki se lahko

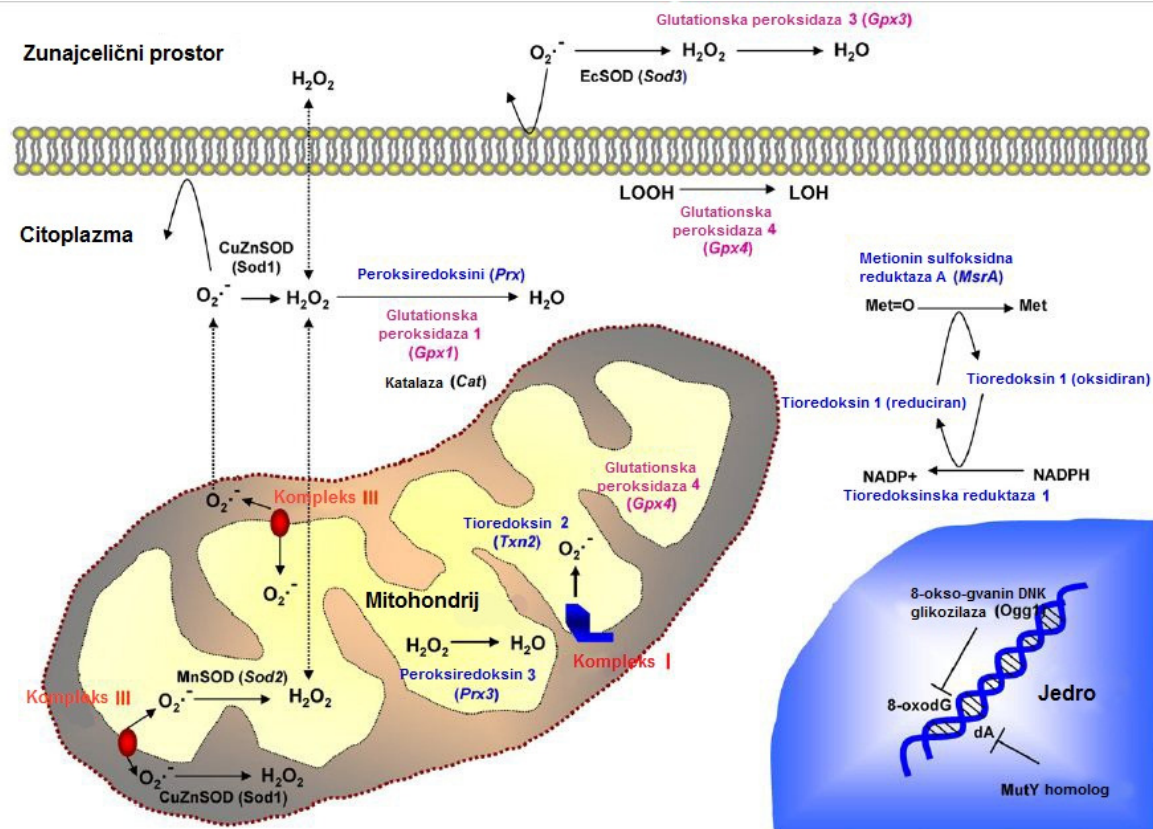
sprožijo tudi zaradi prevelike količine ROS. Na ta način se poškodovane celice izolirajo od ostalih in tako minimalizirajo obseg poškodbe v tkivih (Payne in sod., 1995).

2.2 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so snovi, ki so sposobne darovati svoje elektrone oksidantom, s čimer odpravijo reaktivnost ROS. S tem jih nevtralizirajo, da tako postanejo neškodljivi za makromolekule v celici. Sicer s to reakcijo antioksidanti sami postanejo prosti radikali, vendar so veliko bolj stabilni in ne poškodujejo celic (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Oksidirani antioksidanti grejo nato v proces recikliranja, kjer se z različnimi celičnimi procesi povrnejo v svoje aktivno reducirano stanje. Energijo za te procese dovaja NADPH. Recikliranje antioksidantov je ključno za obrambo celic, saj bi se sicer antioksidanti hitro razgradili in bi jih celica morala nadomestiti (Lykkesfeldt in sod., 2003).

Celične antioksidante delimo na dve skupini: antioksidanti z nizko molekulsko maso in antioksidanti z veliko molekulsko maso (encimi). Med antioksidante z nizko molekulsko maso spadajo npr. vitamin C, vitamin E, karoteni in glutation (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

Encimskih antioksidantov je razmeroma malo in so zelo specifični v svojem delovanju (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). Trije izmed njih so najpomembnejši: supeoksidna dismutaza (SOD), glutationska peroksidaza (GPx) in katalaza. SOD katalizirajo reakcijo dveh superoksidnih anionov $O_2^{\cdot -}$ v H_2O_2 in kisik. Vse SOD za svoja aktivna mesta potrebujejo kovine. V citoplazmi tako deluje Cu/Zn-SOD, v mitohondrijih pa Mn-SOD (Slika 5). Končni produkt delovanja SOD je H_2O_2 , ki ga nato lahko odstranita bodisi katalaza bodisi GPx in ga reducirata do vode in kisika (Davies, 2000). Nekateri encimski antioksidanti pa celo sodelujejo pri recikliranju ostalih antioksidantov, npr. glutationska reduktaza, ki reciklira glutation ali pa dehidroaskorbinska kislinska reduktaza, ki reciklira vitamin C (Lykesfeldt in Svendsen, 2007).



Slika 5: Mesta nastajanja ROS in obrambni mehanizmi (Muller in sod., 2007).

Ostale ne-encimske antioksidante lahko najdemo v različnih rastlinah, kjer so naravno prisotni. V mnogih rastlinah lahko tako najdemo fenolne spojine, kot so tokoferoli, flavonoidi, fenolne kisline ter različne pigmente npr. karotenoide (Larson, 1988).

Med tokoferole spada vitamin E, ki je topen v lipidih in ga lahko najdemo v različnih oljih, kot so: palmino in kokosovo olje, olje iz riževih otrobov, ječmena, koruze in pšeničnih kalčkov. Ker je topen v lipidih, se večinoma nahaja v membranah, kjer preprečujejo lipidno peroksidacijo tako, da se veže na lipidne peroksilne radikale (Đilas in sod., 2002). Pri regeneraciji vitamina E sodeluje askorbinska kislina oz. bolj znana kot vitamin C. Poleg tega pa oba vitamina sinergistično lovita proste radikale v celicah (Larson, 1988). Vitamin C ima sicer v celici še vlogo encimskega kofaktorja in oddajanja oz. sprejemanja elektronov v elektronski transportni verigi (Đilas in sod., 2002).

Flavonoidi imajo difenilpropansko ogrodje (Đilas in sod., 2002) in so prisotni v vseh fotosintetskih celicah (Havsteen, 1983). Glede na oksidacijo centralnega piranovega (ang. pyran) obroča lahko flavonoide razdelimo na več razredov: flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavani, flavanoli in antiocianini (Škerget in sod., 2005). V rastlinah jih najpogosteje najdemo v cvetovih, listih in cvetnem prahu, prisotni pa so tudi v steblih,

deblu in lubju (Havsteen, 1983). Sicer pa je bilo o flavonoidih opravljeno že veliko različnih raziskav o farmakoloških in medicinskih lastnostih. Tako so jim poleg lovljenja prostih radikalov dokazali še druge biološke aktivnosti kot npr. vazodilatacija (širjenje krvnih žil), protirakavo, protivnetno, protibakterijsko, protivirusno in antialergijsko delovanje ter spodbujanje imunskega sistema (Đilas in sod., 2002).

Karotenoidi so skupina različnih pigmentov, ki so v naravi zelo razširjeni in mnogim rastlinam, sadju in zelenjavi dajejo rdeče, oranžne in rumene barvne tone. Sintetizirajo jih praktično vsi fotosintetski organizmi, nastajajo pa tudi v algah in cianobakterijah ter v nekaterih nefotosintetskih bakterijah in glivah. Sicer pa imajo karotenoidi v rastlinah veliko različnih vlog (Lu in Li, 2008). Kot pigmenti sodelujejo pri fotosintezi, kjer služijo kot lovilci svetlobe različnih valovnih dolžin, med njimi tudi take, ki jih klorofil ne more absorbirati (Larson, 1988). S tem hkrati tudi zaščitijo klorofil pred svetlobnimi poškodbami (Armstrong in Hearst, 1996). Poleg tega pa cvetove in plodove obarvajo z rdečimi, oranžnimi in rumenimi barvami in tako privlačijo žuželke in živali za oprasovanje in raznašanje semen (Lu in Li, 2008). Oksidacija karotenoidov omogoči nastanek apokarotenoidov, ki v rastlinah delujejo kot signalne molekule v razvoju rastlin in jih varujejo pred glivičnimi okužbami. Poleg tega nekateri apokarotenoidi dajejo cvetovom in plodovom značilno aromo in okus (Auldridge in sod., 2006). Biokemijsko gledano karotenoidi spadajo v kategorijo tetraterpenoidov, kar pomeni, da so sestavljeni iz 40 ogljikov in imajo v sebi štiri terpene, vsak po deset ogljikovih atomov. Delimo jih na ksantofile in karotene. Ksantofili so karotenoidi, ki vsebujejo kisikov atom kot npr. lutein in zeaksantin. Karoteni pa ne vsebujejo kisika in so sestavljeni samo iz ogljika in vodika. Sem spadajo likopen, α -karoten in β -karoten (Sausserde in Kampuss, 2014).

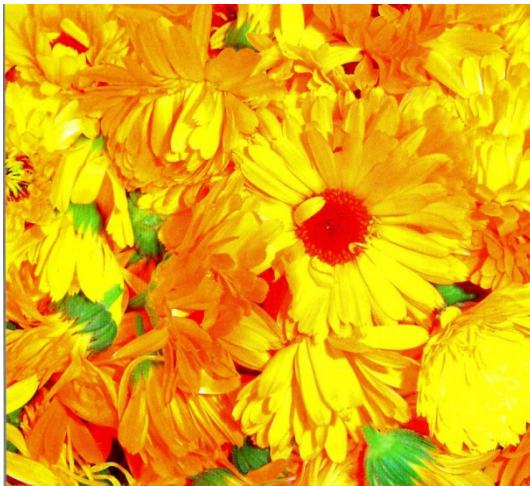
2.3 ZDRAVILNI OGNJIČ

Zdravilni ognjič (*Calendula officinalis*) je enoletna zdravilna rastlina z oranžnimi cvetovi, ki izvira iz južne Evrope, danes pa uspeva predvsem v vrtovih tudi drugod po svetu (Willfort, 1988: 206). Uporabljale naj bi ga že nekatere stare civilizacije v Egiptu in Grčiji, poznali pa so ga tudi Hindujci in Arabci. Njegovo ime *Calendula* izvira iz latinske besede *calends*, ki pomeni prvi dan vsakega meseca, saj je ognjič znan po tem, da ima dolgo obdobje cvetenja (Kemper, 1999), ki traja od junija do oktobra. Zraste lahko do 60 cm visoko, cvetovi pa so lahko široki do 4 cm (Slika 6). Glede na to, ali so bili cvetovi odprti ali zaprti, so lahko včasih celo napovedovali dež. Če so bile glavice po sedmi uri zjutraj še vedno zaprte, je bil to znak, da bo še isti dan deževalo (Willfort, 1988: 205). Ognjič poznamo tudi pod slovenskimi ljudskimi imeni babji prstanec, meseček, primožek, vrtni ognjič, ognjec in rigelc (Treben, 1980: 40).

Ognjič ima že zelo dolgo tradicijo uporabe v zdravilstvu. Omenjala naj bi jo že znana zeliščarka sestra Hildegarda von Biegen, ki je napisala več besedil o zeliščarstvu že v 12. stoletju (Majes, 2011: 180). Prav zaradi svoje dolgoletne uporabe je bilo ognjiču namenjenih precej znanstvenih raziskav (omenjenih v nadaljevanju), ki so dokazale, da ognjičevi pripravki delujejo protivnetno, protibakterijsko, protitumorsko in antioksidativno.

2.3.1 Tradicionalna uporaba ognjiča

V ljudskem zdravilstvu se uporabljajo celi cvetovi (Slika 6, levo), ki jih je potrebno nabrati ob sončnem vremenu, da niso mokri. Nekateri viri pravijo, da je možno uporabiti tudi liste, če so nabrani v času cvetenja ognjiča (Wilfort, 1988: 206), drugi pa pravijo, da se listov ne uporablja. Venčne liste ognjiča lahko uporabimo tudi namesto žafrana kot začimbo. Sicer pa lahko cvetove uporabimo sveže ali jih posušimo. Sveže se uporabljajo predvsem za izdelavo mazil in tinktur (Majes, 2011: 180).



Slika 6: Sveži ognjičevi cvetovi (levo) in nasad ognjiča (desno) (Majes, 2011).

Ognjičevo tinkturo običajno pripravljamo iz 70 % alkohola, lahko pa tudi iz 50 % alkohola, da se izločijo tudi vodotopne snovi (Slika 7). Notranje jo uporabljamo pri črevesnih in želodčnih boleznih, vnetju debelega črevesja in driski. Pospešuje nastanjanje žolča in odvaja vodo. Pomaga tudi pri blaženju težav v menopavzi in uravnava neredne in boleče menstruacije (Majes, 2011: 33). Zunanje pa jo uporabljamo kot obkladke pri gnojnih ranah, krčnih žilah (Wilfort, 1988: 206) in pri pretegnjenih mišicah, podplutbah, oteklinah ter zmečkaninah. Razredčeno jo priporočajo tudi za čiščenje obraza pri aknah (Majes, 2011: 33).

Ognjičevo mazilo se običajno pripravlja iz svinjske masti (Slika 7) (Wilfort, 1988: 206). Deluje proti aknam, opeklinam, ozeblinam, odrgninam, glivičnim obolenjem rok in nog,

suhi in vneti koži ter pospešuje krvni obtok in celjenje ran. Pomaga tudi pri celjenju brazgotin po operacijah, odstranjuje bradavice, kurja očesa, krčne žile in pomaga pri revmi, zvinih in pri pikih žuželk (Majes, 2011: 37). Ognjičevo mazilo je primerno tudi pri zdravljenju čirov, vnetnih oteklin in ran pri domačih živalih (Willfort, 1988: 207).



Slika 7: Priprava tinkture ognjiča iz cvetov in 50 % tropinovca (levo) ter izdelava ognjičevega mazila na osnovi svinjske masti (desno) (Majes, 2011).

Iz ognjiča lahko pripravimo tudi čaj, ki ga lahko pijemo pri želodčnih ali črevesnih težavah, driski in vnetju debelega črevesja. Z rednim pitjem lahko očisti kri in pomaga pri uravnavanju menstruacije in blaži bolečine (Willfort, 1988: 206). Ognjičeve cvetove se lahko dodajajo tudi v različne čajne mešanice z ostalimi zelišči za zdravljenje težav debelega črevesja, inkontinence, herpesa in blaženje epilepsije. Pripravimo lahko tudi ognjičev sirup, ki izboljša počutje in poveča imunsko odpornost (Majes, 2011: 43).

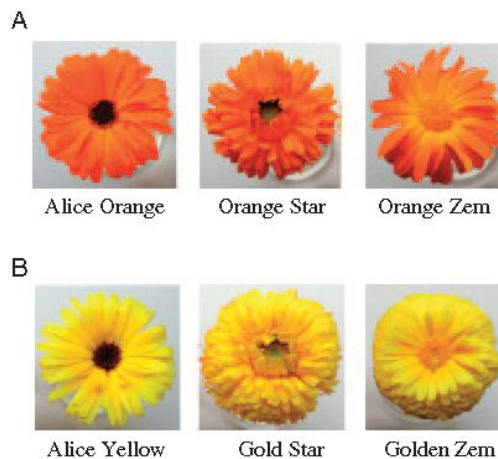
2.3.2 Znanstvene raziskave o ognjiču

Zaradi zdravilnih lastnosti ognjiča so se številni raziskovalci lotili različnih testiranj in znanstvenih poskusov, tako *in vivo* kot tudi *in vitro*, da bi lahko kvantitativno določili njegov učinek na različne živali in celice v različnih patoloških in fizioloških stanjih. Veliko raziskav se je osredotočilo na določitev količine in razmerij med aktivnimi snovmi, ki jih vsebuje ognjič. Druge pa so testirale različne možne pozitivne učinke, ki naj bi jih na organizem imel ognjič.

Biokemijske analize ognjičevih cvetov so pokazale, da vsebujejo karotenoide, flavonoide, terpenoide, saponine in eterična olja (Sausserde in sod., 2014; Hamburger in sod., 2003;

Neukirch in sod., 2004; Raal in Kirsipuu, 2011; Butnariu in Coradini, 2012; Pintea in sod., 2003; Kishimoto in sod., 2005; Četković in sod., 2003). Za takšno kvantitativno določanje sestavin so največkrat uporabili različne tipe kromatografij: tankoplastne kromatografije (TLC), nizekotlačne tekočinske kromatografije (LPLC) in visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC). Na ta način se sestavine med potekom metode ločijo, na podlagi že uveljavljenih standardov in literature pa lahko te sestavine tudi identificirajo. Pri večini teh raziskav so določili biokemijsko sestavo več različnih rastlin, ki so med sabo razlikovale bodisi po sorti bodisi po lokaciji rasti (Neukirch in sod., 2004; Raal in Kirsipuu, 2011; Butnariu in Coradini, 2012; Pintea in sod., 2003; Kishimoto in sod., 2005). Nekateri so uporabljali enake rastline, a so za ekstrakcijo uporabili različna topila (Butnariu in Coradini, 2012).

Pintea in sod. (2003) so pri HPLC analizi štirih različnih ognjičevih cvetov (dvoji oranžni, dvoji rumeni) našli naslednje karotenoide: α -karoten, β -karoten, γ -karoten, likopen, lutein, zeaksantin, neoksantin, luteoksantin, flavoksantin, rubiksantin, anteraksantin, mutatoksantin in laktukaksantin. Rezultati so pokazali, da vse štiri različice ognjičevih cvetov večinoma vsebujejo iste pigmente, se pa razlikujejo v razmerju med posameznimi pigmenti. Razmerja vseh pigmentov med posameznimi cvetovi so pokazala, da so oranžni cvetovi vsebovali več karotenov (likopen, γ -karoten, β -karoten in rubiksantin), medtem ko so rumeni cvetovi vsebovali več ksantofilov. S tem so uspeli dokazati, da je oranžna barva odvisna od količine karotenov. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Kishimoto in sod. (2005) (Slika 8).



Slika 8: Primeri različnih oranžnih in rumenih ognjičevih cvetov za kvantitativno analizo karotenoidov (Kishimoto in sod., 2005).

Raal in Kirsipuu (2011), Butnariu in Coradini (2012) ter Piccaglia in sod. (1997) so analizirali količino flavonoidov v ognjičevih cvetovih. Raal in Kirsipuu (2011) sta testirala 20 različnih vzorcev ognjičevih cvetov, katerih semena so izvirala iz Finske, Velike Britanije, Češke, Litve, Rusije, Poljske, Latvije in Estonije, vse rastline pa so bile vzgojene

v Estoniji. Cvetovi so se med sabo razlikovali po barvah in posledično so se razlikovali tudi po vsebnosti flavonoidov. Največjo vsebnost flavonoidov so vsebovali cvetovi Kablouna iz Finske, ki so bili rumene barve. Nekateri izmed vzorcev, ki so imeli visoko vsebnost flavonoidov, so imeli tudi višjo vsebnost karotenoidov, vendar med njimi ni bilo korelacije. Tako so dokazali, da se vsebnost flavonoidov razlikuje med posameznimi kraji, iz katerih izvirajo semena in da med barvo cvetov (torej vsebnostjo karotenoidov) in vsebnostjo flavonoidov ni povezave.

Butnariu in Coradini (2012) sta v svoji raziskavi o vsebnosti flavonoidov testirala dvoje različnih cvetov, ki so bili ekstrahirani s štirimi različnimi topili: 80 % metanolom, 96 % etanolom, 100 % izopropanolom in 60 % etanolom. Izkazalo se je, da se oboji cvetovi razlikujejo v vsebnosti flavonoidov in da je metanol bil bolj učinkovit pri ekstrahiranju flavonoidov.

Piccaglia in sod. (1997) so testirali ali čas nabiranja cvetov v obdobju cvetenja in vremenske razmere vplivajo na vsebnost flavonoidov in karotenoidov. Poskus je potekal dve leti. Med vzorci nabranimi v istem letu ni bilo velikih razlik v vsebnosti flavonoidov in karotenoidov. Nasprotno pa se je med vzorci za posamezno leto pokazala razlika v vsebnosti obeh snovi. Prvo leto so vzorci vsebovali več flavonoidov in manj karotenoidov, naslednje leto pa je bilo stanje obratno. To so pri analiziranju rezultatov tudi pričakovali, saj se je barva cvetov v teh dveh letih spremenila iz rumene v bolj oranžno. Glede vremenskih razmer pa se je pokazalo, da ni večjega vpliva na število cvetov na rastlini in tako je bil izkupiček posušenih in svežih cvetov v obeh letih bolj ali manj enak.

Ognjiču oz. ognjičevim ekstraktom so do zdaj uspeli dokazati: imunostimulatorno, protivnetno, protivirusno, genotoksično, antigenotoksično, protitumorsko, delovanje in celjenje ran.

Ukiya in sod. (2006) so izolirali 10 različnih triterpenov in 5 feronolov ter testirali njihovo protivnetno delovanje *in vivo* in protitumorsko delovanje *in vitro*. Vsi triterpenoidi so pokazali učinkovito protivnetno delovanje v edemu (vodenica) v mišjih ušesih, medtem ko so feronoli pokazali šibak inhibitorni učinek. Dva izmed triterpenov pa sta pokazala najučinkovitejše citotoksično delovanje proti rakavim celicam debelega črevesja, levkemiji in melanomskih celicah. Triterpeni so tako glavni razlog za citotoksičen učinek ognjičevih ekstraktov.

Preethi in sod. (2009) so prav tako testirali protivnetno delovanje ognjičevega etanolnega ekstrakta *in vivo*. Za povzročitev vnetja so uporabili karagenan in dekstran, oba pa povzročita edem oz. nabiranje tekočine na mestu vnetja. Ognjičev ekstrakt je znižal koncentracijo citokina interferona gama (IFN- γ) in inhibiral izražanje encima ciklooksigenaze 2 (Cox-2) ter tako zmanjšal vnetje.

Jiménez-Medina in sod. (2006) so ognjičeve cvetove najprej tretirali z laserjem valovne dolžine 650 nm, nato pa iz njih pripravili vodne ognjičeve ekstrakte (LACE). Ta ekstrakt so nato primerjali z vodnim ekstraktom brez laserskega tretiranja (CE), kateri izmed njiju je bolj učinkovit v protitumorskem delovanju proti različnim tumorskim celičnim linijam *in vitro*. Uporabili so celice mišjega melanoma, mišje fibrosarkome, človeškega melanoma, človeški rak dojke, človeški rak želodca, človeški rak prostate, človeški rak trebušne slinavke, človeški pljučni rak, človeški rak materničnega vratu, rak debelega črevesja in več vrst levkemij. Izkazalo se je, da je LACE pokazal učinkovito protitumorsko oz. protirakavo delovanje proti različnim tipom raka, ponekod je prišlo celo do 100 % inhibicije rasti. Poleg tega pa je šlo za nespecifičen učinek, torej je LACE deloval ne glede na tip tumorja. CE je po drugi strani prikazal šibko inhibitorno delovanje na rast tumorskih celic. Razlog za tako učinkovitost LACE se skriva v laserskem tretiranju cvetov, ki je povzročil konformacijske spremembe, aktivacijo ali razgradnjo različnih molekule, ki se nahajajo v cvetovih. Poleg tega pa so testirali še imunostimulatorno delovanje obeh ekstraktov, kjer so opazovali učinek na proliferacijo perifernih krvnih limfocitov (PBL) *in vitro*. Tu sta oba ekstrakta aktivirala limfocite in spodbudila njihovo proliferacijo. LACE pa je celo uspel ponovno aktivirati celični cikel limfocitov, tudi ko so že bili v mirovalnem stanju.

Kalvatchev in sod. (1997) so v svoji raziskavi testirali vpliv metanolnega in vodnega ognjičevega ekstrakta na človeški virus imunske pomanjkljivosti tipa 1 (HIV-1). Ugotovili so, da je metanolni ekstrakt v koncentracijah 10–30 µg/ml inhibiral pomnoževanje virusa v akutno okuženih limfocitih. Poleg tega je metanolni ekstrakt v koncentraciji 500 µg/ml uspešno zaščitil neokužene limfocite pred virusno fuzijo z že okuženimi celicami. Uspeli so tudi dokazati, da metanolni ekstrakt inhibira aktivnost virusnega encima reverzne transkriptaze, medtem ko vodni ekstrakt učinka ni pokazal.

V raziskavi Pérez-Carreón in sod. (2002) pa so dokazali, da lahko vodni in vodni-etanolni ekstrakti ognjiča v koncentracijah 0,2–50 ng/ml zaščitijo celice pred genotoksičnimi poškodbami karcinogena dietilnitrozamina (DEN). Predvidevajo, da so flavonoli tisti, ki imajo to zaščitno vlogo. Hkrati pa so tudi dokazali, da pri tisočkrat višjih koncentracijah (50–100 µg/ml) ekstraktov sami povzročajo genotoksičnost, kjer so razlog ravno tako flavonoli, vendar ne izključujejo sinergističnega ali antagonističnega delovanja flavonolov z drugimi komponentami v ekstraktih.

Parente in sod. (2012), Hadfield in sod. (2008) ter Fronza in sod. (2009) so raziskovali vpliv ognjičevih ekstraktov na celjenje ran, pri čemer so vsi dokazali pozitivne učinke. Pri raziskavi Fronza in sod. (2009) je šlo za testiranje heksanskega in etanolnega ognjičevega ekstrakta *in vitro*, kjer so uporabili metodo praske. Fibroblaste so v 24-lukenjski plošči gojili toliko časa, da so ustvarile skoraj popolnoma konfluenten enosloj. S sterilnim 100 µl nastavkom za pipete so podrgnili po dnu luknjice v eni ravni liniji in opazovali migracijo

celic v »rano«. Pri tem se je najbolje izkazal heksanski ekstrakt, ki je spodbudil migracijo in proliferacijo fibroblastov. Z nadaljnjimi poskusi so dokazali, da so za stimulacijo migracije in proliferacije celic v testu prakse odgovorni triterpeni, katerim je bila že dokazano tudi protivnetno delovanje.

Pri raziskavi Parente in sod. (2012) so opravili *in vivo* poskus o vplivu etanolnega ekstrakta na celjenje kožnih ran pri podganah, pri čemer so uporabili makroskopske, morfometrične, histopatološke in imunohistokemijske analize. Dokazali so, da ognjičev ekstrakt spodbuja razraščanje fibroznega tkiva (fibroplazija) in angiogenezo.

Hadfield in sod. (2008) pa so na ljudeh testirali in opazovali celjenje različnih kožnih ran in obolenj s pomočjo različnih past, ki so vsebovale ognjičev ekstrakt. Opazovali so protivirusno delovanje ekstrakta pri bradavicah, protiglivično delovanje na nohtih, protivnetno delovanje in sposobnost odpravljanja močno poroženele kože. Pri vseh oblikah ran in obolenj so opazili pozitivne učinke in ponekod celo popolno okrevanje. Zdravljenje z ognjičem tako omogoča neinvazivno in učinkovito odpravljanje različnih, sicer težko in počasi ozdravljivih kožnih ran.

Največ raziskav se je osredotočilo na antioksidativno delovanje ognjičevih ekstraktov, saj imajo zaradi svoje sestave flavonoidov in karatenoidov velik potencial pri učinkovitem odpravljanju in zaščiti pred oksidativnim stresom (Butnariu in Coradini, 2012; Četković in sod., 2003; Preethis in sod., 2006; Frankič in sod., 2008; Četković in sod., 2004; Gong in sod., 2012; Sabir in sod., 2015; Alnuqaydan in sod., 2015). Le pri raziskavi Milliauskas in sod. (2004) je ognjičev ekstrakt pokazal šibek antioksidativni učinek.

Tudi pri teh raziskavah se za določanje vsebnosti vseh flavonoidov, fenolov in ostalih fenolnih spojin uporablja HPLC. Za merjenje antioksidativnega učinka pa se uporabljajo metode lovljenja prostih radikalov DPPH (difetil pikrihidrazil), ABTS (azino etilbenzotiazolin sulfonska kislina) in FRAP (reduciranje železovega iona).

Princip teh raziskav je povsod približno enak in tudi rezultati nakazujejo, da je antioksidativna lastnost ekstraktov odvisna od količine vsebovanih fenolnih spojin. Razlikujejo se večinoma le po uporabi različnih topil za ekstrakcijo, pri čemer so rezultati pokazali, da topilo dokazano vpliva na vsebnost fenolnih spojin, saj topila različno ekstrahirajo snovi iz rastlinskega materiala (Butnariu in Coradini, 2012; Četković in sod., 2003, 2004; Gong in sod., 2012). To so Sultana in sod. (2009) dokazali tudi pri ekstraktih drugih zdravih rastlin.

V raziskavi Sabir in sod. (2015) so primerjali antioksidativno delovanje ognjičevega ekstrakta iz cvetov in ekstrakta iz listov. Dokazali so, da cvetovi vsebujejo več fenolnih spojin kot listi in imajo zato boljšo antioksidativno delovanje.

Ćetković in sod. (2004) pa so primerjali antioksidativne učinke med ekstraktom gojenega ognjiča in ekstraktom ognjiča najdenega v naravi. Rezultati so pokazali, da imata tako metanolni kot vodni ekstrakt gojenega ognjiča večjo sposobnost lovljenja prostih radikalov kot pa ekstrakta ognjiča iz narave v obeh topilih.

Alnuqaydan in sod. (2015) so v svoji raziskavi testirali zaščitno antioksidativno delovanje vodno-etanolnega ognjičevega ekstrakta *in vitro*. Človeške kožne celice so za dalj časa izpostavili ekstraktu, nato pa so jih za krajši čas tretirali s H₂O₂, s katerim so izzvali oksidativni stres. Koncentracije višje od 1760 µg/ml so uspele zaščititi celice pred odmrtnjem, pri daljših časovnih izpostavitvah ekstrakta pa so pred oksidativnim stresom zaščitno omogočile tudi nižje koncentracije.

Fonseca in sod. (2010; 2011) pa so testirali delovanje vodno-etanolnega ognjičevega ekstrakta pri preprečevanju poškodb na koži, ki so bile posledica oksidativnega stresa zaradi ultravijoličnega (UV) sevanja. V raziskavi Fonseca in sod. (2010) so pri testu *in vivo* miške oralno zaužile ekstrakt, medtem ko so pri raziskavi Fonseca in sod. (2011) ekstrakt nanесли topikalno na kožo. Fonseca in sod. (2010) so v svoji raziskavi dokazali, da ognjičev ekstrakt učinkovito preprečuje zmanjšanje glutationa kot posledica UVB sevanja in lovi proste radikale. Hkrati pa so s testom *in vitro* uspeli dokazati, da nizke koncentracije ekstraktov pozitivno delujejo na zdrave celice, medtem ko višje koncentracije kažejo citotoksičen učinek tako na zdrave kot na tumorske celice. V raziskavi Fonseca in sod. (2011) so testirali različne pripravke z ekstraktom za topikalni nanos na kožo mišk za preprečitev in zdravljenje poškodb zaradi UVB sevanja. Pripravek v obliki gela je bil najbolj učinkovit pri dostavi ekstrakta v epidermis, kjer je ekstrakt lahko vzdrževal nivo glutationa. Poleg tega pa je gel z ekstraktom tudi uspel preprečiti tvorbo poškodb zaradi UVB sevanja.

Ognjičevi ekstrakti kažejo velik potencial za uporabo ne samo v kozmetiki, ampak tudi v prehrani živali in morda tudi ljudi kot naravno dopolnilo za izboljšanje odpornosti in kot učinkovito naravno zdravilo. Vendar pa so za tovrstno uporabo potrebne toksikološke študije, ki pa jih na področju ognjiča zaenkrat še primanjkuje. Iz tradicije zdravilstva sicer vemo, da je uporaba ognjiča varna, kar pa je potrebno dokazati tudi znanstveno. Večina tovrstnih študij je pravzaprav opravljenih sočasno z drugimi poskusi, kjer na primer poleg protivnetnega učinka testirajo še citotoksičnost. Na tem področju že obstajajo dokazi, da je citotoksičnost ognjičevih ekstraktov odvisna od koncentracije. Sicer pa dosedanje študije *in vivo* kažejo, da ekstrakti ognjiča ne povzročajo poškodb, stranskih učinkov ali smrti. Primer take študije je raziskava Silva in sod. (2007), kjer ne akutni ne subakutni odmerki niso pokazali negativnih učinkov na podganah. Opazili so le povečano količino alinin aminotransferaze in dušika iz uree v krvi ter več histoloških sprememb na jetrih, kar lahko

nakazuje na preobremenjenost ledvic in jeter. Hepatotoksičen učinek bi lahko sicer nastal zaradi flavonoidov v ekstraktu, saj imajo lahko tudi prooksidativne lastnosti.

Eden izmed možnih negativnih učinkov ognjiča so alergične reakcije za tiste ljudi, ki so občutljivi na katerokoli rastlino iz družine Asteraceae oz. Compositae. Wintzen in sod. (2003) opisujejo klinični primer alergije na to družino.

V zadnjem času, ko so nekateri učinki ognjiča že dobro raziskani, se pojavljajo nove študije in raziskave o načinu dostave zdravilnih učinkovin ognjiča pri zdravljenju različnih bolezni. Tak primer je raziskava Arana in sod. (2015), kjer so testirali različne velikosti, morfologije in termalne lastnosti nanodelcev za bolj učinkovito dostavo sestavin ognjičevega ekstrakta. Na ta način bi lahko dostavili tudi v vodi netopne snovi npr. faradiole, na očesno površino. Tako bi lahko olajšali draženje pri suhih očeh in pozdravili blefaritis (vnetje očesne veke). Rezultati raziskave so bili pozitivni in kažejo, da bi nanodelci lahko postali učinkovit dostavni sistem sestavin ognjičevega ekstrakta.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 CELIČNA LINIJA HD11

Trajna celična linija HD11 je nastala s transformacijo kokošjih hematopoetskih celic s kokošjim virusom levkemije MC29. Gre za celice, ki so morfološko podobne kokošjim makrofagom, so sposobni fagocitirati in na površini izražajo antigene makrofagov (Beug in sod., 1979).

Za gojenje celic HD11 smo uporabljali gojišče RPMI-1640 z dodatki serumov in antibiotika. Osnovno RPMI-1640 gojišče (R8755, Sigma Aldrich) smo pripravili po navodilih proizvajalca, le da smo najprej v MilliQ vodi raztopili natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3 , 1411006, Kemika Zagreb) in šele nato raztopili gojišče RPMI. Pripravljeno gojišče smo nato sterilno filtrirali s filtrom (Acrocap Filter Unit, 4480, Pall Life Sciences) in ga do uporabe shranili v hladilniku.

Pripravili smo dve različni gojišči RPMI-1640 z dodatki. Gojišče G1 je vsebovalo 10 % seruma, od tega je 8 % predstavljal goveji Fetal Bovine Serum – FBS (Fetal Clone II Hyclone, SH30066-03, Thermo Scientific), 2 % pa kokošji Chicken Serum – CS (C5405, Sigma Aldrich). Poleg serumov je gojišče G1 vsebovalo še 0,1 % antibiotika gentamicin (Garamycin, 40mg/ml, A58633, Krka). Gojišče G2 pa je vsebovalo 7 % seruma, od tega 5 % FBS in 2 % CS ter ravno tako 0,1 % antibiotika gentamicin.

Celice HD11 so bile shranjene v tekočem dušiku na $-196\text{ }^\circ\text{C}$, zato smo jih morali najprej odmrzniti. To smo storili tako, da smo iz kriogenske posode vzeli zamrzovalno vialo in jo čim hitreje segreli na $37\text{ }^\circ\text{C}$ v vodni kopeli. Ko se je vsebina viala odtalila, smo celotni volumen 1 ml hitro odpipetirali v 5 ml svežega predhodno ogretega gojišča RPMI-1640 brez dodatkov. Na ta način smo razredčili krioprotektant DMSO in tako preprečili, da bi po odtajanju poškodoval celice. Nato je sledilo centrifugiranje celic 10 min na 900 obr/min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in nato celice dobro resuspendirali v 10 ml gojišča G1 (RPMI-1640, 8 % FBS, 2 % CS, 0,1 % gentamicin). Celice smo nato prestavili v 250 ml oz. 75 cm^2 gojitveno posodo in postavili v celični inkubator na $37\text{ }^\circ\text{C}$ in 5 % CO_2 atmosfero.

Kokošji makrofagi HD11 so semi-adherentna trajna celična linija z zmerno hitro rastjo in jih je potrebno presaditi, ko dosežejo 80-85 % konfluenost. To smo storili približno enkrat na teden, in sicer tako, da smo celice najprej postrgali z dna gojitvene posode s strgalko (TPPA99002, VWR). Nato smo jih prestavili v plastično epruveto in centrifugirali 10 min na 900 obr/min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in celice dobro resuspendirali v 4 ml G1 gojišča. Četrtno celic smo nato prestavili v novo 250 ml gojitveno posodo in dodali G1 gojišče do skupnega volumna 10 ml. Preostanek celic smo

zavrgli. Novo pasažo celic smo nato pustili v celičnem inkubatorju na ter ji po dveh ali treh dneh zamenjali gojišče. Po petih ali šestih dneh oz. ko so celice ponovno dosegle 80–85 % konfluentnost, smo postopek presajanja celic ponovili.

Pri poskusih pasaža celic ni bila pomembna, saj se celice HD11 skozi pasaže morfološko ne spreminjajo in le-ta ne vpliva na fiziološko stanje celic. V kolikor smo s poskusi začasno prenehali in celic nekaj časa nismo potrebovali, smo prekinili z gojenjem in ob začetku poskusa odtalili nove celice po prej opisanem postopku. Vsakič, ko smo celice odtalili, smo jih najprej gojili do IV. pasaže in jih šele nato uporabili za poskus, da so se celice imele čas stabilizirati.

Za gojenje celic smo uporabili standardno laboratorijsko opremo: celični inkubator (Sanyo) s pogoji gojenja 37 °C in 5 % CO₂ atmosfero in brezprašno komoro (Telstar Biostar). V postopkih presajanja smo uporabili še vodno kopel (Kambič) in centrifugo (Centric322A, Tehnica). Gojišča, pufre in fluorescentna barvila smo shranjevali v hladilniku, ekstrakte pa v zamrzovalniku.

3.2 OGNJIČEV EKSTRAKT

Pri poskusih smo uporabili dva 25 % ognjičeva ekstrakta v različnih topilih: ognjičev etanolni ekstrakt (OEE) in ognjičev propilen-glikolski ekstrakt (OPGE). Ekstrakta sta bila pripravljena na Katedri za prehrano na Oddelku za zootehniko na Rodici, Biotehniška fakulteta. Ekstrakt oz. tinkturo ognjiča je po literaturi o tradicionalni medicini (Müller in Hildebrand, 1998) pripravil prof. dr. Karl Salobir. Zmleti cvetni lističi oz. celi cvetovi so bili namočeni v topilu v razmerju 1 : 4 (200 g rastline in 800 g topila). Uporabljeni sta bili dve topili, 70 % etanol (EtOH) in 50 % propilen-glikol (PG). Ekstrakcija je potekala 18 dni v zaprti stekleni posodi v temi, vsebina pa je bila med tem večkrat premešana brez odpiranja posode.

Za povzročitev oksidativnega stresa smo uporabili 30 % H₂O₂ (K40128210 918, Merck KGaA). V poskusih smo uporabili tudi filtriran (0,22 µm, 5045013, Sartorius) 1x PBS puffer (z dodatkom 0,1% gentamicina) za zapolnitev praznih ali že testiranih luknjic na bodisi 96-lukenjski mikrotitrski plošči bodisi na 24-gojitveni plošči.

3.3. ŠTETJE CELIC HD11

3.3.1 Štetje z Neubauerjevimi števničnimi komorami

Celice smo s strgalko postrgali z dna gojitvene plošče jih dobro resuspendirali. Nato smo iz luknje vzeli 20 µl vzorca in mu dodali barvilo Tripan modro (0,4 % v/v, T8154, Sigma Aldrich) v razmerju 1:1. Pri tem barvilu se modro obarvajo le mrtve celice, saj imajo le-te

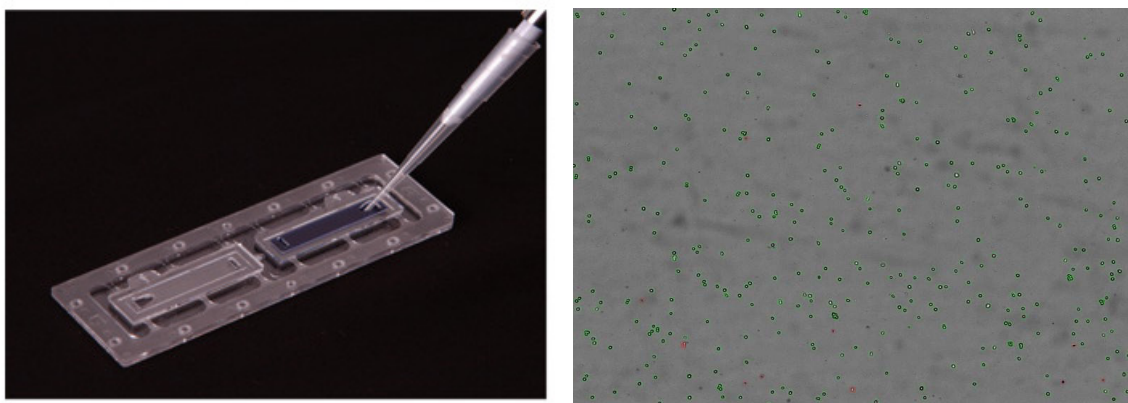
poškodovano membrano skozi katero lahko Tripan modro preide v citoplazmo in jo obarva. Pri živih celicah je membrana stabilna in nepoškodovana, zato barvilo ne more preiti v citoplazmo. Posledično lahko pod vidno svetlobo vidimo bele žive celice in modre mrtve celice (Mascotti in sod., 2000). Za štetje smo uporabili filtrirano barvilo Tripan modro, saj se v njem lahko ob daljšem shranjevanju začnejo tvoriti kristali. Števno komoro smo prenesli pod mikroskop in prešteli tako žive kot tudi mrtve celice v vseh štirih kvadratih števne komore.

3.3.2 Štetje v mikrotitrski plošči pod mikroskopom

Vsakemu vzorcu v 96-lukenjski mikrotitrski plošči smo dodali 25 μ l barvila Tripan modro in inkubirali 5 min. Nato smo odsesali celoten volumen vsake luknjice v plošči in dodali 100 μ l 1x PBS pufra z 0,1 % gentamicinom. Gojitveno ploščo smo postavili pod mikroskop in ročno prešteli vzorce. V vsaki luknjici smo prešteli celice v 3 vidnih poljih.

3.3.3 Štetje s polavtomatskim celičnim števcem LUNA-FL™

Polavtomatski celični števec LUNA-FL™ (Logos Biosystems) je naprava, ki omogoča štetje celic pod vidno in fluorescenčno svetlobo ter prilagoditev parametrov štetja (velikost celic, oblika celic, jakost oddajanja svetlobe ...) posamezni celični liniji. Pri štetju celic se uporabljajo posebne števne ploščice za enkratno uporabo, namenjene posebej za to napravo. Le-te se ločijo med sabo po tem, pod katero svetlobo štejemo celice. Tako imamo števne ploščice za vidno svetlobo (Logos Biosystems, L12001) in za fluorescenčno svetlobo (PhotonSlide, Logos Biosystems, L12005). Za štetje vzorcev smo celice s strgalko postrgali z dna luknjice v gojitveni plošči in jih dobro resuspendirali. Nato smo vzeli 10 μ l vzorca in mu dodali 10 μ l barvila Tripan modro. V števno ploščico (Slika 9, levo) smo nato odpipetirali 10 μ l mešanice barvila in celic ter jo vstavili v režo na napravi.



Slika 9: Števna ploščica za vidno svetlobo za štetje s celičnim števcem LUNA-FL™ (levo, Luna Bright Field ..., 2014) in slika vzorca (desno) pridobljena z LUNA-FL™, obarvan z barvilom Tripan modro in označenimi živimi celicami (obarvane zeleno) ter mrtvimi celicami (obarvane rdeče).

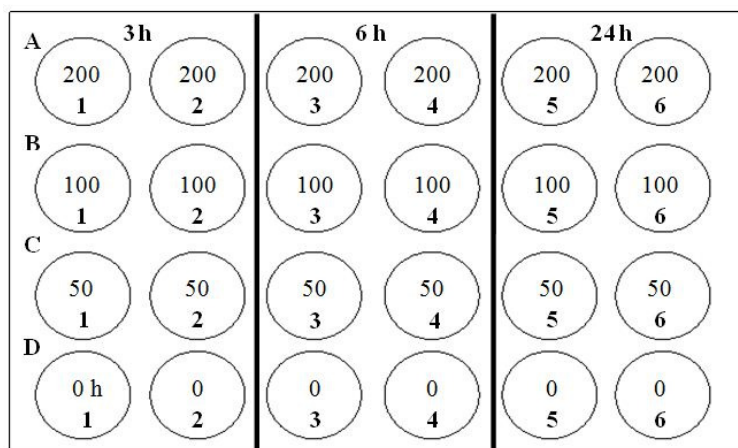
Naprava nam za vsak vzorec poda že preračunano koncentracijo vseh celic ter koncentracijo živih in mrtvih celic. Hkrati pa nam poda še viabilnost in povprečno velikost celic ter omogoča vizualni vpogled v vzorec (Slika 9, desno).

3.3.3.1 Primerjava dveh različnih barvil za štetje z avtomatskim celičnim števcem LUNA-FL™

Preden smo se lotili preliminarnih poskusov, smo želeli preveriti natančnost posamezne metode štetja z različnimi barvili in ali prihaja med njima do razlik oz. odstopanj v rezultatih. Celice smo najprej tretirali z različnimi koncentracijami H_2O_2 , nato pa prešteli s pomočjo LUNA-FL™. Celice smo tretirali s H_2O_2 , ker smo želeli v vzorcih dobiti žive in mrtve celice in bi tako lažje videli razliko med barvili. Primerjali smo štetje pod vidno svetlobo z barvilom Tripan modro in štetje pod fluorescenčno svetlobo s kompletom dveh fluorescentnih barvil: akridin oranžno in propidijev jodid (AO/PI, F23001, Logos Biosystems) (Slika 11). AO prehaja skozi membrano in se nato veže na nukleinske kisline v živih celicah, zaradi česar začne fluorescirati zeleno svetlobo. PI pa lahko prehaja samo skozi poškodovano membrano in se v mrtvih celicah veže na DNK ali RNK ter tako začne fluorescirati oranžno oz. rdečo svetlobo (Mascotti in sod., 2000).

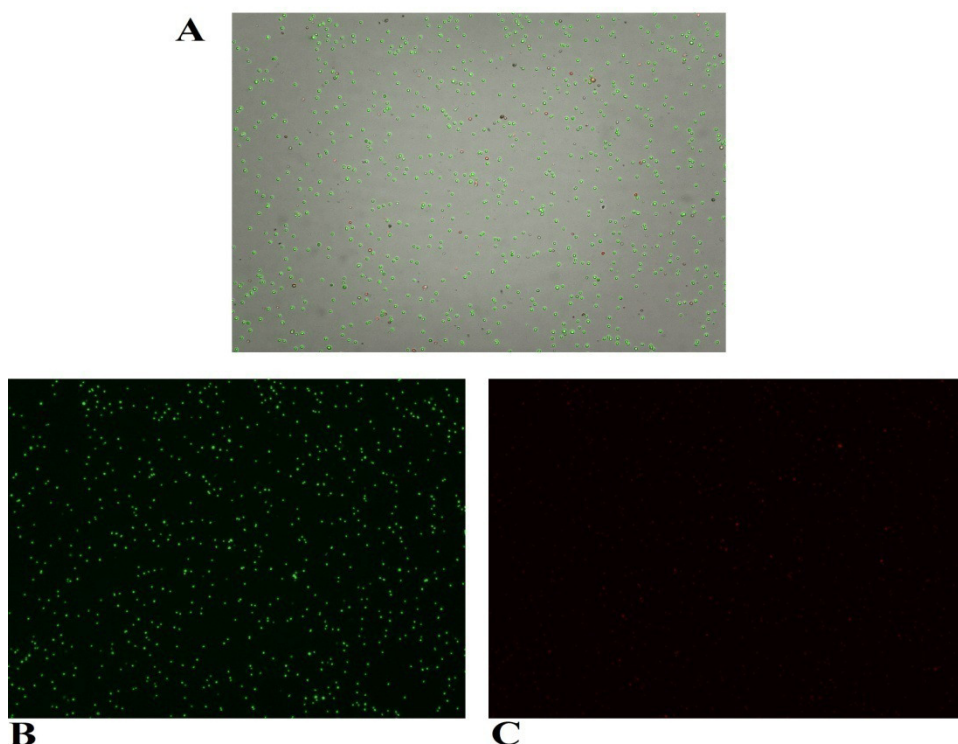
Pripravili smo tri 24-lukenjske mikrotitrne plošče (tri ponovitve poskusa), v katere smo nasadili 2×10^5 celic na luknjico. Volumen ene luknjice je znašal 1 ml, uporabili pa smo gojišče G1. Plošče smo nato prestavili v celični inkubator ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2), kjer smo jih pustili tri dni, da so se celice pritrdile na dno in stabilizirale.

Po inkubaciji smo pripravili založne raztopine H_2O_2 , kjer smo za redčenje uporabili osnovno gojišče RPMI-1640. Končne koncentracije so bile tako $50\text{ }\mu\text{M}$, $100\text{ }\mu\text{M}$ in $200\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 , celice pa smo tretirali za 3 h, 6 h in 24 h. Razporeditev vzorcev na ploščah je prikazana na sliki 10.



Slika 10: Razporeditev vzorcev na 24-lukenjski gojitveni plošči. Koncentracije H_2O_2 so podane v μM . Luknjica D1 je služila kot kontrola stanja celic pred tretiranjem s H_2O_2 .

Ko se je določen čas tretiranja iztekkel, smo celice najprej postrgali z dna luknjice s strgalko in nato dobro resuspendirali. Iz vsake luknje smo vzeli dva vzorca celic: 20 μ l in 18 μ l. Prvemu smo dodali 20 μ l Tripan modrega (razmerje 1:1) in drugemu 2 μ l AO/PI. Oba vzorca smo nato nanegli na ustrezno števno ploščico in vstavili v celični števec LUNA-FL™ (Slika 11). Ker smo ploščo s celicami inkubirali naprej do naslednje časovne točke, smo vsebino že testiranih luknjic odstranili in jo zamenjali z enakim volumnom (1 ml) 1x PBS z 0,1 % gentamicinom in tako preprečili morebitne okužbe do konca poskusa.

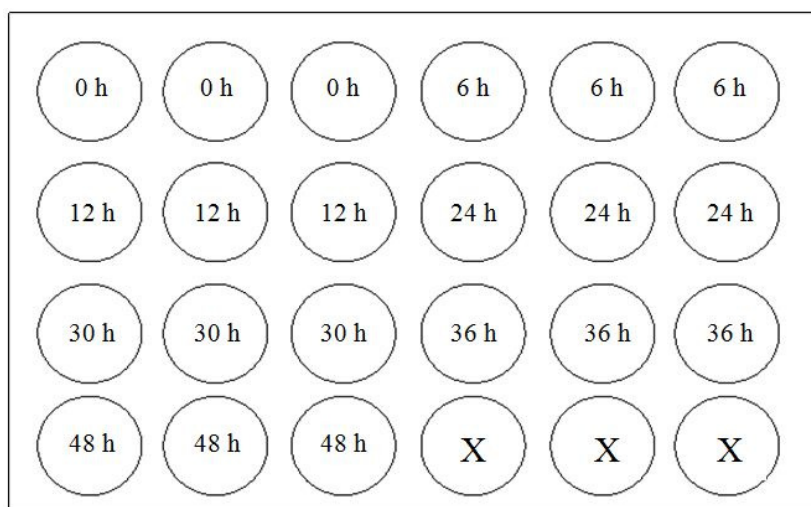


Slika 11: Primer štetja vzorca s celičnim števcem LUNA-FL™ pod fluorescenčno svetlobo z barvili AO/PI. (A) Vzorec s celicami pod vidno svetlobo z označenimi živimi (obarvane zeleno) in mrtvimi celicami (obarvane rdeče). (B) Žive celice vidne pod zeleno fluorescenčno svetlobo. (C) Mrtve celice vidne pod rdečo fluorescentno svetlobo.

Glede na rezultate tega poskusa smo se odločili, da za nadaljnje poskuse uporabimo barvilo Tripan modro.

3.4 RASTNA DINAMIKA KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11

Preden smo se lotili poskusov, smo najprej določili rastno dinamiko celic HD11, na podlagi katere smo nato lahko izračunali podvojitveni čas celic. Pripravili smo tri 24-lukenjske gojitvene plošče, v katere smo v vsako luknjico nasadili 1×10^5 celic v gojišču G1 (volumen ene luknje je bil 1 ml) in jih pustili čez noč v celičnem inkubatorju, da so se pritrdirile na dno. Razpored vzorcev na ploščah je prikazan na sliki 12.



Slika 12: Razporeditev vzorcev na 24-lukenski gojitveni plošči za štetje celic za rastno dinamiko – tri ponovitve za vsako časovno točko. Luknjice označene s simbolom »X« so vsebovale samo 1x PBS pufer, brez celic. Vse tri mikrotitrne plošče so imele enako razporeditev.

Po inkubaciji preko noči smo celicam zamenjali gojišče in jih nato prešteli z Neubauerjevimi števnimi komorami (Poglavje 3.3.1). Iz pridobljenih podatkov smo najprej izračunali viabilnost nato pa še koncentracijo celic v luknjici.

Viabilnost smo izračunali po naslednji formuli:

$$Viabilnost = \frac{\text{povprečje živih celic v števnih komorah}}{\text{povprečje vseh celic v števnih komorah}} \times 100 \% \quad \dots (1)$$

Izračunali smo koncentracijo živih oz. mrtvih celic:

$$Konc. \text{ živih celic} = \text{povprečje živih celic v števnih komorah} \times \text{redč. faktor} \times 10^4 \frac{\text{celic}}{\text{ml}} \quad \dots (2)$$

$$Konc. \text{ mrtvih celic} = \text{povp. mrtvih celic v števnih komorah} \times \text{redč. faktor} \times 10^4 \frac{\text{celic}}{\text{ml}} \quad \dots (3)$$

Prvo ploščo smo pričeli šteti 24 h po nasaditvi, drugo ploščo 48 h po nasaditvi, tretjo ploščo pa 72 h po nasaditvi. Tako smo dobili podatke o rastni dinamiki celic HD11, ki je, od nasaditve celic na ploščo, trajala 96 h.

Za izračun podvojitvenega časa t_{gen} smo najprej morali izračunati konstanto hitrosti rasti μ :

$$\mu = \frac{(\log X_2 - \log X_1)}{0,301 \times t}, \quad \dots (4)$$

$$t_{gen} = \frac{1}{\mu}, \quad \dots (5)$$

kjer X_1 predstavlja koncentracijo celic na začetku eksponentne faze rasti, X_2 koncentracijo celic na koncu eksponentne faze rasti, t pa je čas med tema dvema točkama.

3.5 VPLIV H_2O_2 NA VIABILNOST KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11

3.5.1 Določanje orientacijskih vrednosti koncentracij H_2O_2

S pomočjo literature smo določili več različnih koncentracij in časovnih izpostavitvev, katerim smo želeli preveriti njihovo delovanje na viabilnost celic HD11. S tem poskusom smo želeli določiti tako koncentracijo H_2O_2 , ki bi celicam povzročila srednje močan stres, vendar ne bi vse odmrle.

Tako smo testirali vpliv sedmih koncentracij H_2O_2 (3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M in 200 μ M) ter pet časovnih izpostavitvev (3 h, 6 h, 24 h, 48 h in 72 h) na viabilnost celic HD11. Vsak vzorec je imel vsaj tri ponovitve, za štetje celic pa smo uporabili metodo štetja pod mikroskopom (Poglavje 3.3.2).

Pripravili smo eno 96-lukenjsko mikrotitrsko ploščo in nanjo nasadili 1×10^3 celic na luknjico, volumen ene luknjice pa je bil 100 μ l. Celice so bile nasajene v gojišču G2, saj je poskus trajal več dni in smo hoteli nekoliko upočasniti rast celic, saj bi se sicer proti koncu poskusa celice začele preraščati, kar bi onemogočilo zanesljivo štetje pod mikroskopom. Po nasaditvi smo celice prestavili v celični inkubator in pustili čez noč, da so se pritrdile na dno. Naslednji dan smo pripravili založne raztopine H_2O_2 , pri čemer smo za redčenje uporabili osnovno gojišče RPMI-1640. Po tretiranju celic s H_2O_2 smo jih prestavili v celični inkubator. Ko je določen čas tretiranja potekel, smo vzorce prešteli in na podlagi pridobljenih podatkov izračunali povprečni delež živih in povprečni delež mrtvih celic v vsaki luknjici.

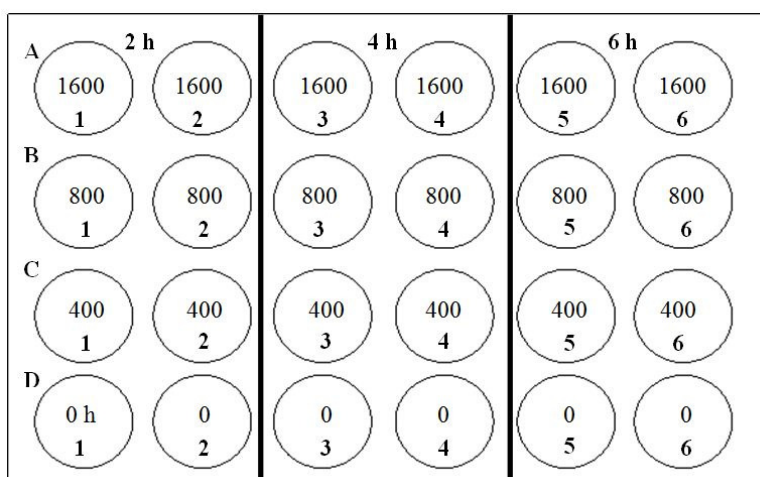
3.5.2 Preliminarni poskus viabilnosti celic HD11 tretirane s H_2O_2

V optimizacijskih poskusih (Poglavje 3.5.1) smo uspeli določiti razpon koncentracij H_2O_2 in ekstraktov, ki jih smo jih nameravali uporabiti za glavni poskus o antioksidativnem delovanju ekstraktov. Metoda ročnega štetja pod mikroskopom nam je sicer omogočila uporabo 96-lukenjske mikrotitrsko plošče in s tem testiranje več vzorcev hkrati, vendar se je sama metoda štetja izkazala za precej dolgotrajno. Poleg tega je potrebno upoštevati še dejavnik subjektivnosti pri štetju in posledično možnost napak. Največja težava se je pojavila kasneje v poskusih. Namreč celice HD11 rastejo v skupkih in se podvojujejo (začnejo rasti eno čez drugo, v več plasti) tudi, ko že dosežejo 100 % konfluentnost. V takem vzorcu pa je težko natančno določiti število živih in število mrtvih celic. Zato smo se za preliminarne in glavne poskuse o viabilnosti odločili uporabiti novo metodo štetja: štetje s polavtomatskim števcem LUNA-FL™ (Poglavje 3.3.3).

Tovrstna metoda štetja je sicer zahtevala uporabo 24-lukenjske gojitvene plošče, saj iz majhnih luknjic, ki so na 96-lukenjski mikrotitrski plošči celic, ne bi mogli postrgati z dna za odvzem vzorca. S tem smo bili nekoliko omejeni, kar se tiče količine in ponovitev vzorcev, vendar so vseeno prevladale druge prednosti uporabe naprave LUNA-FL™: natančnost in zanesljivost štetja, prilagoditev parametrov štetja, objektivnost, hitro štetje in vpogled v vsak preštet vzorec.

Pripravili smo tri 24-lukenjske gojitvene plošče (tri ponovitve poskusa) v katere smo nasadili 1×10^5 celic na luknjico v gojišču G1. Plošče smo nato za tri dni prestavili v celični inkubator.

Nato smo pripravili založne raztopine H_2O_2 , kjer smo za pripravo razredčitev uporabili osnovno gojišče RPMI-1640. Končne koncentracije H_2O_2 so bile 400 μM , 800 μM in 1600 μM , celice pa smo tretirali za 2 h, 4 h in 6 h. Na sliki 13 je prikazana razporeditev vzorcev.



Slika 13: Razporeditev vzorcev na 24-lukenjski gojitveni plošči. Koncentracije H_2O_2 so podane v μM . Luknjica D1 je služila kot kontrola stanja celic pred tretiranjem s H_2O_2 .

Ko je določen čas tretiranja potekel, smo celice prešteli s celičnim števcom LUNA™ (Poglavje 3.3.3).

3.6 VPLIV OGNJIČEVEGA EKSTRAKTA NA VIABILNOST KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11

3.6.1 Določanje orientacijskih vrednosti koncentracij ognjičevega ekstrakta

Opazovali smo vpliv ognjičevih ekstraktov, OPGE in OEE, ter njihovih topil, PG in EtOH, na viabilnost celic HD11. Uporabili smo 5 različnih koncentracij vsakega ekstrakta (12,5 $\mu g/ml$, 25 $\mu g/ml$, 50 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$ in 200 $\mu g/ml$) in 5 primerljivih oz. ustreznih

koncentracij vsakega topila. Koncentracije topil so bile sledeče: 0,263 $\mu\text{l/ml}$, 0,525 $\mu\text{l/ml}$, 1,05 $\mu\text{l/ml}$, 2,10 $\mu\text{l/ml}$ in 4,20 $\mu\text{l/ml}$, vendar jih bomo zaradi preglednosti in lažje primerjave označevali z istimi vrednostmi in enotami kot pri ekstraktih. Za redčenje smo uporabili osnovno gojišče RPMI-1640. Celice smo z ekstrakti in topili tretirali 24 h, 48 h, 72 h in 96 h. Vsak vzorec je imel vsaj tri ponovitve. Vsak ekstrakt in vsako topilo smo testirali na svoji 96-lukenjski mikrotitrski plošči, tako da smo za poskus potrebovali štiri plošče.

Postopek nasaditve celic v 96-lukenjsko mikrotitrsko ploščo, priprave založnih raztopin, tretiranja in štetja celic je enak kot pri določanju orientacijskih vrednosti koncentracij H_2O_2 (Poglavje 3.5.1).

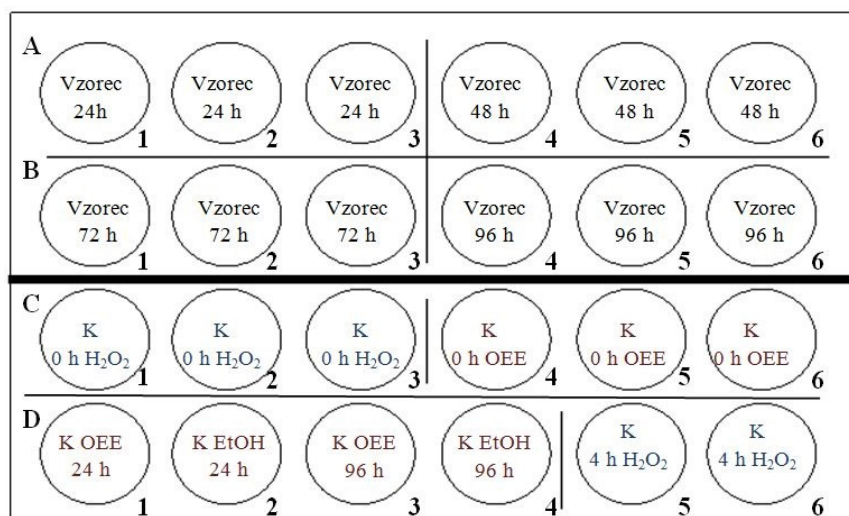
3.6.2 Preliminarni poskus viabilnosti celic HD11 tretirane z OEE

Pripravili smo šest 24-lukenjskih gojitvenih plošč (3 za poskus z ekstraktom in 3 za poskus s topilom), v katere smo nasadili 2×10^5 celic na luknjo v gojišču G1. Plošče smo predstavili v celični inkubator za tri dni, nato pa smo jih tretirali z OEE in EtOH.

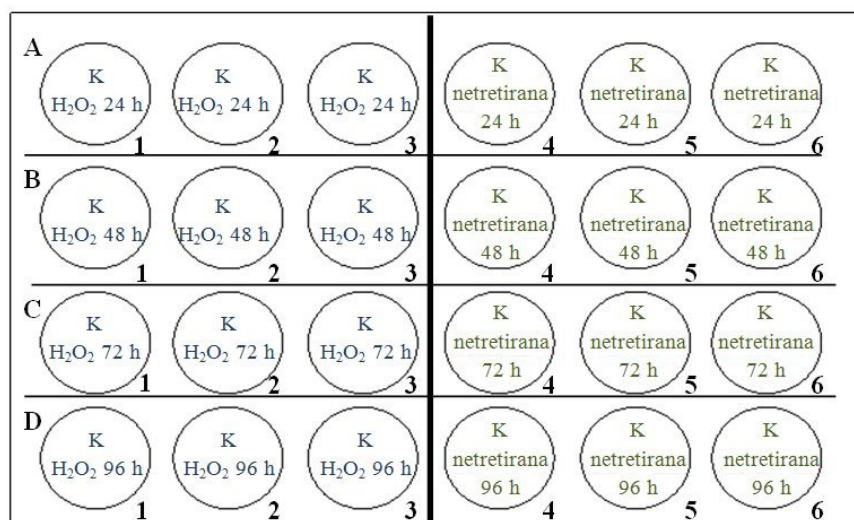
Po inkubaciji smo pripravili založne raztopine OEE in EtOH, kjer smo za redčenje uporabili osnovno gojišče RPMI-1640. Končne koncentracije OEE in EtOH so bile 400 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$ in 1600 $\mu\text{g/ml}$, celice pa smo tretirali za 24 h, 48 h in 72 h. Razporeditev vzorcev je bila enaka kot pri preliminarnem poskusu s H_2O_2 (Poglavje 3.5.2, Slika 13), kar velja tudi za štetje vzorcev.

3.7 POPRAVLJALNO DELOVANJE ETANOLNEGA OGNJIČEVEGA EKSTRAKTA NA VIABILNOST CELIC HD11 PO POVZROČITVI OKSIDATIVNEGA STRESA S H_2O_2

Ko smo opravili vse preliminarne poskuse, smo zastavili poskus, v katerem smo želeli preveriti ali etanolni ognjičev ekstrakt (OEE) popravi poškodbe, ki jih v celicah HD11 povzroči oksidativni stres s H_2O_2 . Opravili smo dva poskusa: pri prvem smo za povzročitev oksidativnega stresa uporabili 1600 μM H_2O_2 , pri drugem poskusu pa 800 μM H_2O_2 . Koncentracija ekstrakta je bila pri obeh poskusih enaka (100 $\mu\text{g/ml}$). Celice smo najprej tretirali 4 h s H_2O_2 , s čimer smo povzročili stres, nato pa smo jih tretirali še z OEE in preko določanja viabilnosti, s pomočjo celičnega števca LUNA-FL™ (Poglavje 3.3.3), opazovali popravljalno delovanje ekstrakta po 24 h, 48 h, 72 h in 96 h. Bolj natančen potek celotnega poskusa je prikazan v prilogi A, razporeditev vzorcev pa na slikah 14 in 15.



Slika 14: Razporeditev vzorcev in kontrol na prvi izmed dveh 24-lukenjskih gojitvenih plošč za poskus o popravljalnem delovanju OEE po oksidativnem stresu povzročenim s H₂O₂. Luknjice C1, C2 in C3 so kontrole za stanje celic preden smo vzorce tretirali s H₂O₂. Luknjice C4, C5 in C6 so kontrole za stanje celic, preden smo vzorce tretirali z OEE. D1 in D3 sta kontroli celic tretiranih samo z OEE po 24 h oz. 96 h. D2 in D4 sta kontroli celic tretiranih samo s topilom EtOH po 24 h oz. 96 h. D5 in D6 sta kontroli celic tretiranih samo s H₂O₂ po 4 h.



Slika 15: Razporeditev kontrol na drugi izmed dveh 24-lukenjskih gojitvenih plošč za poskus o popravljalnem delovanju OEE po oksidativnem stresu povzročenim s H₂O₂. Levo polovico plošče predstavljajo kontrole celic, ki so bile tretirane s H₂O₂ za 4 h. Nato smo jim samo zamenjali gojišče (ekstrakta nismo dodali) in jim določili viabilnost po 24 h, 48 h, 72 h in 96 h. Desno polovico plošče pa predstavljajo kontrole, ki niso bile tretirane niti s H₂O₂ niti z OEE in smo ravno tako določili viabilnost po 24 h, 48 h, 72 h in 96 h.

3.8 VPLIV OGNJIČEVEGA EKSTRAKTA NA NIVO RESPIRACIJE CELIC HD11 – TEST XTT

3.8.1 Umeritvena krivulja

Da bi nivo respiracije lahko pretvorili v število celic, smo najprej pridobili podatke o vrednostih absorbanc (te posredno kažejo nivo respiracije) znanega števila celic in nato izrisali umeritveno krivuljo. Poleg tega pa smo določili ustrezen volumen in čas tretiranja celic HD11 z reagentom XTT (30007, Biotium). Test XTT je kolorimetrični test za merjenje nivoja respiracije v celicah, pri katerem uporabljamo reagent XTT, ki je derivat tetrazolija in je rumene barve. Ob prisotnosti mitohondrijske dehidrogenaze v živih celicah, se reagent XTT reducira v vodotopni formazanov derivat, ki je oranžne barve. Takim vzorcem lahko s fotometrom kvantitativno določimo absorbanco in nivo respiracije celic (Roehm in sod., 1991).

Glede na navodila proizvajalca smo testirali dva različna volumna reagenta XTT (25 μ l in 50 μ l) ter tri različne čase izpostavitve (2 h, 3 h in 4 h). Zato smo pripravili tri 96-lukenjske mikrotitrne plošče (vsaka plošča predstavlja en čas izpostavitve) in na vsaki plošči pripravili po tri redčitvene vrste za vsak volumen reagenta XTT. Skupaj je bilo tako na eni plošči šest redčitvenih vrst celic (Slika 16). Volumen ene luknjice je znašal 100 μ l, število celic pa je v vsaki naslednji luknjici manjše za faktor dva: 50×10^4 celic, 25×10^4 celic, $12,5 \times 10^4$ celic, $6,25 \times 10^4$ celic, $3,13 \times 10^4$ celic, $1,56 \times 10^4$ celic, $0,78 \times 10^4$ celic, $0,39 \times 10^4$ celic, $0,18 \times 10^4$ celic, $0,09 \times 10^4$ celic in $0,05 \times 10^4$ celic.

	25 μ l	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,18	0,09	0,05	G	
B	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,18	0,09	0,05	G	
C	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,18	0,09	0,05	G	
D	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,18	0,09	0,05	G	
50 μ l	E	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,18	0,09	0,05	G
F	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,18	0,09	0,05	G	
G													
H													

Slika 16: Razporeditev na 96-lukenjski mikrotitrski plošči za umeritveno krivuljo testa XTT. Vsaka luknjica vsebuje »številk« $\times 10^4$ celic, npr. 50×10^4 celic. V vrsticah A–C smo celice testirali s 25 μ l reagenta XTT, v vrsticah D–F pa s 50 μ l reagenta XTT. V luknjicah A12–F12 je bilo le gojišče G1, brez celic. Vse tri mikrotitrne plošče so imele enako razporeditev.

Zadnje luknjice so vsebovale le gojišče G1 in so služile kot ozadje pri merjenju absorbanco.

Ko je določen čas tretiranja potekel, smo s fotometrom (BIOTEK, EL808) izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm. Izračunali smo povprečje vrednosti absorbanco treh ponovitev za posamezni volumen in čas tretiranja, nato pa še odšteli absorbanco gojišča – ozadje. Končne rezultate smo nato zrisali na grafu. Za umeritveno krivuljo smo izbrali samo tiste točke, katerih vrednosti so eksponentno naraščale. S programom Microsoft Excel smo točkam dodali trendno črto in izpisali njene vrednosti R^2 (koeficient determinacije). Izmed šestih umeritvenih krivulj smo nato za nadaljnje poskuse izbrali tisto, katere vrednost R^2 je bila največja.

3.8.2 Preliminarni test XTT delovanja različnih ognjičevih ekstraktov na nivo respiracije kokošjih makrofagov HD11

Primerjali smo vpliv treh različnih ognjičevih ekstraktov na nivo respiracije celic HD11, in sicer že omenjena OEE in OPE, poleg njiju pa še ognjičev ekstrakt s fiziološko raztopino kot topilo. V vzorcu OEE smo EtOH želeli nadomestiti s fiziološko raztopino. Zato smo mikrocentrifugirko z vzorcem OEE pustili odprto v brezprašni komori, da je EtOH izhlapel, ga nato nadomestili z enakim volumnom fiziološke raztopine in dobro premešali. Na ta način smo želeli ugotoviti, kako topilo EtOH v ekstraktu vpliva na respiracijo celic HD11.

Pripravili smo tri 96-lukenjske mikrotitrne plošče (ena plošča za en ekstrakt in topilo) in vanje nasadili 1×10^4 celic/200 μ l/ na luknjico. Celice smo nato predstavili v celični inkubator.

Naslednji dan smo pripravili založne raztopine vseh treh ekstraktov in topil, pri čemer smo za redčenje uporabili osnovno gojišče RPMI-1640. Celice smo tretirali z 20 μ l ekstrakta oz. topila, končne koncentracije ekstraktov in topil pa so bile sledeče: 1600 μ g/ml, 800 μ g/ml, 400 μ g/ml, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12,5 μ g/ml, 6,25 μ g/ml, 3,12 μ g/ml, 1,56 μ g/ml in 0,78 μ g/ml. Razporeditev vzorcev je prikazana na sliki 17.

Po 24-urni inkubaciji smo celicam zamenjali gojišče in jim dodali 40 μ l reagenta XTT za 3 h. (opomba: pri tem preliminarnem poskusu smo uporabili XTT reagent proizvajalca Sigma Aldrich, za katerega je bila optimizacija volumna in časa tretiranja že predhodno opravljena. Za glavni poskus smo uporabili reagent XTT proizvajalca Biotium, ki smo ga vzorcem dodajali v enakem razmerju in jih tretirali enako dolgo.) Nato smo vzorcem izmerili absorbanco s fotometrom pri valovni dolžini 450 nm.

E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
B	1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
C	1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
D	1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
T	1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
F	1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
G	0	0	0	G	G	G						
H												

Slika 17: Razporeditev vzorcev na 96-lukenjski mikrotitrski plošči za preliminarni poskus treh različnih ekstraktov in vpliva treh različnih topil na respiratorno aktivnost celic HD11. V vrsticah A–C smo celice HD11 tretirali z ekstraktom (E = Ekstrakt), in sicer s koncentracijami od 1600 $\mu\text{g/ml}$ do 0,78 $\mu\text{g/ml}$. V vrsticah D–F (T = Topilo) pa smo celice tretirali z enakimi koncentracijami topila. Celice v luknjicah G1–G3 niso bile tretirane niti z ekstraktom niti s topilom, luknjice G4–G6 pa so vsebovale le gojišče G1. Vse tri mikrotitrski plošče so imele enako razporeditev.

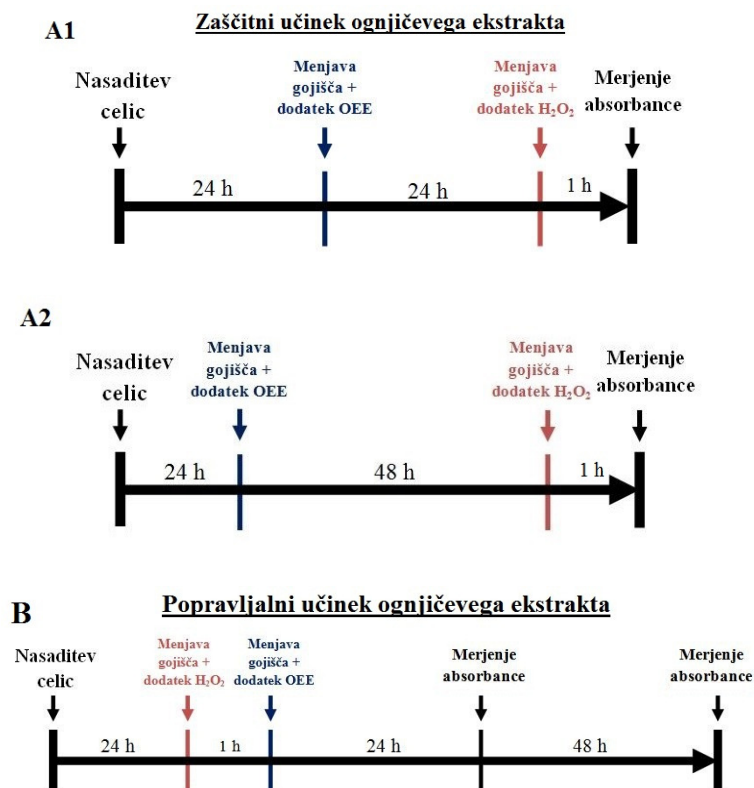
3.9 ZAŠČITNI IN POPRAVLJALNI UČINEK ETANOLNEGA OGNJIČEVEGA EKSTRAKTA NA RESPIRACIJO CELIC HD11

Glavna poskusa sta temeljila na eksperimentu opisanem v članku Alnuqaydan in sod. (2015), kjer so testirali zaščitni učinek ognjičevega ekstrakta pred oksidativnim stresom povzročenim s H_2O_2 .

V našem prvem poskusu o zaščitnem učinku smo imeli šest 96-lukenjskih mikrotitrskih plošč – za vsak čas izpostavitve tri plošče. Celice smo najprej izpostavili OEE za 24 h in 48 h, in sicer v koncentracijah 400 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$ in 1600 $\mu\text{g/ml}$. Nato smo celice za 1 h izpostavili 200 μM , 300 μM in 400 μM H_2O_2 . Ko je 1 h potekla, smo celicam zamenjali gojišče in dodali 25 μl reagenta XTT za 3 h (Slika 19, A). Potem smo vzorcem izmerili absorbanco na fotometru pri valovni dolžini 450 nm. Bolj natančen potek poskusa je prikazan v prilogi B, razporeditev vzorcev pa na sliki 18.

	400 OEE	800 OEE	1600 OEE	
200 H ₂ O ₂	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
300 H ₂ O ₂	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
400 H ₂ O ₂	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
K OEE	400 400 400	800 800 800	1600 1600 1600	○ ○ ○
K EtOH	400 400 400	800 800 800	1600 1600 1600	○ ○ ○
K H ₂ O ₂	200 200 200	300 300 300	400 400 400	○ ○ ○
	0 0 0	G G G		○ ○ ○
				○ ○ ○

Slika 18: Razporeditev vzorcev za poskus XTT o zaščitnem/popravljanem delovanju OEE pred/po oksidativnem stresu povzročeni s H₂O₂. Vijolične luknjice predstavljajo vzorce, ki so bili tretirani tako z OEE kot tudi s H₂O₂. V vrstici »K OEE« so bile celice tretirane le z OEE. V vrstici »K EtOH« so bile celice tretirane le z EtOH. V vrstici »K H₂O₂« so bile celice tretirane le s H₂O₂. Oznaka »0« predstavlja luknjice s celicami, ki niso bile tretirane z ničemer. Oznaka »G« pa predstavlja luknjice, ki so vsebovale samo gojišče G1. Vseh šest mikrotitrskih plošč je imelo enako razporeditev.



Slika 19: Časovni potek glavnih poskusov o zaščitnem (A1 in A2) in popravljanem (B) učinku etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) pred (A1 in A2) oz. po (B) povzročitvi oksidativnega stresa s H₂O₂.

V drugem glavnem poskusu smo testirali popravljalni efekt OEE na celice HD11 po povzročitvi oksidativnega stresa s H_2O_2 . Koncentracije tako ekstrakta kot tudi H_2O_2 so bile enake kot v prvem poskusu, prav tako tudi časi izpostavitve. Spremenili smo le zaporedje tretiranja (Slika 19, B) – najprej smo celice tretirali s H_2O_2 za 1 h, nato pa jih za 24 h in 48 h izpostavili OEE. Ko je določen čas izpostavitve OEE potekel, smo celice tretirali z reagentom XTT za 3 h in nato izmerili absorbanco s fotometrom pri valovni dolžini 450 nm. Natančnejši potek poskusa pa je prikazan v prilogi C. Razporeditev vzorcev je bila enaka kot pri prejšnjem poskusu (Slika 18).

3.10 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Pri optimizacijskih poskusih (Poglavje 3.2.2) je vsak vzorec imel vsaj tri ponovitve in smo tako lahko za vsakega izračunali povprečje in standardno napako.

Pri preliminarnih poskusih (Poglavje 3.2.3) je vsak vzorec sicer imel le dve ponovitvi, zaradi pomanjkanja prostora na 24-lukenjski gojitveni plošči, vendar smo zato vsakič pripravili tri ponovitve plošč in tako pridobili dovolj podatkov za izračuna povprečij in standardnih napak. Pri poskusu, kjer smo primerjali barvili Tripan modro in AO/PI (Poglavje 3.2.3.1), smo pri analizi rezultatov opravili še t-test med podatki enega in drugega barvila. Na ta način smo lahko tudi statistično opredelili razliko oz. podobnost med rezultati obeh barvil, pri čemer smo upoštevali, da mora biti $p \leq 0,05$.

Pri glavnem poskusu o popravljalnem učinku ekstrakta na viabilnost celic HD11 (Poglavje 3.2.4) so vzorci in glavne kontrole (netretirana kontrola in kontrola tretirana samo s H_2O_2) izvedli tri ponovitve. Ostale kontrole niso bile vključene v statistično analizo in so vključevale le po dve ponovitvi. Iz pridobljenih rezultatov smo nato izračunali povprečje in, kjer je bilo podatkov dovolj, standardno napako.

Pri testih XTT (Poglavje 3.2.5) je vsak vzorec vedno imel tri ponovitve, iz katerih smo nato izračunali povprečje in standardno napako. Pri preliminarnem poskusu ekstraktov na nivo respiracije (Poglavje 3.2.5.2) smo opravili še t-test med posameznim ekstraktom in pripadajočim topilom in tako statistično opredelili razliko oz. podobnost med podatki. Glavna poskusa XTT o zaščitnem in popravljalnem delovanju ekstrakta na nivo respiracije (Poglavje 3.2.5.3) sta poleg treh ponovitev vsakega vzorca vsebovala še tri ponovitve celotnega poskusa in je tako vsak vzorec imel devet podatkov. Iz teh smo nato izračunali povprečje in standardno napako, med kontrolami in vzorci pa smo opravili še t-test in statistično opredelili delovanje ekstrakta, pri čemer smo upoštevali, da mora biti $p \leq 0,05$.

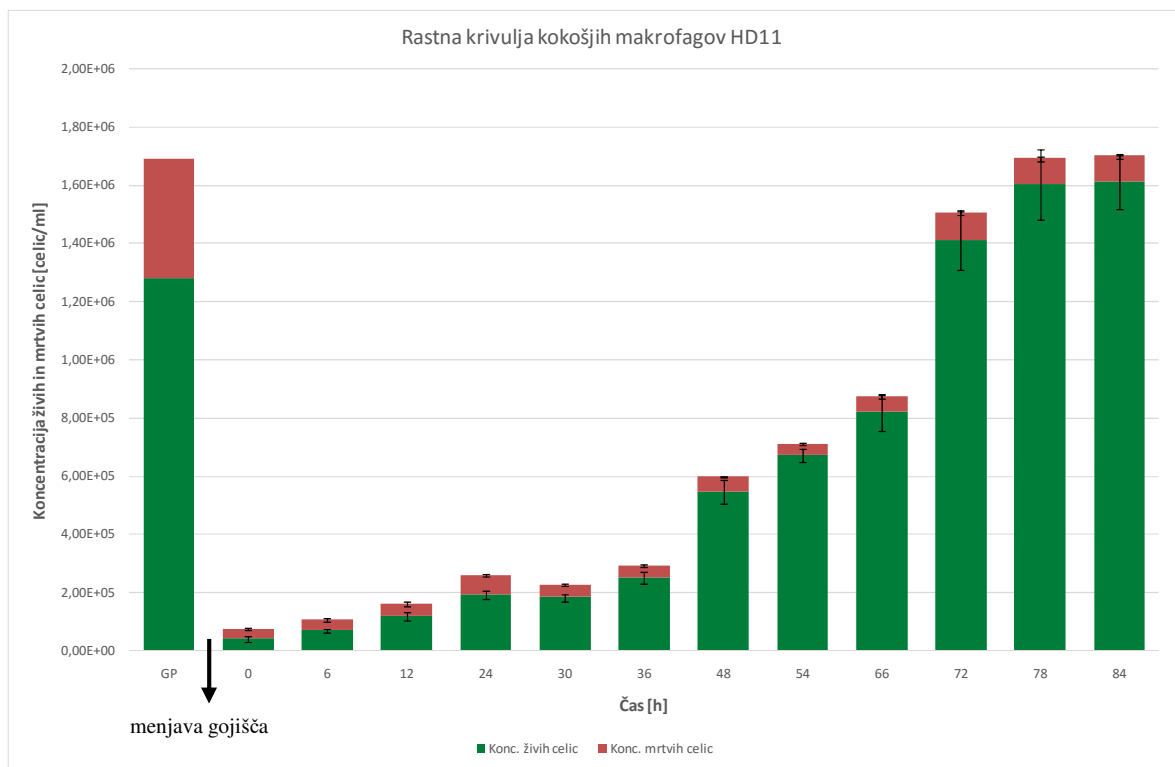
4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 VIABILNOST KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11

4.1.1 Optimizacija poskusov

4.1.1.1 Rastna dinamika kokošjih makrofagov HD11

Preden smo sploh lahko začeli z različnimi poskusi, smo se najprej morali seznaniti s celicami HD11 in preveriti, kakšna je njihova rastna dinamika, kako hitro se pomnožujejo (podvojitveni čas) in kaj se z njimi zgodi po večdnevni inkubaciji v 24-lukenjski gojitveni plošči. Podatke smo prikazali v obliki rastne krivulje na sliki 20.

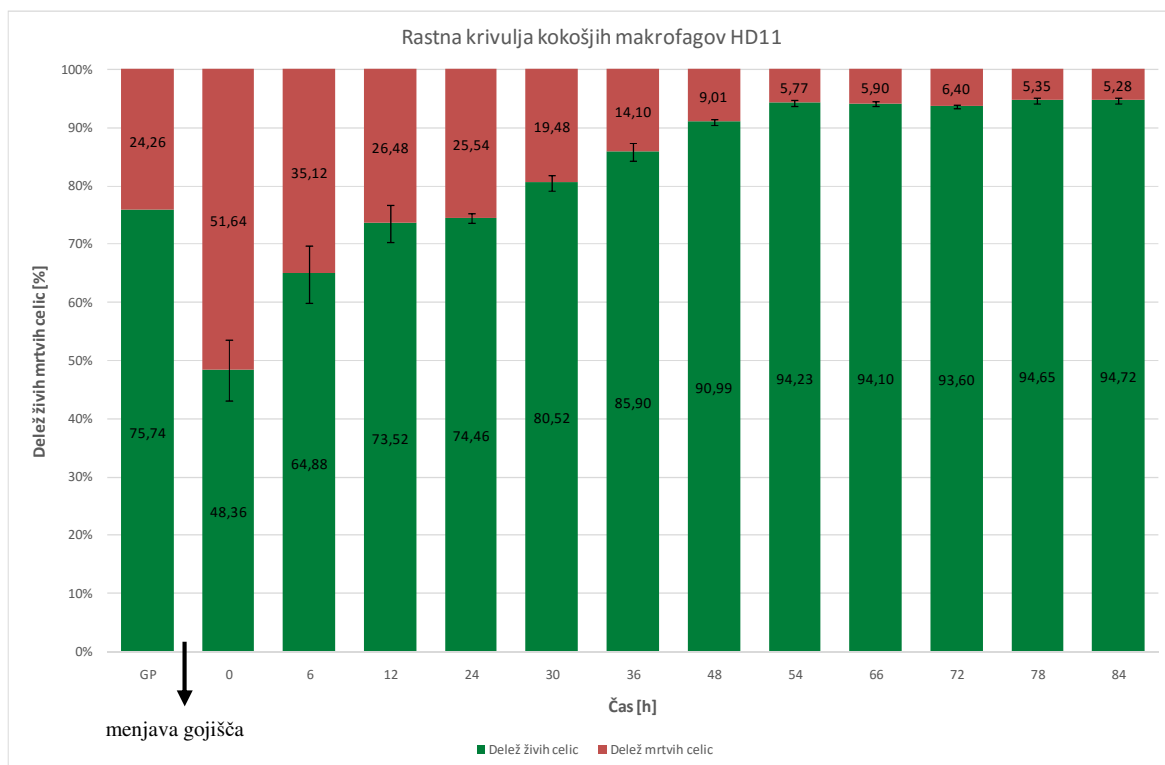


Slika 20: Rastna dinamika celic HD11 v 24-lukenjski mikrotitrski plošči. Točka GP prikazuje koncentracijo celic v gojitveni posodi, preden smo celice nasadili v plošče. Za čas 0 smo smatrali 24 ur po nasaditvi celic – med točko GP in 0 je 24 h. Zadnja točka 84 h predstavlja zadnje štetje celic, in sicer 84 h od prvega štetja v točki 0 (oz. 96 h od nasaditve celic, točka GP).

Rastna krivulja na sliki 20 prikazuje različne faze rasti celic HD11. Najprej so celice v lag fazi, kjer se počasi podvojujejo, saj se morajo zaradi presaditve prilagoditi novemu okolju. Ko se stabilizirajo, se začnejo hitreje pomnoževati in preidejo v eksponentno fazo rasti, kjer je rast najhitrejša. Iz podatkov v tej fazi (čas od 48 ur do 72 ur) lahko izračunamo podvojevalni čas celic. V našem primeru smo iz koncentracije celic v časovnih točkah od 48 ur do 72 ur ter s pomočjo enačb 4 in 5 izračunali podvojevalni čas, ki je znašal 17,9 h,

kar je približno 18 h. V točkah »78 h« in »84 h« pa celice preidejo v stacionarno fazo, kjer se rast celic upočasni ali celo ustavi, največkrat zaradi pomanjkanja hranil.

Poleg koncentracij celic smo v enakih časovnih točkah preverjali tudi viabilnost celic HD11 (Slika 21).



Slika 21: Viabilnost celic HD11 v 24-lukenjski mikrotitrski plošči po času. Točka GP prikazuje koncentracijo celic v gojitveni posodi, preden smo celice nasadili v plošče. Za čas 0 smo smatrali 24 ur po nasaditvi celic – med točko GP in 0 je 24 h. Zadnja točka 84 h predstavlja zadnje štetje celic, in sicer 84 h od prvega štetja v točki 0 (oz. 96 h od nasaditve celic, točka GP).

Na sliki 20 vidimo dinamiko podvojevanja celic in kolikšna je maksimalna koncentracija, ki jo času trajanja poskusa lahko dosežejo. Pri poskusu pa je bilo pomembno spremljati tudi deleže živih in mrtvih celic. S prikazom viabilnosti v enakih časovnih točkah (Slika 21) smo natančneje pokazali, koliko časa po nasaditvi v plošče celice potrebujejo, da se stabilizirajo in da je delež mrtvih celic najmanjši. Celice HD11 so namreč semi-adherentna celična linija in jih je treba, pred nasaditvijo v mikrotitrsko ploščo, postrgati z dna gojitvene posode, kar pa je za njih lahko nekoliko stresno. Na sliki 21 lahko vidimo, da to v našem primeru drži, saj se je delež mrtvih 24 ur po presaditvi (točka 0) povečal v primerjavi s stanjem ob presaditvi (točka GP). Sčasoma pa so se celice stabilizirale in se je ta delež zmanjšal na približno 25 %, kasneje pa celo na samo približno 5 %. Če graf s slike 21 primerjamo z grafom s slike 20, pa lahko vidimo, da celice dosežejo visoko viabilnost (nad 90 %) po 48 h, kar je tudi začetek eksponentne faze rasti v rastni krivulji.

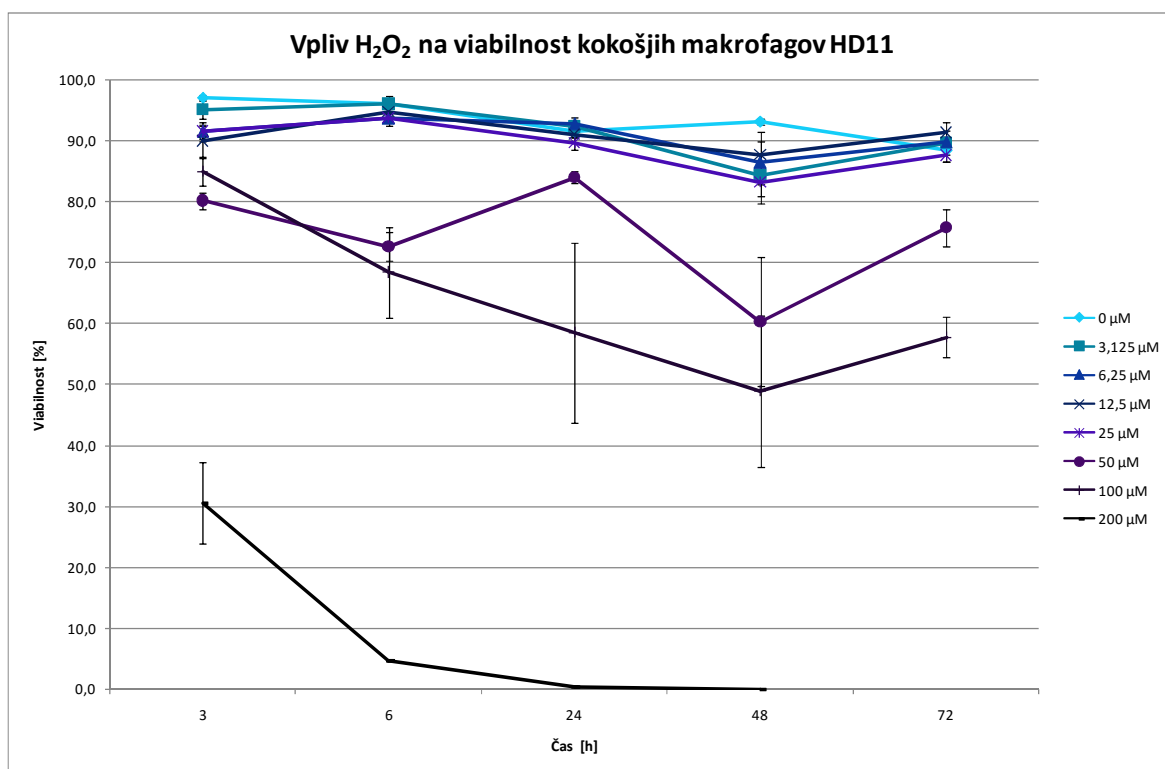
Z grafov na slikah 20 in 21 smo nato razbrali ustrezne načine priprave celic pred poskusi, da bodo ob njihovem začetku poskusa stabilne in viabilne. 72 h od nasaditve celic (točka 48 h) je najbolj primerno izhodišče za začetek poskusa, saj se v tem času celice stabilizirajo in vstopijo v eksponentno fazo, kar pomeni, da so viabilne. Poleg tega pa od te točke naprej celice obstanejo viabilne dovolj dolgo obdobje, ki je bilo predvideno za izvedbo celega poskusa.

Tako smo pri poskusih, kjer smo celice testirali v 24-lukenjskih ploščah, celice nasadili v koncentraciji 1×10^5 celic na luknjico in jih nato 72 h pustili v celičnem inkubatorju na 37 °C in 5 % CO₂ atmosferi ter nato začeli z našim poskusom.

4.1.1.2 Vpliv H₂O₂ na viabilnost kokošnjih makrofagov HD11

Cilj magistrske naloge je bil ugotoviti, ali ima ognjičev ekstrakt antioksidativne lastnosti, torej da prepreči nastanek poškodb, ki so posledica oksidativnega stresa ali pa jih zaščiti pred oksidativnim stresom. Zato smo oksidativni stres povzročili s H₂O₂. Pred tem pa smo morali ugotoviti, katera koncentracija H₂O₂ bi bila najbolj primerna za poskus. Želeli smo namreč poiskati tako koncentracijo, ki bi celicam povzročila zadosten stres, da si celice od njega ne bi opomogle same, hkrati pa stres ni smel biti premočan, da bi celice preveč poškodoval. Poleg koncentracije H₂O₂ na obseg poškodb celic vpliva tudi čas izpostavljenosti, zato smo testirali tudi različna dolga časovna obdobja. Tako smo želeli najti koncentracijo H₂O₂ in čase izpostavljenosti, kjer bi bilo nekaj celic sicer poškodovanih in mrtvih, vendar bi si večina celic še vedno lahko opomogla.

Glede na literaturo (Lah in sod., 2004; Benhusein in sod., 2010; Rosignoli in sod., 2001) smo izbrali tak razpon koncentracij, za katerega smo pričakovali, da bo izzval vse prej omenjene nivoje stresa, torej od prešibkega do premočnega. Tako smo celice HD11 testirali z naslednjimi koncentracijami: 3,125 μM, 6,25 μM, 12,5 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM in 200 μM H₂O₂; ter različnimi časi izpostavitve: 3 h, 6 h, 24 h, 48 h in 72 h. Pričakovali smo, da bo viabilnost celic HD11 koncentracijsko in časovno obratno sorazmerna (višja koncentracija H₂O₂, manjša viabilnost) in bomo lahko ugotovili koncentracijo, ki bo povzročila srednje močan stres. Rezultati tega poskusa so prikazani na sliki 22.



Slika 22: Vpliv različnih koncentracij in časovnih izpostavitvev H₂O₂ na viabilnost kokošjih makrofagov HD11. Točka 200 μM po 72 h ni prikazana.

Kot lahko vidimo na sliki 22 je viabilnost celic HD11 koncentracijsko in časovno obratno sorazmerna – torej višja, kot je koncentracija H₂O₂, manjša bo viabilnost in daljši čas izpostavitve ravno tako pomeni manjšo viabilnost. Koncentracije do 25 μM precej podobno delujejo na viabilnost celic in lahko bi rekli, da te koncentracije povzročajo šibek stres tudi pri daljših izpostavitvah. Nasprotno pa najvišja koncentracija 200 μM povzroča zelo močan stres že pri najkrajši izpostavitvi, pri daljših pa viabilnost celo pade na 0 %. Koncentraciji 50 μM in 100 μM pa sta povzročili takšen učinek, kot smo ga želeli – torej, da nekaj celic sicer odmre, vendar si ostale še vedno lahko opomorejo.

Tako smo za nadaljnje poskuse izbrali koncentraciji 50 μM in 100 μM, koncentracija 200 μM pa nam je služila kot negativna kontrola, pri kateri si celice po oksidativnem stresu ne opomorejo več.

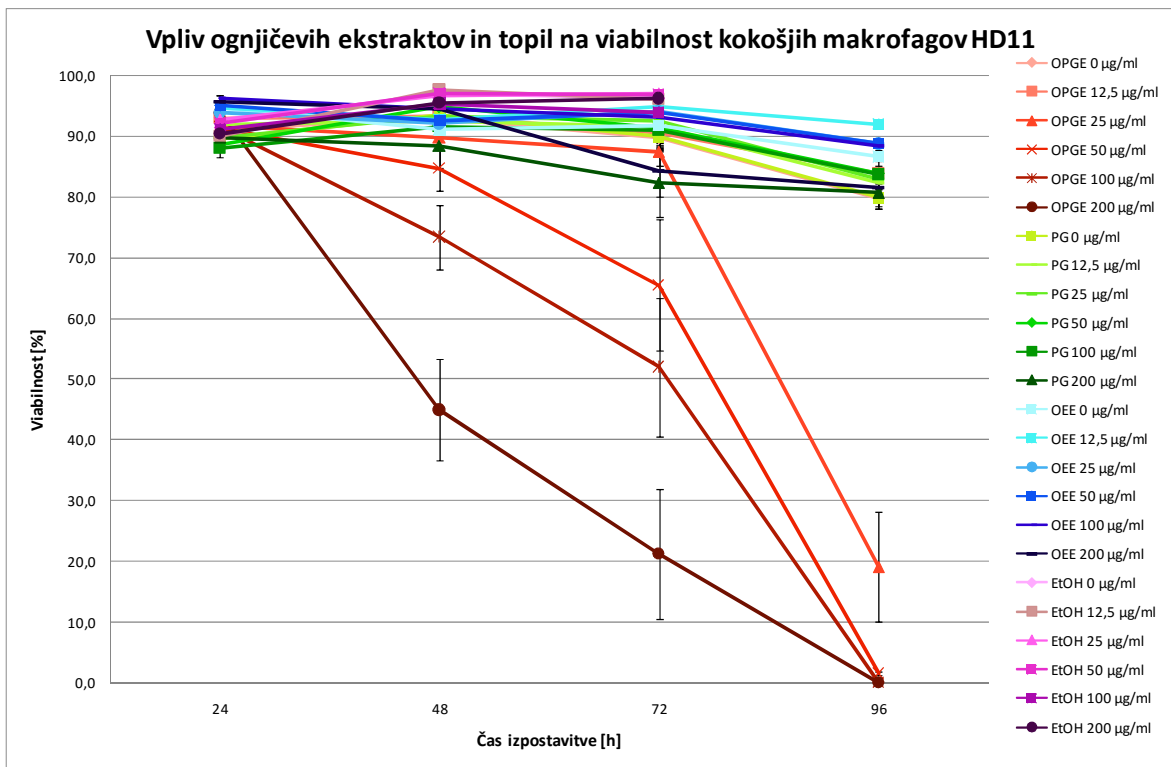
4.1.1.3 Vpliv dveh ekstraktov ognjiča in njunih topil na viabilnost kokošjih makrofagov HD11

Tako kot pri H₂O₂ smo si tudi pri izbiri koncentracij ognjičevih ekstraktov pomagali s podatki iz literature. Pri tem smo bili pozorni, da ne bi izbrali prenizkih koncentracij, saj potem ekstrakt ne bi mogel delovati proti stresu. Hkrati pa koncentracije niso smele biti previsoke, saj lahko ognjičevi ekstrakti delujejo tudi citotoksično in genotoksično (Ukiya in sod., 2006; Pérez-Carreón in sod., 2002; Jiménez-Medina in sod., 2006). Iz literature

smo razbrali tudi, da so prvi učinki ognjičevega ekstrakta vidni šele po enem dnevu ali več, kar smo upoštevali tudi pri našem poskusu.

Preizkusili smo dva različna ognjičeva ekstrakta – OEE in OPE, hkrati pa še njuni topili PG in EtOH, na viabilnost celic HD11. Odločili smo se, da bomo testirali koncentracije 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml in 200 µg/ml tako ekstraktov kot tudi topil, celice pa bomo z njimi tretirali 24 h, 48 h, 72 h in 96 h.

S tem poskusom smo želeli ugotoviti, ali imata OEE in OPE sama po sebi kakšen učinek na viabilnost celic HD11 in ali je koncentracijsko in časovno odvisen. Hkrati pa smo s testiranjem njunih topil želeli ugotoviti, ali že samo topilo povzroča škodo na celicah, saj gre v obeh primerih za precej močno polarno topilo. Rezultati poskusa so prikazani na sliki 23.



Slika 23: Vpliv ognjičevega ekstrakta v dveh različnih topilih na viabilnost kokošjih makrofagov HD11. OEE: ognjičev ekstrakt v etanolu; OPGE: ognjičev ekstrakt v propilen-glikolu; PG: propilen-glikol; EtOH: etanol. na viabilnost kokošjih makrofagov HD11 po času. Podatki EtOH po 96 h niso prikazani.

Glede na rezultate poskusa prikazane na sliki 23 lahko rečemo, da obstaja razlika med delovanjem OEE in OPGE, pri čemer OPGE deluje negativno na viabilnost celic HD11, OEE pa kot lahko vidimo ne vpliva na viabilnost celic. Če bolj natančno pogledamo skupino podatkov OPGE, opazimo, da višje koncentracije in daljša izpostavitve pomenita bistveno zmanjšanje viabilnosti celic HD11, pri najdaljši izpostavitvi celo popolno odmrtnje celic. Glede na to, da OEE tudi pri najvišji koncentraciji 200 µg/ml ni bil citotoksičen,

medtem ko je bil OPGE citotoksičen že pri 25 μ /ml, smo delno potrdili našo drugo hipotezo, kjer smo predvidevali, da bodo le višje koncentracije ekstraktov imele citotoksičen učinek na celice.

Sicer smo iz podatkov iz literature vedeli, da možnost citotoksičnega delovanja ekstraktov na celice obstaja, vendar nismo pričakovali tolikšnega vpliva na viabilnost celic, kot smo ga videli pri OPGE. Zanimivi pa so rezultati v skupini PG, kjer vidimo, da PG sam po sebi ne vpliva na viabilnost celic HD11, medtem ko viabilnost celic v prisotnosti OPGE bistveno pade. To pomeni, da je vzrok za manjšo viabilnost celic v samem ekstraktu in ni posledica topila PG, ki je v njem. Podobno so dokazali tudi Četković in sod., 2003, kjer so z eno in dvodimenzionalno tankoplastno kromatografijo pokazali, da ognjičevi ekstrakti v različnih topilih vsebujejo različno sestavo flavonoidov in fenolnih kislin in se zato razlikujejo v učinkovanju na celice. V našem primeru bi to pomenilo, da topilo PG v OPGE iz rastlinskega materiala ekstrahira snovi v tako sestavo, da postane pri teh koncentracijah ekstrakta neugodna za celice HD11. Nasprotno pa v naši raziskavi nobena uporabljena koncentracija OEE in topila EtOH, ne glede na čas izpostavitve, ni vplivala na viabilnost celic HD11, kot lahko vidimo na sliki 23. Tako smo potrdili tudi našo prvo hipotezo, da topilo vpliva na delovanje ekstraktov in se bosta zato OPGE in OEE razlikovala v svojem delovanju na celice.

Na podlagi rezultatov iz slike 23 smo se odločili, da ekstrakta OPE ne bomo uporabili v glavnem poskusu, saj so skoraj vse uporabljene koncentracije imele negativen učinek na viabilnost celic HD11, česar pa v našem poskusu ne želimo. Ekstrakt OEE pa se je izkazal kot varen za tretiranje celic HD11 in smo ga zato uporabili v nadaljnjih poskusih.

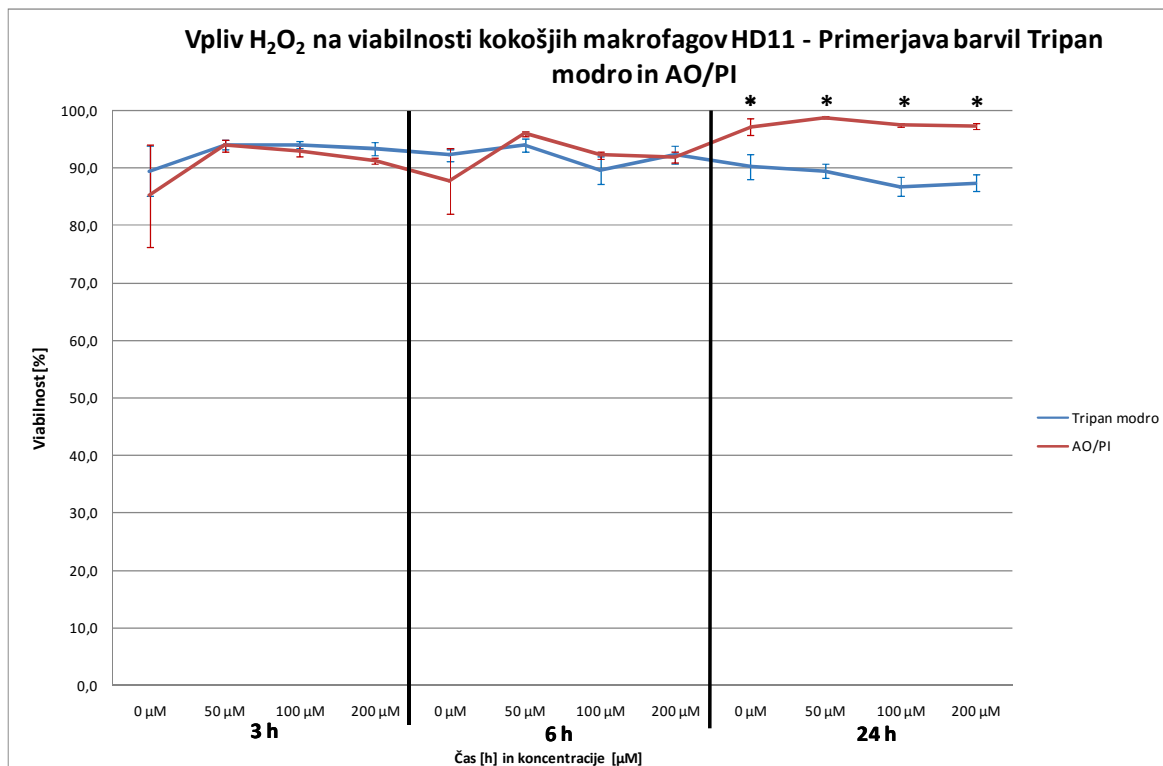
4.1.2 Preliminarni poskusi o viabilnosti celic HD11

Za preliminarne poskuse smo uporabili bolj natančno metodo štetja, in sicer štetje s polavtomatskim celičnim števcem LUNA-FL™, ki nam omogoča hitrejše, zanesljivo in bolj natančno štetje. Ker pa se v protokolu vseeno nekoliko razlikuje od štetja v mikrotitrski plošči pod mikroskopom, smo še enkrat testirali delovanje H₂O₂ in OEE na viabilnost celic HD11. Najprej pa smo preverili, kako sta primerljivi metodi štetja v vidnem in fluorescentnem območju.

4.1.2.1 Primerjava dveh različnih barvil za štetje s polavtomatskim celičnim števcem LUNA-FL™

S tem preliminarnim poskusom smo izkoristili eno izmed prednosti, ki nam jih ponuja avtomatski celični števec LUNA-FL™; to je barvanje celic za barvilom AO/PI in štetje pod fluorescenčno svetlobo. Zanimalo nas je, ali so med štetjem z barvilom Tripan modro in štetjem z barvilom AO/PI razlike in če so, katera izmed teh dveh metod je bolj natančna.

Primerjavo smo statistično ovrednotili s t-testom. Rezultate tega poskusa lahko vidimo na sliki 24.



Slika 24: Vpliv H_2O_2 na viabilnost celic HD11 in primerjava dveh različnih barvil za štetje celic – Tripan modro in AO/PI. Med obema skupinama podatkov je bil opravljen t-test. Simbol * označuje podatke, ki so statistično značilno različni ($p \leq 0,05$).

Glede na rezultate iz slike 24 lahko vidimo, da sta obe metodi štetja dali podobne rezultate in sta bili obe podobno natančni. Pri podatkih za viabilnost po 3 h in 6 h je t-test izračunal p , ki je bil večji od 0,05, kar pomeni, da statistično gledano obstaja 95 % verjetnost, da gre za statistično značilno enake podatke, torej da metodi podata enake rezultate. Pri podatkih viabilnosti po 24 h pa je bila vrednost $p \leq 0,05$, kar pomeni, da so ti podatki med sabo statistično značilno različni, torej da metodi ne podata enakih rezultatov.

Razlog za tako odstopanje bi se lahko skrival v tem, da smo na celičnem števci napačno nastavili parametre štetja. LUNA-FL™ namreč tudi pri štetju s fluorescenco omogoča namestitvev in prilagoditev parametrov štetja, kot so določitev meje upoštevanja signala, jakost signala in določitev meje upoštevanja ozadja. Če smo meje nastavili prenizko, potem je naprava upoštevala več signalov iz ozadja in jih tako zamenjala za žive celice. Lahko pa smo, v primeru mrtvih celic, mejo nastavili previsoko in tako naprava določenih signalov, ki so bile v bistvu mrtve celice, ni upoštevala.

V kolikor bi želeli preveriti, ali je to res razlog za odstopanje, bi morali opraviti še nekaj dodatnih poskusov, kjer bi vsak vzorec testirali z različnimi parametri štetja, kar pa bi nam

vzelo veliko časa in števnih ploščic, ki pa so za enkratno uporabo. Glede na to, da je protokol štetja z barvilom Tripan modro manj zahteven v primerjavi s štetjem z AO/PI in da so rezultati obeh štetij podobni, smo se odločili, da v nadaljnjih poskusih za štetje uporabimo Tripan modro.

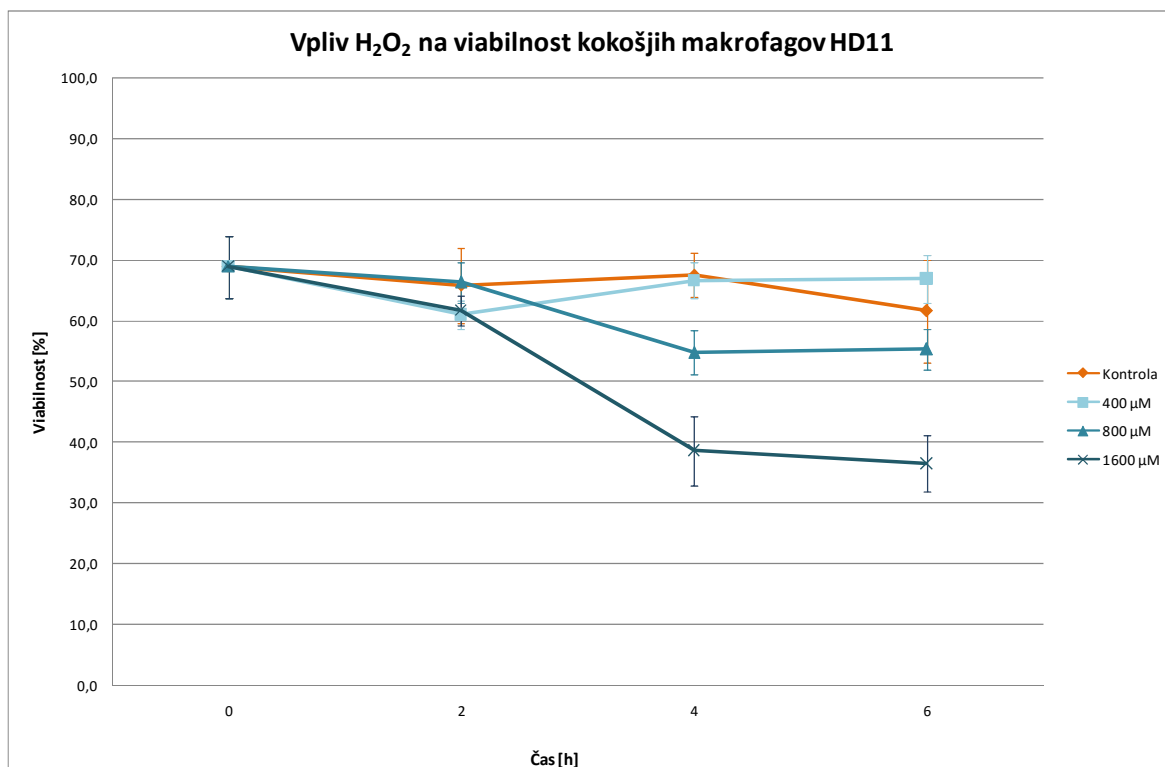
Pri prej opisanem preliminarnem poskusu smo celice tretirali s H_2O_2 z namenom, da bi povzročili odmiranje določenega deleža celic (glede na rezultate iz poglavja 4.1.1.2) in bi tako lažje odčitali razliko med barvili, če bi se le-ta pojavila. V kolikor celic ne bi tretirali, bi njihova viabilnost tekom poskusa ostala nad 90 %, zato bi morebitne razlike težje opazili. V nasprotju s pričakovanji je tekom poskusa viabilnost celic, ne glede na koncentracijo H_2O_2 in čas izpostavitve, ostala nad 90 %, (Slika 24) čeprav smo v optimizacijskem poskusu (Poglavje 4.1.1.2) pokazali, da ravno te koncentracije negativno vplivajo na viabilnost celic HD11. Ker smo v optimizacijskem poskusu uporabljali metodo štetja, ki ni bila najbolj zanesljiva in natančna, smo se odločili, da še enkrat testiramo delovanje H_2O_2 na viabilnost celic HD11, tokrat z višjimi koncentracijami.

4.1.2.2 Vpliv višjih koncentracij H_2O_2 na viabilnost kokošjih makrofagov HD11

Celice HD11 smo tretirali s koncentracijami 400 μM , 800 μM in 1600 μM . Glede na to, da so to veliko višje koncentracije kot pri optimizacijskem poskusu, smo skrajšali čas tretiranja, in sicer na 2 h, 4 h in na 6 h. Tudi tu smo pričakovali, da bosta večja koncentracija in daljša izpostavitve močno zmanjšala viabilnost.

Rezultati tega poskusa (Slika 25) so ponovno pokazali koncentracijsko in časovno odvisnost delovanja H_2O_2 na viabilnost celic HD11, pri čemer je koncentracija 1600 μM po 6 h povzročila največ škode. Koncentracija 800 μM je po 4 h povzročila šibek stres, koncentracija 400 μM pa na viabilnost celic HD11 ni imela vpliva.

Tako smo se glede na rezultate iz slike 25 odločili, da bomo za povzročitev oksidativnega stresa celic uporabili koncentraciji 800 μM in 1600 μM H_2O_2 , saj smo bili mnenja, da bo po takem stresu preživelo dovolj celic in bodo tudi v takem stanju, da si bodo s pomočjo ekstrakta lahko opomogle. Čas izpostavitve pa bo trajal 4 h, saj je 4-urna izpostavitve teh koncentracij pokazala primerljive rezultate kot 6-urna.



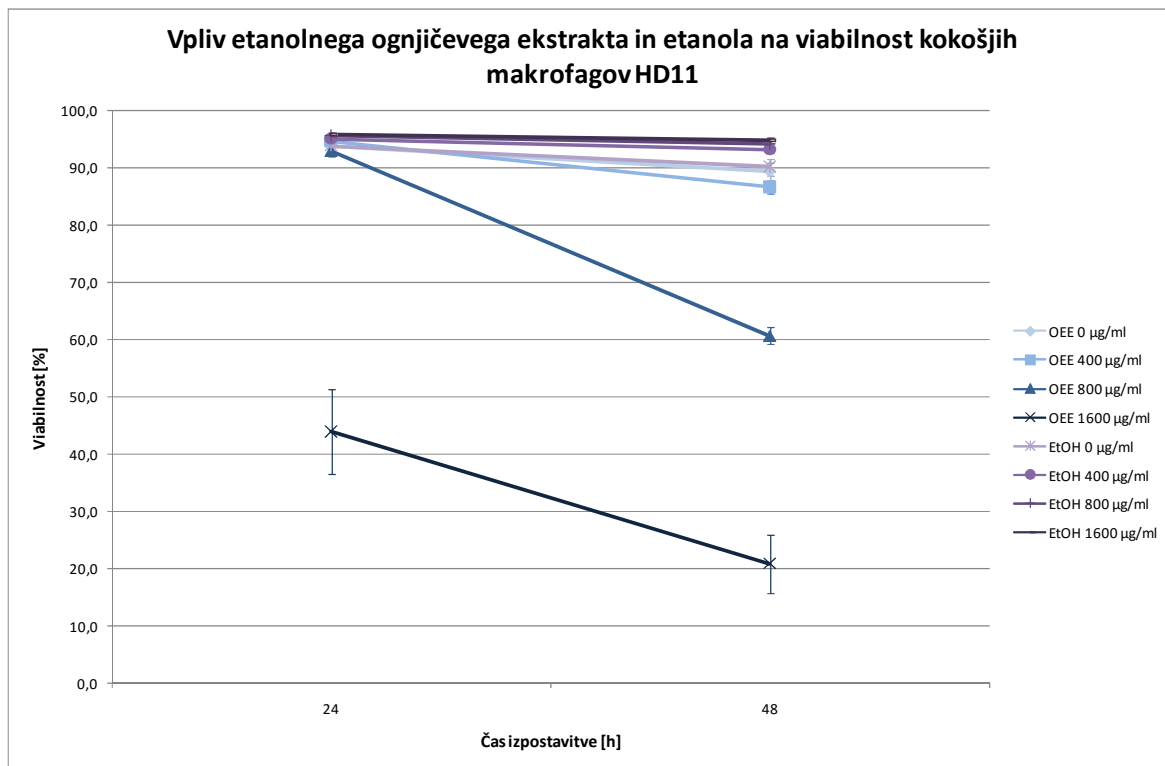
Slika 25: Vpliv različnih koncentracij in časovnih izpostavitvev H₂O₂ na viabilnost kokošjih makrofagov HD11.

4.1.2.3 Vpliv višjih koncentracij etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) na viabilnost kokošjih makrofagov HD11

S pomočjo polavtomatskega celičnega števca LUNA-FL™ smo testirali delovanje višjih koncentracij OEE na viabilnost celic HD11. Glede na rezultate iz optimizacijskega poskusa (Poglavje 4.1.1.3) nas je zanimalo, ali bomo tudi pri OEE opazili negativen vpliv na viabilnost celic, če zvišamo njegove koncentracije. Za glavni poskus smo se na podlagi literature in rezultatov optimizacijskega poskusa odločili, da bomo uporabili koncentracijo 100 µg/ml OEE. S tem preliminarnim poskusom pa smo želeli preveriti, do katere meje lahko zvišamo koncentracijo OEE, ne da bi povzročil škodo na celicah, če bi se izkazalo, da je izbrana koncentracija za glavni poskus prenizka. Rezultati tega preliminarnega poskusa so prikazani na sliki 26.

Iz rezultatov na sliki 26 lahko vidimo, da najnižja testirana koncentracija 400 µg/ml nima opaznega vpliva na viabilnost celic, ne glede na čas izpostavitve. Pri višjih koncentracijah, 800 µg/ml in 1600 µg/ml, pa se že pokaže negativen vpliv na viabilnost celic. Pri 800 µg/ml se ta učinek pokaže šele po 48 h, pri 1600 µg/ml pa že po 24 h. Tako smo tudi s tem poskusom potrdili našo drugo hipotezo, da bodo višje koncentracije ekstraktov lahko citotoksične. Hkrati pa smo potrdili tudi prvo hipotezo, da se ekstrakti v različnih topilih razlikujejo med sabo, saj smo v optimizacijskem poskusu (Poglavje 4.1.1.3) videli, da je

OPGE toksičen že pri koncentraciji 25 $\mu\text{g/ml}$, medtem ko lahko iz tega preliminarnega poskusa vidimo, da je OEE toksičen šele pri 800 $\mu\text{g/ml}$.



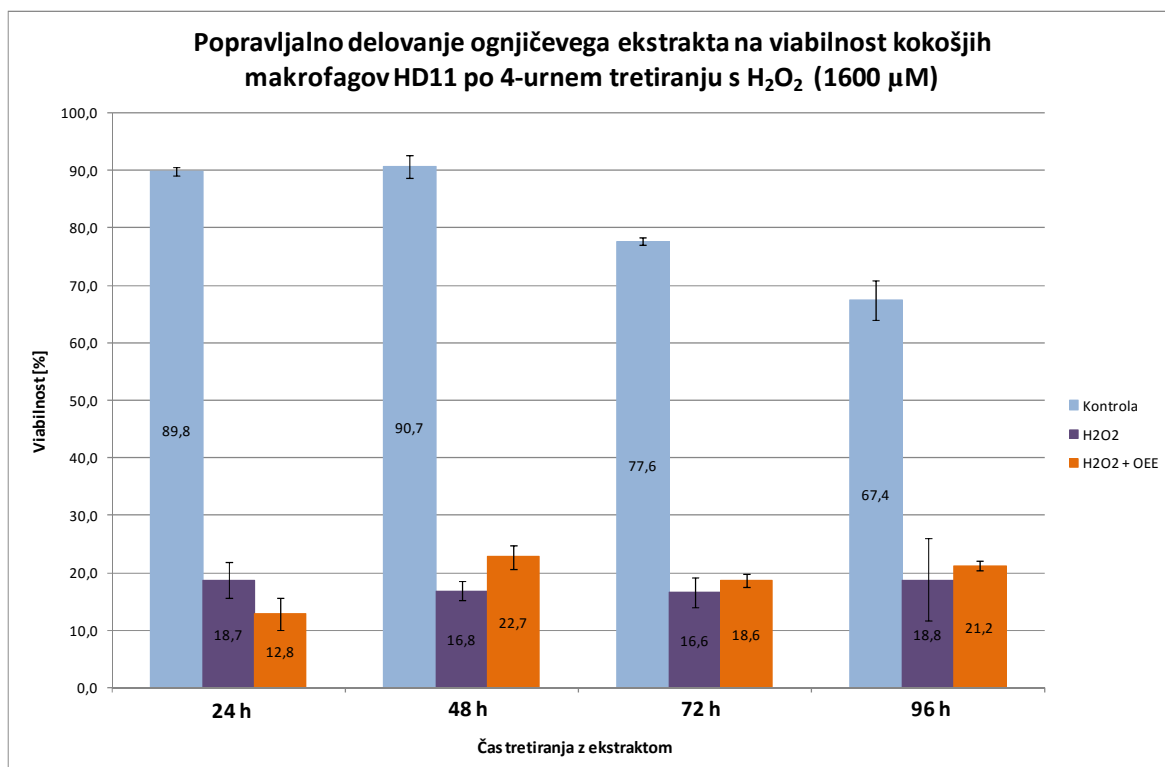
Slika 26: Vpliv različnih koncentracij in časovnih izpostavitvev OEE in topila EtOH na viabilnost celic HD11.

4.1.3 Popravljalno delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) na viabilnost celic HD11 po povzročitvi oksidativnega stresa s H_2O_2

Iz literature vemo, da imajo ognjičevi ekstrakti antioksidativne lastnosti, saj vsebujejo veliko flavonoidov in fenolnih kislin, ki delujejo kot lovilci prostih radikalov nastalih kot posledica delovanja stresa na celice (Butnariu in Coradini, 2012; Četković in sod., 2003; Preethis in sod., 2006; Frankič in sod., 2008; Četković in sod., 2004; Gong in sod., 2012; Sabir in sod., 2015; Alnuqaydan in sod., 2015). Zato smo v našem glavnem poskusu celice izpostavili najprej oksidativnemu stresu, nato pa ognjičevemu ekstraktu in opazovali, ali ima ekstrakt sposobnost popraviti škodo in celicam povrniti sposobnost regeneracije in izboljšati viabilnost celic.

Celice HD11 smo tako najprej za 4 h izpostavili 1600 μM H_2O_2 , nato pa jih tretirali z OEE s koncentracijo 100 $\mu\text{g/ml}$ za 24 h, 48 h, 72 h in 96 h. Pričakovali smo, da bo izbrana koncentracija OEE uspela izboljšati viabilnost celic po oksidativnem stresu in da bo delovanje ekstrakta časovno pogojena – daljša izpostavitve, večja viabilnost celic. Viabilnost vzorcev, tretirane tako s H_2O_2 kot tudi z OEE, smo primerjali s kontrolno skupino celic, ki je bila tretirana samo s H_2O_2 , in smo jo nato do konca poskusa pustili, da

se regenerira sama od sebe. Med podatki vzorcev in opisano kontrolo smo opravili še t-test, da bi morebitne opažene razlike lahko statistično opredelili. Rezultati prvega glavnega poskusa so prikazani na sliki 27.



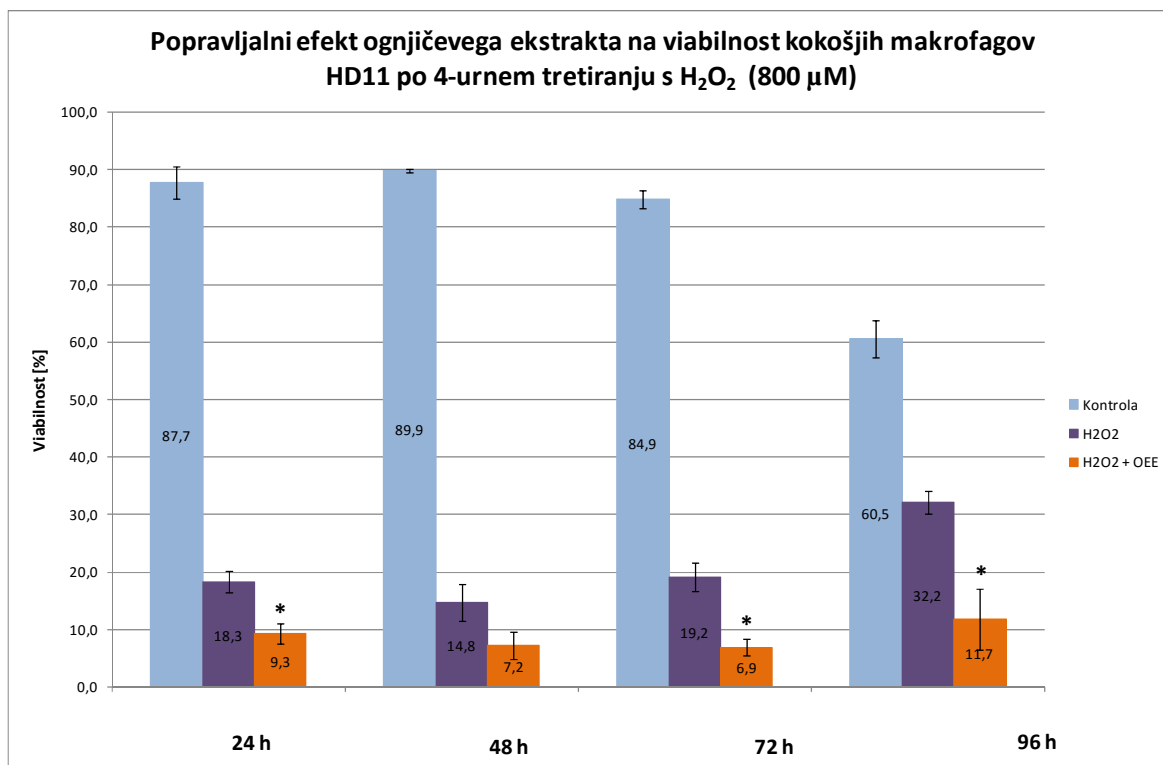
Slika 27: Popravljalno delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) na viabilnost kokošjih makrofagov HD11 po 4-urnem tretiranju s 1600 μM H₂O₂. Stolpci z oznako »kontrola« predstavljajo viabilnost netretiranih celic. Stolpci z oznako »H₂O₂« predstavljajo viabilnost celic, ki so bile tretirane samo s H₂O₂ in smo jih nato do konca poskusa pustili pri miru. Stolpci z oznako »H₂O₂ + OEE« pa predstavljajo viabilnost vzorcev tretiranih tako s H₂O₂ kot tudi z OEE. T-test ni podal nobenih vrednosti $p \leq 0,05$.

Pričakovali smo, da bo popravljalno delovanje OEE na celice v stresu časovno odvisno, torej da bo daljša izpostavitve OEE izboljšala viabilnost celic HD11, vendar tega iz naših rezultatov ne moremo sklepati, saj ni velikih razlik v viabilnosti vzorcev »H₂O₂ + OEE« skozi čas, poleg tega pa ne nakazujejo, da bi se sčasoma viabilnost povečevala. Po 24 h je viabilnost vzorcev »H₂O₂ + OEE« manjša od viabilnosti kontrole »H₂O₂«, kar lahko pomeni, da je 24 h izpostavitve prekratka, da bi ekstrakt lahko pričel učinkovati.

Pri vseh ostalih časih izpostavitve so viabilnost vzorcev »H₂O₂ + OEE« višje od kontrole »H₂O₂«, kar bi lahko pomenilo, da se celice ob dodatku OEE lažje regenerirajo. Res pa je, da ne gre za tako izrazite razlike. Poleg tega pa t-testi med kontrolami »H₂O₂« in vzorci »H₂O₂ + OEE« za posamezen čas niso podali statistično značilno različnih rezultatov (p ni bil nikjer manjši ali enak 0,05).

Ker pa so rezultati na sliki 27 vseeno nakazovali manjši učinek OEE, smo se odločili, da poskus še enkrat ponovimo. Tokrat smo se odločili, da koncentracijo H₂O₂ zmanjšamo za

polovico – 800 μM . Iz slike 27 namreč lahko vidimo, da je koncentracija 1600 μM povzročila veliko več škode, kot pa smo to predvidevali glede na preliminarne poskuse (Poglavje 4.1.2.2). Lahko, da so bile celice HD11 zaradi previsoke koncentracije H_2O_2 v tako šibkem stanju, da bi si v vsakem primeru težko opomogle. S tem, ko smo zmanjšali koncentracijo H_2O_2 , pa smo v drugem glavnem poskusu pričakovali, da oksidativni stres ne bo tako močan in se bodo celice lažje stabilizirale, ko bomo dodali OEE. Rezultati drugega glavnega poskusa so prikazani na sliki 28.



Slika 28: Popravljanje delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta (OEE) na viabilnost kokošjih makrofagov HD11 po 4-urnem tretiranju s 800 μM H_2O_2 . Stolpci z oznako »kontrola« predstavljajo viabilnost netretiranih celic. Stolpci z oznako »H₂O₂« predstavljajo viabilnost celic, ki so bile tretirane samo s H_2O_2 do konca poskusa, brez OEE. Stolpci z oznako »H₂O₂ + OEE« pa predstavljajo viabilnost vzorcev tretiranih tako s H_2O_2 kot tudi z OEE. Simbol »*« prikazuje podatke, kjer je t-test podal vrednosti $p \leq 0,05$.

V drugem glavnem poskusu nismo dobili pričakovanih rezultatov. Škoda zaradi oksidativnega stresa je bila približno enaka kot pri prvem glavnem poskusu, čeprav smo koncentracijo H_2O_2 zmanjšali za polovico. Viabilnost vzorcev »H₂O₂ + OEE« pa je bila celo nižja kot pri prvem glavnem poskusu, poleg tega pa je t-test pokazal, da je večina podatkov statistično značilno različna med sabo (simbol »*« na sliki 28).

Rezultati iz slike 28 kažejo, da je 800 μM H_2O_2 povzročil preveč škode na celicah in se niso mogle regenerirati niti ob dodatku OEE. Čeprav smo v preliminarjem poskusu (Poglavje 4.1.2.2) pokazali, da ta koncentracija po 4 h tretiranju pobije približno 55 % celic, je bil ta odstotek pri tem drugem glavnem poskusu bistveno višji. Točnega razloga, zakaj prihaja do takih razlik v rezultatih tretiranja s H_2O_2 , nismo uspeli ugotoviti. So pa

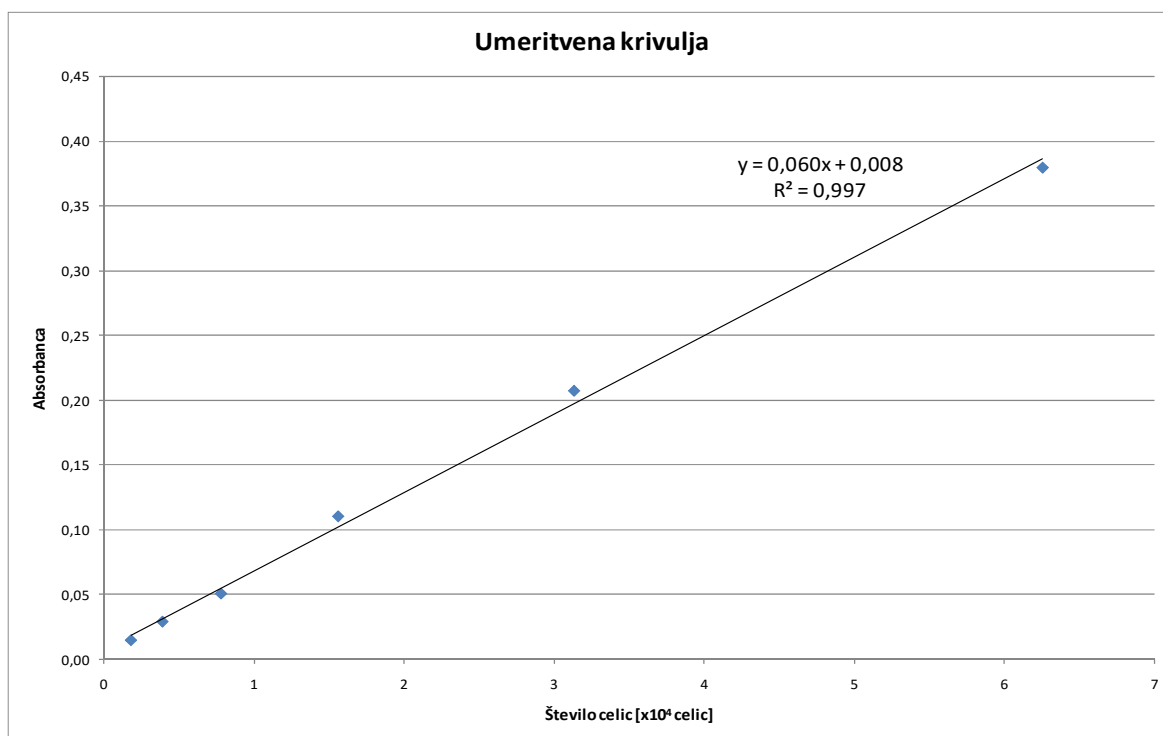
tudi nekateri drugi raziskovalci, npr. Alnuqaydan in sod. (2015), naleteli na podobne težave, ko so celice tretirali s H_2O_2 in so prav tako dobili različne rezultate. V svojem članku so pojasnili, da lahko do tako različnih rezultatov pride zato, ker so prosti radikali, ki jih tvori H_2O_2 v celici, zelo nestabilni.

Glede na rezultate obeh glavnih poskusov smo se odločili, da bomo delovanje OEE na celice v oksidativnem stresu ponovno testirali, saj so rezultati prvega poskusa nakazovali njegove učinke. Vendar smo prenehali z opazovanjem viabilnosti in smo za nadaljnje poskuse uporabili metodo XTT, ki temelji na redukciji tetrazolijevega obroča XTT reagenta s strani mitohondrijske dehidrogenaze, ki je pokazatelj nivoja respiracije v celicah.

4.2 OPAZOVANJE NIVOJA RESPIRACIJE KOKOŠJIH MAKROFAGOV HD11

4.2.1 Umeritvena krivulja

Kot smo opisali v poglavju 3.2.5.1, smo, po navodilih proizvajalca reagenta XTT, najprej testirali različne volumne in čase izpostavitve reagenta XTT. Iz vsake skupine podatkov smo izbrali le tiste, katerih vrednosti so eksponentno naraščale, jih narisali na graf in dodali trendno črto. Izmed vseh šestih umeritvenih krivulj smo izbrali tisto, ki je imela najvišjo vrednost R^2 – to je bila umeritvena krivulja s 25 μ l XTT in 3-urno izpostavitvijo (Slika 29).



Slika 29: Umeritvena krivulja za teste XTT. Volumen reagenta XTT je znašal 25 μ l, čas tretiranja pa 3 h.

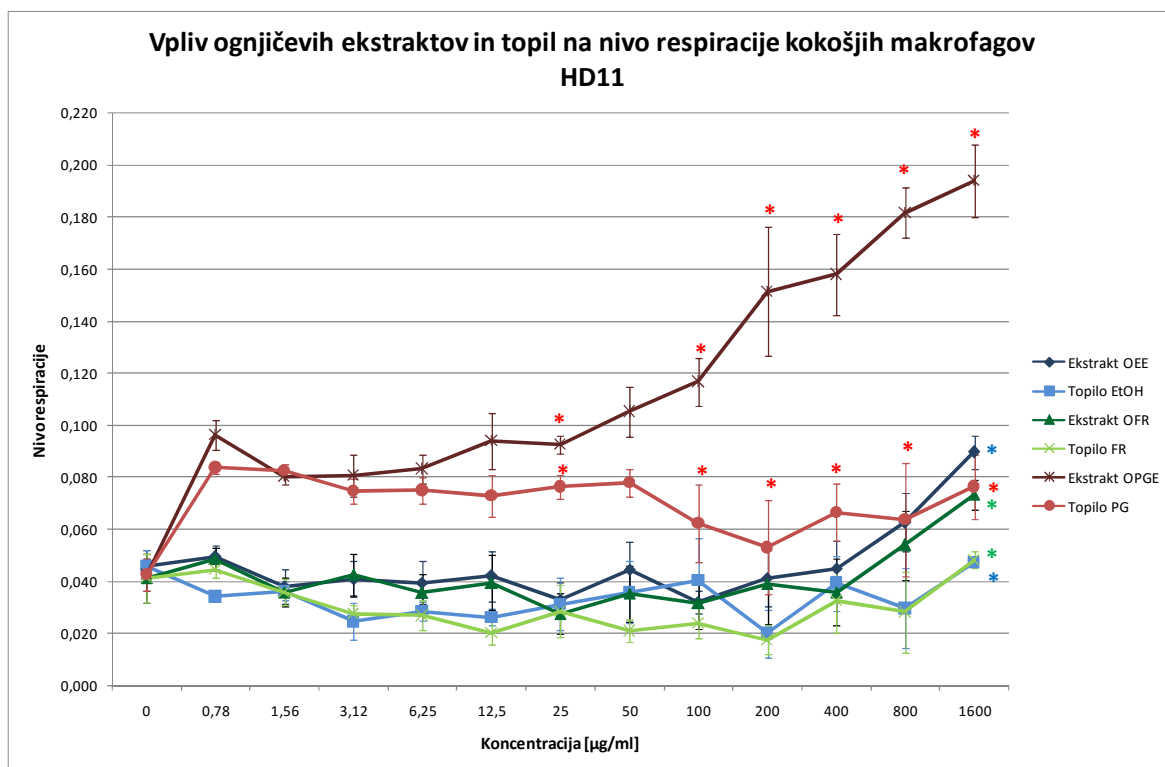
4.2.2 Preliminarni test XTT delovanja različnih ognjičevih ekstraktov na nivo respiracije kokošjih makrofagov HD11

Preden smo se lotili glavnega poskusa XTT, smo želeli preveriti ali različni ognjičevi ekstrakti vplivajo na nivo respiracije v celicah HD11. Iz prejšnjih preliminarnih poskusov delovanja ognjičevih ekstraktov na viabilnost celic HD11 (Poglavji 4.1.1.3 in 4.1.2.3) vemo, da se OPGE in OEE razlikujeta v svojem delovanju na viabilnost, glede na uporabljene koncentracije. Pri obeh ekstraktih smo pokazali tudi negativen učinek na viabilnost celic HD11, vendar se je ta učinek pri OPGE pokazal že pri nižjih koncentracijah (25 µg/ml) v primerjavi z OEE, kjer se je ta efekt pokazal pri višjih koncentracijah (800 µg/ml). Take učinke smo hoteli pokazati tudi s testom XTT.

Pri tem preliminarnem poskusu XTT pa smo OPGE in OEE dodali še ognjičev ekstrakt v fiziološki raztopini kot topilo – OFR. S tem smo poskusu dodali kontrolo, s katero bomo lahko primerjali rezultate OPE in OEE. Pričakovali smo namreč, da tako OFR kot samo topilo fiziološke raztopine – FR, ne bosta pokazala vpliva na nivo respiracije celic HD11. Za ta poskus smo uporabili koncentracije ekstraktov in topil od 0,78 µg/ml pa vse do 1600 µg/ml. Vse ekstrakte in topila smo celicam izpostavili za 24 h. Pri tem pa smo pričakovali, da bodo koncentracije ekstraktov, ki smo jim že dokazali vpliv na viabilnost v prejšnjih preliminarnih poskusih, imeli tudi vpliv na nivo respiracije. Rezultati tega poskusa so prikazani na sliki 30.

Podatke med posameznim ekstraktom in topilom (OEE – EtOH, OFR – FR, OPGE – PG) smo statistično ovrednotili s t-testom. S tem smo želeli preveriti, ali je učinek posameznega ekstrakta in ujemaajočega topila na nivoju respiracije celic statistično značilno različen ali enak.

Vse podatke smo, kot lahko vidimo na sliki 30, prikazali kot graf nivoja respiracije v odvisnosti od koncentracije, pri čemer so podatki o nivoju respiracije pravzaprav podatki o absorbanci, ki smo jih pridobili na fotometru. Podatke bi praviloma morali preračunati v število celic s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo predhodno opravili, vendar smo se po analizi rezultatov odločili drugače. Namreč, če pogledamo rezultate na sliki 30, vidimo, da izmed vseh testiranih snovi najbolj izstopa OPGE. Njegovo delovanje na nivo respiracije je vsekakor koncentracijsko odvisno, saj pri najvišji koncentraciji povzroči najvišji dvig nivoja respiracije (absorbance). Če bi te podatke preračunali v število celic, bi dobili rezultate, ki bi kazali, da OPGE pozitivno deluje na celice HD11 in celo spodbuja njihovo proliferacijo. Toda, če upoštevamo preliminarne poskuse o negativnem delovanju OPGE na viabilnost celic (Poglavji 4.1.1.3 in 4.1.2.3), potem to ne more držati. Test XTT temelji na količini encima mitohondrijske dehidrogenaze v celici, ki reducira tetrazolijev obroč v reagentu. Če se celice namnožijo, se hkrati z njimi poveča količina encima in s tem se reducira tudi več reagenta XTT.



Slika 30: Vpliv različnih koncentracij ognjičevega ekstrakta v treh topilih na nivo respiracije celic HD11 po 24-urnem tretiranju. OEE: etanolni ognjičev ekstrakt; OFR: ognjičev ekstrakt v fiziološki raztopini; OPGE: propilen-glikolski ekstrakt. EtOH: etanol; FR: fiziološka raztopina; PG: propilen-glikol. Simboli * označujejo podatke, kjer je t-test podal vrednost $p \leq 0,05$. Rdeči * označujejo rezultate t-testa med OPE in PG. Modri * označujejo rezultate t-testa med OEE in EtOH. Zeleni * pa označujejo rezultate t-testa med OFR in FR.

Mitohondrijska dehidrogenaza pa, kot že ime pove, deluje v mitohondrijih, ki so glavna komponenta celičnega dihanja. To še posebej velja takrat, kadar so celice v stresu, saj morajo vso svojo energijo ATP porabiti za zaščito pred morebitnimi poškodbami. Ker se poveča potreba po ATP, se s tem poveča tudi potreba po NADH v dihalni verigi, zato se mora tudi količina mitohondrijskih dehidrogenaz, ki omogočajo nastanek NADH in FAD, povečati (Denton, 2009).

Dvig nivoja respiracije, ki ga je povzročil OPGE, lahko tako interpretiramo kot povišanje količine encimov v mitohondrijih zaradi stresa. Topilo PG, glede na rezultate iz slike 30, ne povzroča tolikšnega stresa kot OPGE, torej smo tu ponovno potrdili domnevo iz optimizacijskega poskusa (Poglavje 4.1.1.3), da ekstrakt OPGE celicam škoduje zaradi svoje sestave polifenolov in flavonoidov, ne pa zaradi topila. Še vedno pa topilo PG povzroča višji nivo respiracije kot pa OFR in OEE ter njuni topili, kar lahko tudi vidimo iz slike 30. Za OFR in OEE lahko torej trdimo, da ne povzročata močnega stresa v celicah HD11 in sta neškodljiva. To drži vse do koncentracije 800 µg/ml in 1600 µg/ml, kjer pa se že poviša nivo respiracije celic. Glede na preliminarne poskuse (Poglavje 4.1.2.3) smo to tudi pričakovali.

Rezultati delovanja OFR in OEE ter njihovih topil na nivo respiracije na sliki 30 so vsaj na videz podobni, vendar smo to želeli tudi statistično preveriti, zato smo vsak ekstrakt in ustrezno topilo primerjali s t–testom. Statistično značilne razlike so se pojavile le pri koncentraciji 1600 µg/ml tako OEE kot tudi OFR (modri in zeleni simboli * na sliki 30), kar pomeni, da ta koncentracija res vpliva na nivo respiracije, njuno topilo pa ne. Poleg tega pa nas je zanimalo tudi, ali se sama ekstrakta OEE in OFR med sabo razlikujeta in smo tudi med njima opravili t–test. Rezultati so pokazali, da imata enak vpliv na nivo respiracije vse do koncentracij 1600 µM, kjer se med njima pokaže statistično značilna razlika (ti rezultati na grafu na sliki 30 niso prikazani).

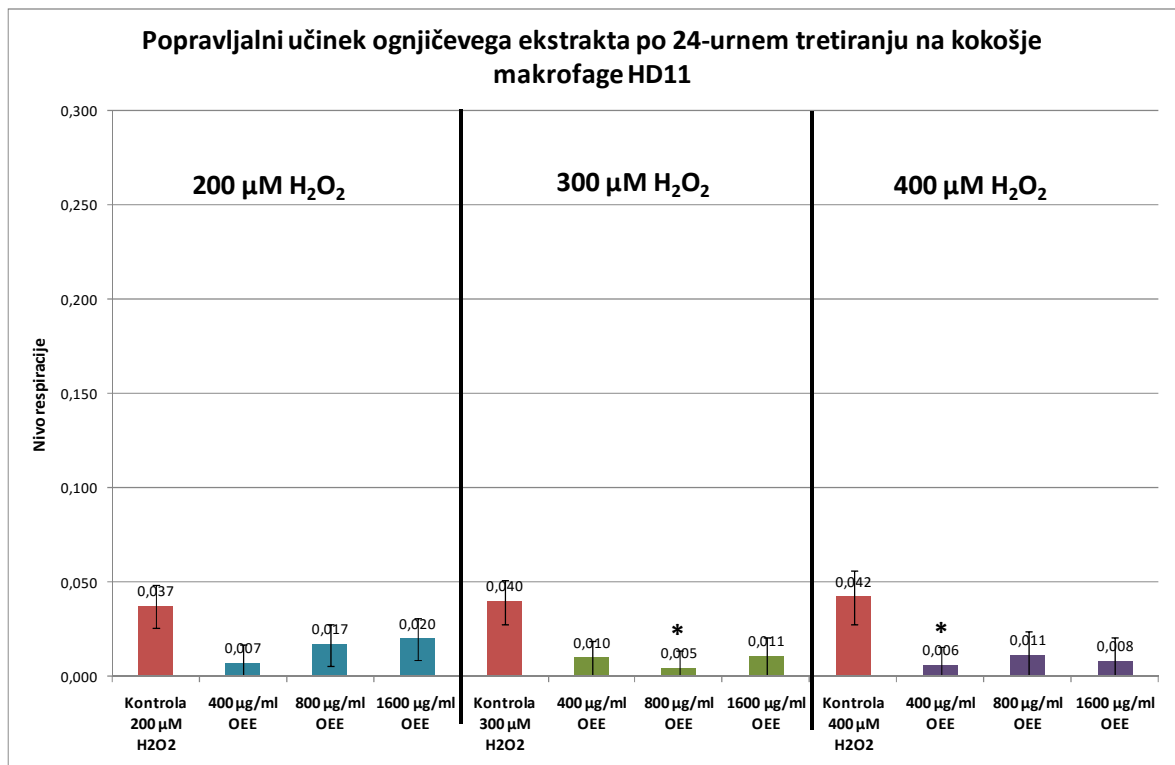
S tem preliminarnim poskusom smo tako ponovno potrdili prvo hipotezo, da ekstrakti v različnih topilih različno delujejo na celice HD11. Ta efekt je povzročen s strani ekstrakta samega in ne na račun topila v njem. Poleg tega pa imajo ekstrakti lahko na celico tudi negativen učinek bodisi jih spravijo samo v stres bodisi jih celo pomorijo.

4.2.3 Zaščitni in popravljalni učinek etanolnega ognjičevega ekstrakta na respiracijo kokošjih makrofagov HD11

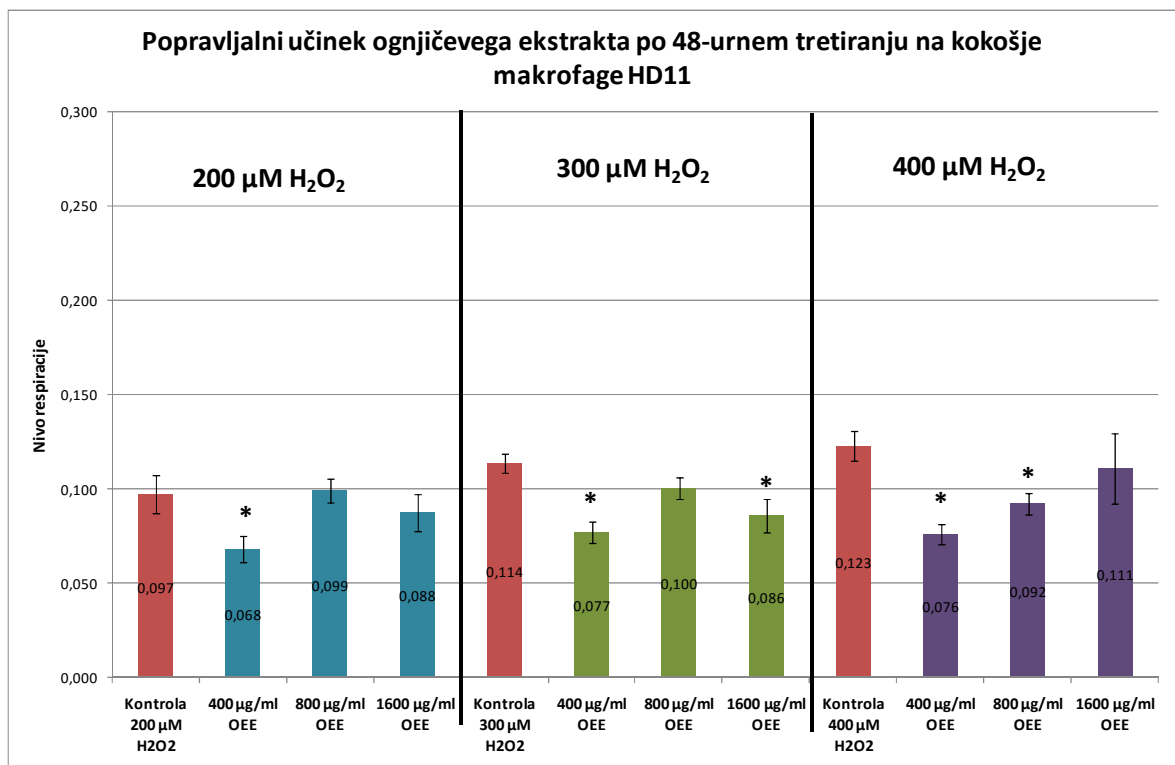
Glavna poskusa XTT sta temeljila na eksperimentu, kjer so Alnuqaydan in sod. (2015) z metodo MTT testirali zaščitno delovanje ognjičevega ekstrakta na celice v oksidativnem stresu *in vitro*. Najprej smo testirali popravljalno delovanje OEE, in sicer smo najprej celice za 1 h tretirali s tremi koncentracijami H₂O₂ (200 µM, 300 µM in 400 µM), nato pa smo jih za 24 h in 48 h izpostavili trem različnim koncentracijam OEE (400 µg/ml, 800 µg/ml in 1600 µg/ml). Podatke vzorcev, tretiranih tako s H₂O₂ kot tudi z OEE, smo nato s t–testom primerjali s kontrolo, ki je bila tretirana samo s H₂O₂. Rezultati so prikazani na sliki 31 in 32.

Rezultati na sliki 31 prikazujejo popravljalni efekt ekstrakta po 24 h tretiranju po povzročitvi oksidativnega stresa. Iz njih smo težko karkoli sklepali, saj so bile standardne napake za te podatke relativno visoke in razlike med njimi neočitne.

Na sliki 32 pa so prikazani rezultati, kjer smo celice, po povzročitvi oksidativnega stresa tretirali z ekstraktom 48 h. Če primerjamo kontrolo H₂O₂ z vzorci (tretiranimi tako s H₂O₂ kot tudi z OEE), vidimo, da so si celice v kontroli H₂O₂ same bolje opomogle po stresu kot v primeru dodatka OEE. Te razlike so ponekod tudi statistično značilne (simbol *). Spomnimo, da smo kontrolo H₂O₂ po menjavi gojišča (torej H₂O₂ ni bil več prisoten) pustili pri miru in smo zato pričakovali, da se bodo same počasneje regenerirale. Rezultati iz slike 32 pa kažejo nasprotno in bi lahko glede na njih rekli, da ekstrakt oz. njegovi antioksidanti škode v celicah, ki je že bila storjena, ne morejo popraviti in da pravzaprav ni velike razlike v sposobnosti regeneracije celic, če imajo naknadno dodan ekstrakt ali pa ne.



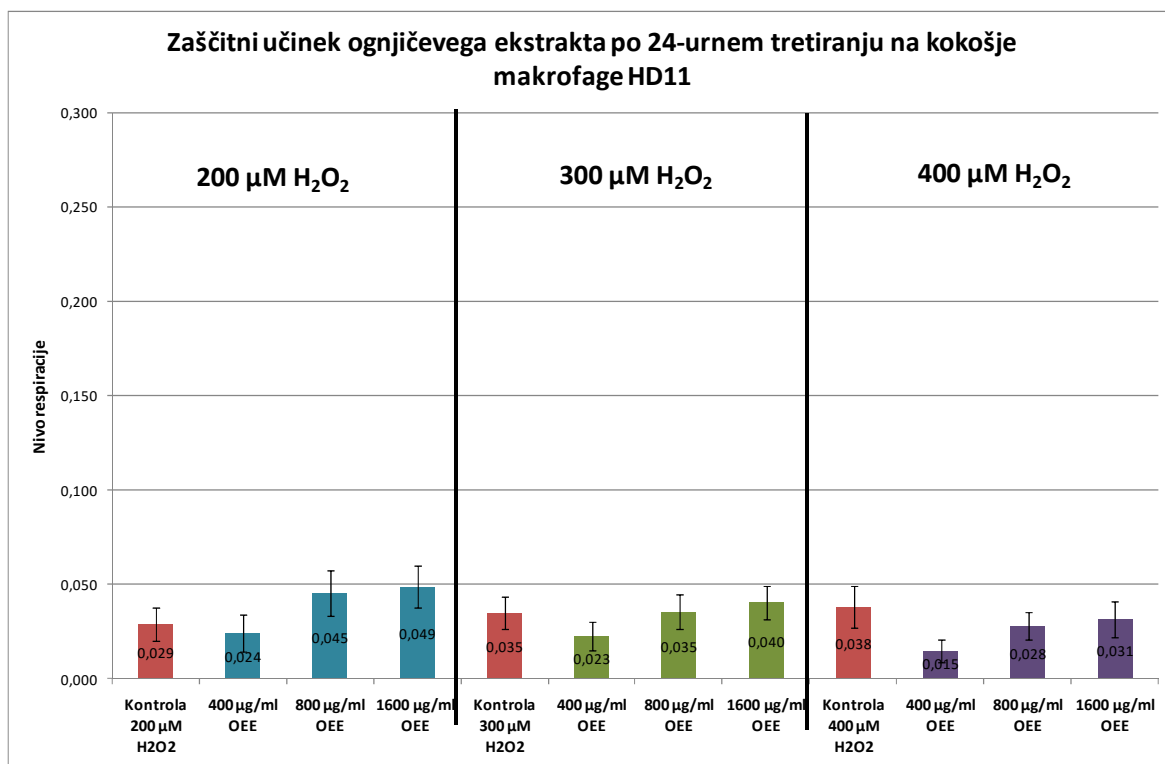
Slika 31: Popravljalno delovanje etanalnega ognjičevega ekstrakta – OEE na celice v oksidativnem stresu po 24-urnem tretiranju. Posamezno skupino vzorcev tretirano z neko koncentracijo H₂O₂ in OEE, smo s t–testom primerjali s kontrolo tretirano z enako koncentracijo H₂O₂. Simbol * označuje podatke, kjer je t–test podal vrednosti $p \leq 0,05$.



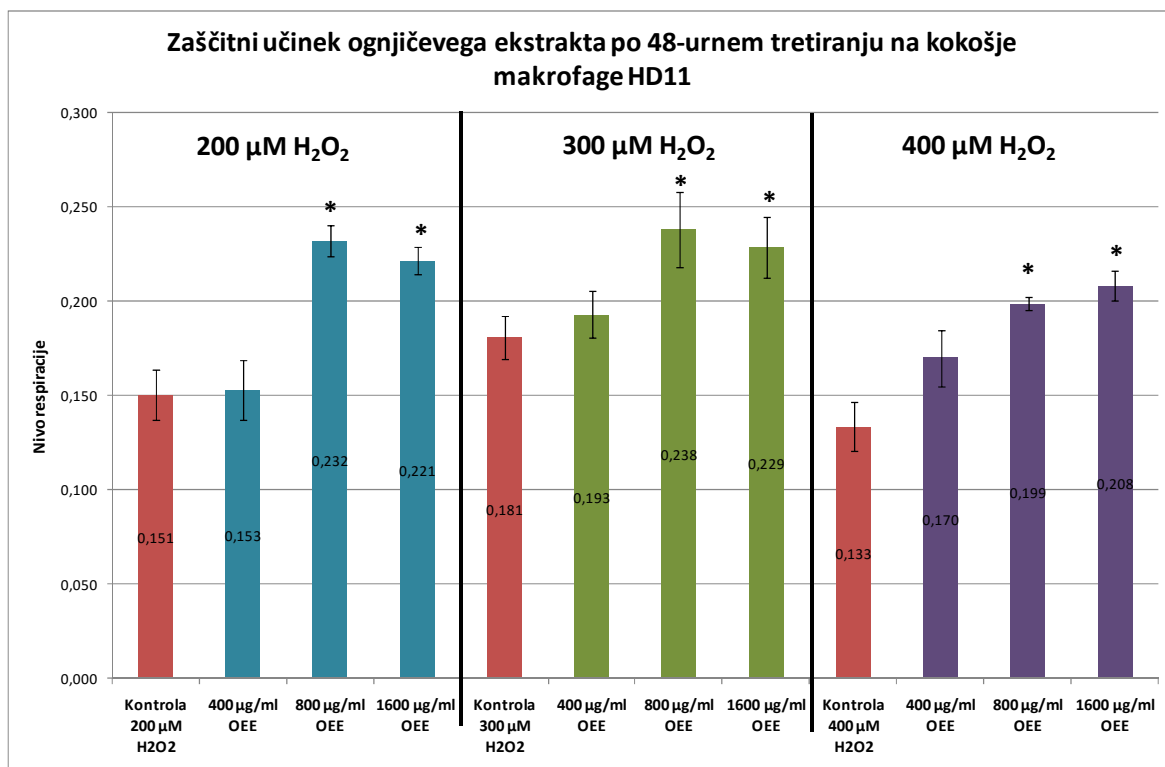
Slika 32: Popravljalno delovanje etanalnega ognjičevega ekstrakta – na celice v oksidativnem stresu OEE po 48-urnem tretiranju. Posamezno skupino vzorcev tretirano z neko koncentracijo H₂O₂ in OEE, smo s t–testom primerjali s kontrolo tretirano z enako koncentracijo H₂O₂. Simbol * označuje podatke, kjer je t–test podal vrednosti $p \leq 0,05$.

Po prvem glavnem poskusu smo opravili še naslednjega, kjer smo obrnili vrstni red in smo tako opazovali preventivni oz. zaščitni efekt ekstrakta. Celice smo najprej za 24 h in 48 h tretirali z OEE, nato pa za 1 h izpostavili oksidativnemu stresu H_2O_2 . Takoj po 1 h smo celice tretirali še z reagentom XTT in nato pridobili rezultate. Pričakovali smo, da bodo vzorci, tretirani tako z OEE kot H_2O_2 , imeli višji nivo respiracije (na račun večjega števila celic) kot pa kontrola H_2O_2 , kjer smo celice izpostavili le H_2O_2 . Pričakovali smo tudi, da bo ta efekt časovno odvisen, torej da bo daljša izpostavitvev OEE imela boljše zaščitno delovanje. Glede na to, da je ta poskus temeljil na raziskavi Alnuqaydan-a in sod. (2015), smo pričakovali, da se bo učinek najbolje prikazal pri koncentraciji 800 $\mu\text{g/ml}$ OEE, saj je njihova raziskava pokazala, da je ta koncentracija najbolj učinkovita. Rezultati so prikazani na slikah 33 in 34.

Tako kot pri prejšnjem poskusu tudi iz rezultatov sledečega poskusa (Slika 33) nismo mogli ničesar sklepati, saj med podatki ni bilo očitnih razlik. Poleg tega pa t-test ni podal nobenih vrednosti $p \leq 0,05$, kar pomeni, da med rezultati ni statistično značilnih razlik. Pri rezultatih na sliki 34 pa se že nakazuje zaščitno delovanje OEE. Namreč v primerjavi s kontrolo H_2O_2 imajo vzorci višji nivo respiracije, poleg tega pa so te razlike pri koncentracijah 800 $\mu\text{g/ml}$ in 1600 $\mu\text{g/ml}$ statistično značilno različne.



Slika 33: Zaščitno delovanje etanolnega ognjičevega ekstrakta – OEE na celice pred oksidativnim stresom po 24-urnem tretiranju. Posamezno skupino vzorcev (tretirano z neko koncentracijo H_2O_2 in OEE), smo s t-testom primerjali s kontrolo tretirano z enako koncentracijo H_2O_2 . Simbol »*« označuje podatke, kjer je t-test podal vrednosti $p \leq 0,05$.



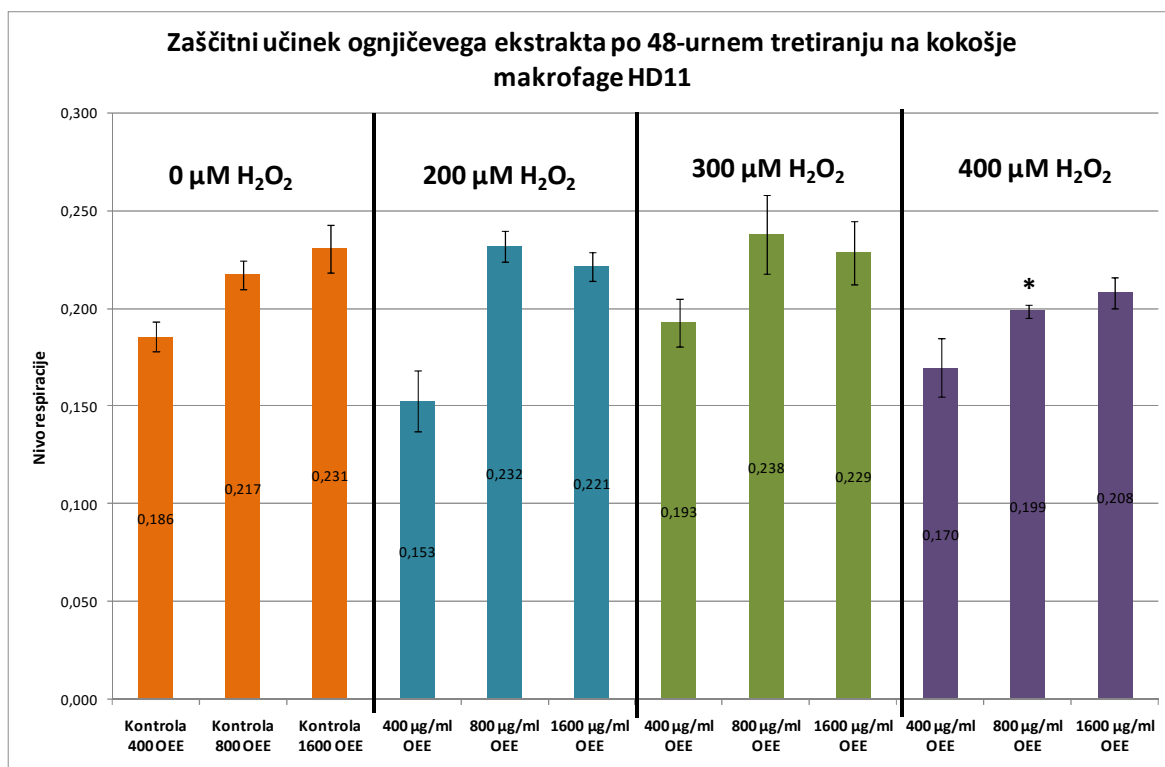
Slika 34: Zaščitno delovanje etanalnega ognjičevega ekstrakta – OEE na celice HD11 pred oksidativnim stresom po 48-urnem tretiranju. Posamezno skupino vzorcev (tretirano z neko koncentracijo H₂O₂ in OEE) smo s t–testom primerjali s kontrolo tretirano z enako koncentracijo H₂O₂. Simbol »*« označuje podatke, kjer je t–test podal vrednosti $p \leq 0,05$.

Preden pa smo lahko iz rezultatov na sliki 34 kaj sklepali, nas je zanimalo, ali je prikazana razlika, v nivoju respiracije pri koncentracijah 800 µg/ml in 1600 µg/ml posledica večjega števila celic ali le stresa celic zaradi OEE in z njim povišanega nivoja dehidrogenaze. Namreč v preliminarnem poskusu XTT (Poglavje 4.2.2) in preliminarnem poskusu viabilnosti (Poglavje 4.1.2.3) sta prav ti dve koncentraciji povzročala stres in škodo na celicah, zato je tudi učinek na nivo respiracije v tem poskusu vprašljiv.

Zato smo na rezultatih iz slike 34 opravili še en test, in sicer smo vzorce (tretirani tako s H₂O₂ kot tudi z OEE) primerjali s kontrolo, ki je bila tretirana le z OEE. Vsako kontrolo tretirano z neko koncentracijo OEE smo s t–testom primerjali z vzorcem tretirano z enako koncentracijo OEE. Rezultati te primerjave pa so prikazani na sliki 35.

Po primerjavi podatkov na sliki 35 je t–test povsod pokazal, da gre za statistično podobne rezultate med kontrolo in vzorci, razen pri enem. To je bil vzorec tretiran z 800 µg/ml OEE in nato še s 400 µM H₂O₂. Glede na to, da so bile vrednosti nivoja respiracije vzorcev podobne vrednostim kontrol (brez H₂O₂), lahko sklepamo, da se je na sliki 34 pri teh koncentracijah nivo respiracije zvišal na račun stresa, v katerem so bile celice zaradi OEE. Le pri že omenjenem vzorcu, kjer pa je bila statistično značilna razlika od kontrole OEE, bi

lahko rekli, da ta koncentracija v tem vzorcu ni povzročila tolikšnega stresa na celicah in se je nivo respiracije na sliki 34 zvišal na račun večjega števila celic. Vendar, ker gre le za en tak primer in ker ta statistično značilna razlika ni tolikšna ($p = 0,04$), bi v splošnem težko lahko govorili o dejanskem zaščitnem učinku OEE na celice.



Slika 35: Zaščitno delovanje OEE po 48-urnem tretiranju na celice HD11 pred oksidativnim stresom. Vzorce (tretirane tako s H₂O₂ kot tudi z OEE) smo s t–testom primerjali s kontrolo tretirano samo z OEE. Simbol »*« označuje podatke, kjer je t–test podal vrednost $p \leq 0,05$.

Rezultati poskusov o vplivu ognjičevega ekstrakta na viabilnosti in nivo respiracije celic HD11 so pokazali, da ima sam ognjičev ekstrakt lahko tudi negativen učinek na celice. Ta učinek je odvisen od razmerja in količine aktivnih sestavin v ekstraktu, na katerega vpliva topilo za ekstrahiranje teh snovi. Tako je bil OPGE citotoksičen za celice pri nižjih koncentracijah (25 μg/ml) kot pa OEE (800 μg/ml). Prvo hipotezo o vplivu topila na delovanje ekstraktov smo tako potrdili, drugo hipotezo pa le delno, saj so lahko toksične tudi nižje koncentracije ognjičevega ekstrakta. Te ugotovitve smo potrdili tudi s testom XTT.

Glavni poskusi o antioksidativnih lastnostih OEE so sicer nakazali, da lahko popravi škodo po oksidativnem stresu in izboljša viabilnost celic, vendar ta porast v številu celic ni bil statistično značilen. Pri testiranju antioksidativnih lastnosti OEE s testom XTT se je izkazalo, da OEE ne vpliva na regeneracijo in popraviljanje škode po oksidativnem stresu. Pri poskusu o zaščitnem delovanju OEE preden smo celice izpostavili oksidativnemu

stresu, se je pojavil porast nivoja respiracije pri koncentracijah 800 $\mu\text{g/ml}$ in 1600 $\mu\text{g/ml}$ (v primerjavi s kontrolo pod stresom, brez OEE). Analiza rezultatov pa je pokazala, da je do tega zvišanja prišlo zaradi stresa, ki ga je povzročil OEE, saj so prejšnji rezultati o vplivu OEE na celice pokazali, da je OEE nad koncentracijo 800 $\mu\text{g/ml}$ škodljiv za celice. Tako smo tretjo in četrto hipotezo ovrgli, saj nismo uspeli dokazati antioksidativnih lastnosti ognjičevega ekstrakta.

5 SKLEPI

V raziskovalni nalogi smo testirali vpliv ognjičevega ekstrakta na kokošje makrofage HD11 v pogojih *in vitro*. Preverili smo, ali ima sam ekstrakt kakšen učinek na celice in ali ima antioksidativne lastnosti. V poskusih smo uporabili ognjičev ekstrakt, ki je bil raztopljen v dveh različnih topilih: EtOH in PG. Tako smo hkrati tudi preverili, ali topilo vpliva na delovanje ekstraktov in s tem tudi na celice HD11.

Preden smo se lahko lotili glavnih poskusov, smo morali določiti orientacijske vrednosti koncentracij tako H_2O_2 kot tudi obeh ekstraktov. S tem smo želeli ugotoviti, kateri koncentracijski razpon H_2O_2 in obeh ekstraktov bi bil primeren za naš glavni poskus. Pri H_2O_2 smo želeli določiti take koncentracije, ki bi celicam povzročile srednje močan oksidativni stres, pri katerem bi določen delež celic propadel, preživele pa bi se lahko same (v glavnem poskusu pa s pomočjo ekstrakta) regenerirale in prešle v homeostazo. Pri ekstraktu in njegovih dveh topilih smo želeli določiti take koncentracije, ki celicam ne bi škodovali. Iz literature smo namreč razbrali, da imajo lahko ognjičevi ekstrakti tudi citotoksičen učinek na celice.

Pri preliminarnih poskusih o delovanju H_2O_2 na celice HD11 smo opazili koncentracijski in časovno odvisni vpliv na viabilnost celic, pri čemer sta višja koncentracija in daljša izpostavitve zmanjšala viabilnost. Za nadaljnje poskuse smo na podlagi preliminarnih poskusov uporabili H_2O_2 v koncentracijah 200 μM , 300 μM , 400 μM , 800 μM in 1600 μM .

Pri preliminarnih poskusih o vplivu ognjičevega ekstrakta v dveh topilih smo ravno tako opazili časovno in koncentracijsko odvisen učinek na viabilnost celic HD11. OPGE je bil citotoksičen že pri koncentraciji 25 $\mu g/ml$, medtem ko je bil OEE toksičen šele pri koncentraciji 800 $\mu g/ml$. S tem smo potrdili našo prvo hipotezo, da topilo vpliva na delovanje ognjičevega ekstrakta, hkrati pa delno potrdili drugo hipotezo, saj ima ognjičev ekstrakt lahko citotoksičen učinek tudi pri nižjih koncentracijah. Pri teh poskusih smo opazili tudi to, da topila PG in EtOH sama ne vplivata na viabilnost celic HD11. Iz tega smo sklepali, da je ognjičev ekstrakt v posameznem topilu citotoksičen, a ne na račun topila samega, ampak zaradi snovi, ki jih posamezno topilo ekstrahira iz rastlinskega materiala. OPGE je tako za celice bolj toksičen, ker je topilo PG iz rastlinskega materiala izločilo snovi v takem razmerju in koncentraciji, ki je za celice neugoden. Glede na rezultate preliminarnih poskusov smo za nadaljnje poskuse uporabili le OEE, in sicer v koncentracijah 100 $\mu g/ml$, 400 $\mu g/ml$, 800 $\mu g/ml$ in 1600 $\mu g/ml$.

Pri glavnem poskusu o popravljalnem delovanju OEE na viabilnost celic HD11 smo celice najprej izpostavili oksidativnemu stresu s 1600 μM H_2O_2 , nato pa jih tretirali s 100 $\mu g/ml$ OEE. Pričakovali smo, da bo ekstrakt pripomogel k hitrejšemu okrevanju celic po

oksidativnemu stresu v primerjavi s kontrolo, kjer so se po stresu regenerirale same. Pri tem poskusu se je sicer pokazal popravljalni učinek OEE, vendar le-ta ni bil statistično značilen. Pri ponovitvi tega poskusa z nižjo koncentracijo H_2O_2 nismo dobili pričakovanih rezultatov, zato smo, namesto vpliva ekstrakta na viabilnost celic HD11, preverili vpliv ekstrakta na nivo respiracije celic.

Za merjenje nivoja respiracije smo uporabili test XTT, ki temelji na količini mitohondrijske dehidrogenaze v celici, preko katere se rumeno obarvani reagent XTT reducira v oranžno obarvan formazanov derivat. S fotometrom smo nato izmerili absorbanco vzorcev, ki posredno kaže na nivo respiracije celic.

S preliminarnim testom XTT smo želeli testirati vpliv ognjičevega ekstrakta na celice HD11 v treh različnih topilih: OPGE v propilen glikolu, OEE v etanolu in OFR v fiziološki raztopini. Rezultati poskusa so pokazali, da je OPGE povzročil dvig nivoja respiracije, medtem ko sta OEE in OFR ohranili nizek nivo. Glede na to, da so rezultati preliminarnega poskusa o vplivu OPGE na viabilnost celic pokazali, da OPGE deluje citotoksično, smo sklepali, da je dvig respiracije nastal kot posledica negativnega delovanja ekstrakta na celice in ne na račun pomnoževanja celic. Pri OEE in OFR je nivo respiracije narastel le pri dveh najvišjih koncentracijah 800 $\mu\text{g/ml}$ in 1600 $\mu\text{g/ml}$.

V glavnem testu XTT smo testirali zaščitni in popravljalni učinek OEE na celice po oksidativnemu stresu in pred njim. Pri poskusu o popravljalnem učinku smo celicam najprej s H_2O_2 povzročili oksidativni stres, nato pa jih tretirali z OEE. Rezultati so pokazali, da OEE ne pripomore k hitrejšemu in boljšemu okrevanju celic po oksidativnem stresu, saj ni bilo večji razlik v nivoju respiracije med vzorci in kontrolo, ki se je regenerirala brez OEE. Tako smo tretjo hipotezo ovrgli, saj smo predvidevali, da se bodo celice z ognjičevim ekstraktom uspešno regenerirale po oksidativnem stresu.

Pri poskusu o zaščitnem vplivu smo celice najprej izpostavili OEE, nato pa jih za krajši čas izpostavili H_2O_2 in oksidativnemu stresu. Tu so rezultati nakazovali, da lahko OEE (koncentraciji 800 $\mu\text{g/ml}$ in 1600 $\mu\text{g/ml}$) uspešno zaščiti celice pred oksidativnim stresom, saj so vzorci imeli statistično značilen višji nivo respiracije od kontrole tretirane le s H_2O_2 . Ker pa smo pri preliminarnem testu XTT opazili, da lahko že sam OEE pri teh koncentracijah povzroči dvig respiracije celic, smo vzorce primerjali s kontrolo, ki je bila tretirana le z OEE, brez oksidativnega stresa. Analiza rezultatov je pokazala, da so si vrednosti vzorcev in kontrole podobni, razen pri vzorcu tretiranim z 800 $\mu\text{g/ml}$ OEE in 400 μM H_2O_2 , kjer je t-test pokazal statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo. Iz tega smo nato sklepali, da OEE nima zaščitnega učinka pred oksidativnim stresom, saj se je nivo respiracije pri poskusu dvignil na račun stresa, ki ga je izzval OEE. S tem smo ovrgli tudi četrto hipotezo, kjer smo predvidevali, da bo ognjičev ekstrakt celice uspešno zaščitil pred oksidativnim stresom.

6 POVZETEK

Z letom 2006, ko je Evropska unija prepovedala uporabo antibiotikov v krmi za rejne živali, so se znanstvene raziskave preusmerile v iskanje naravnih prehranskih dodatkov, s katerimi bi izboljšali zdravje in produktivnost rejnih živali. S tovrstno preventivo bi lahko izboljšali imunski sistem živali in jim dvignili odpornost proti različnim stresnim dejavnikom. V vsakemu organizmu konstantno potekajo številni celični procesi, ki so povezani med sabo v kompleksen celičen metabolizem. Ene izmed teh procesov so tudi redoks reakcije, kjer gre za oddajanje in sprejemanje elektronov med oksidanti in reducenti. V teh reakcijah nastajajo prosti radikali, ki so zelo reaktivni. Za celico in njeno delovanje so sicer nujno potrebni, vendar lahko zaradi različnih zunanjih dejavnikov pride do prekomernega nastajanja prostih radikalov, ki se nato lahko vežejo tudi na nukleinske kisline, proteine, lipide itd. Posledično lahko pride do mutacij v genskem zapisu, spremenjene aktivnosti in funkcij encimov in do poškodb membrane. Najbolj pogosti prosti radikali so reaktivne kisikove spojine ali ROS, ki nato s svojimi reakcijami povzročajo oksidativni stres.

Celica se lahko pred oksidativnim stresom tudi brani, in sicer s pomočjo popravljalnih sistemov in lovilcev prostih radikalov, v skrajnem primeru pa celica preide v apoptozo. Antioksidanti so sestavni del obrambe pred oksidativnim stresom in so vedno prisotni v celicah. S tem ko oddajo svoj elektron oksidantom, jih nevtralizirajo in tako postanejo neškodljivi za celico. Največ antioksidantov se nahaja v različnih rastlinah, kjer lahko najdemo fenolne spojine (tokoferoli, flavonoidi, fenolne kisline) in različne pigmente npr. karotenoide. Za vse našete spojine so dokazali, da imajo različne aktivnosti: protivnetno, protibakterijsko, protivirusno, protiglivično in protirakavo delovanje. Iz tovrstnih zdravilnih rastlin in začimb te snovi največkrat ekstrahiramo v koncentrirane ekstrakte, za katera se uporabljajo različna polarna topila. Najpogosteje se uporabljajo mešanice vodnih in alkoholnih topil, saj na ta način izločimo tako vodotopne kot tudi lipidotopne snovi.

Zdravilni ognjič (*Calendula officinalis*) je zdravilna rastlina, ki ima več stoletij dolgo tradicijo uporabe. Iz cvetov ognjiča se pripravljajo alkoholne tinkture in mazila, ki jih lahko uporabljamo za celjenje ran, pri podplutbah, oteklinah, ozeblinah, opeklinah in pri suhi ter vneti koži. Uporablja se tudi ognjičev čaj za želodčne in črevesne težave.

Znanstvene raziskave *in vivo* in *in vitro* so do zdaj dokazale, da ognjičev ekstrakt deluje protivnetno, protivirusno, imunostimulatorno, antigenotoksično in antioksidativno. To delovanje omogočajo flavonoidi in karotenoidi, ki se nahajajo v cvetovih ognjiča.

V raziskovalni nalogi smo uporabili ognjičev ekstrakt raztopljen v dveh topilih: etanol (EtOH) in propilen-glikol (PG). Najprej smo testirali vpliv posameznega ekstrakta in topila na viabilnost kokošnjih makrofagov HD11. Predvidevali smo, da bodo šele višje

koncentracije ekstraktov imele negativen učinek na viabilnost. Poleg tega pa smo pričakovali, da bomo opazili razlike med učinki ekstrakta v enem in drugem topilu. OPGE je bil za celice toksičen pri koncentraciji 25 µg/ml, OEE pa je bil toksičen pri koncentraciji 800 µg/ml. Nobeno izmed topil ni imelo vpliva na viabilnost celic HD11. S tem poskusom smo potrdili prvo hipotezo, ki pravi, da topilo vpliva na delovanje ekstrakta. Hkrati pa smo delno potrdili tudi drugo hipotezo, kjer smo predvidevali, da bodo le višje koncentracije ekstrakta citotoksične, kar je veljalo le za OEE.

Zaradi citotoksičnosti OPGE smo za nadaljnje poskuse uporabili le OEE. Testirali smo popravljalne učinke OEE na celice HD11, ki so bile izpostavljene oksidativnemu stresu. Celice smo najprej tretirali s H₂O₂ in povzročili oksidativni stres, nato pa smo jih izpostavili OEE. Rezultati so sicer nakazovali, da se celice boljše regenerirajo po stresu ob dodatku OEE, vendar analiza ni podala statistično značilnih rezultatov. Tudi ponovitev poskusa z nižjo koncentracijo ni podala pričakovanih rezultatov, zato smo namesto vpliva na viabilnost testirali vpliv ognjičevega ekstrakta na nivo respiracije.

Za določanje nivoja respiracije smo uporabili test XTT. Celice smo najprej izpostavili samo ognjičevemu ekstraktu, ki je bil raztopljen v EtOH, PG in fiziološki raztopini (FR). S tem smo želeli preveriti, ali bodo posamezni ekstrakti in topila imela vpliv na nivo respiracije. Rezultati so pokazali, da se je nivo respiracije pri OPGE bistveno zvišal v primerjavi z OEE in OFR, kjer je nivo respiracije ostal nizek do koncentracije 800 µg/ml. Glede na rezultate iz poskusa o vplivu na viabilnost smo sklepali, da je ta dvig respiracije nastal na račun toksičnosti OPGE in ne na račun večjega števila celic. V stresnih okoliščinah se lahko v celicah poveča količina proizvedenega encima mitohondrijske dehidrogenaze, ki v testu XTT reducira več reagenta XTT, kar se posledično pokaže kot dvig nivoja respiracije.

S pomočjo testa XTT smo želeli preveriti, ali ima OEE antioksidativne lastnosti, pri čemer smo testirali tako zaščitni kot tudi popravljalni učinek OEE na oksidativni stres. Celice HD11 smo tretirali s H₂O₂, da smo povzročili oksidativni stres, nato pa smo jih izpostavili OEE in jih opazovali. Pričakovali smo, da se bodo celice boljše in hitreje regenerirale ob dodatku OEE, kar se bo pokazalo kot višji nivo respiracije v primerjavi s kontrolo, kjer smo celice pustili, da se po oksidativnem stresu regenerirajo same. Rezultati so pokazali, da OEE ne vpliva na hitrejšo regeneracijo celic po stresu, saj je bil nivo respiracije pri vzorcih ponekod celo nižji od kontrole.

Za poskus o zaščitnem delovanju OEE pa smo celice HD11 najprej za dalj časa izpostavili OEE, nato pa smo jih za krajši čas tretirali s H₂O₂, da so bile celice pod stresom. Pričakovali smo, da bo OEE uspel zaščititi celice pred poškodbami in odmiranjem zaradi oksidativnega stresa. Tu smo dobili pričakovane rezultate, saj je bil nivo respiracije pri vzorcih višji kot pri kontroli, ki ni bila tretirana z OEE. Ker pa smo iz preliminarne testa

XTT opazili, da lahko že sam OEE povzroči dvig respiracije, smo pri glavnem poskusu rezultate vzorcev primerjali s kontrolo, ki je bila tretirana samo z OEE, brez oksidativnega stresa. Tu je statistična analiza podatkov pokazala, da so si rezultati vzorcev in kontrol OEE podobni med sabo, torej se je v celicah nivo respiracije dvignil ne na račun zaščitnega efekta celic in s tem večjega števila celic, ampak na račun stresa, ki ga je povzročil sam OEE.

Tako smo tretjo in četrto hipotezo, kjer smo predvidevali, da bo ognjičev ekstrakt uspel popraviti škodo oz. zaščititi celice pred oksidativnim stresom, ovrgli. Zaključimo lahko, da uporabljeni ognjičev ekstrakt ni pokazal pričakovanega antioksidativnega delovanja.

7 VIRI

- Alnuqaydan A. M., Lenehan C. E., Hughes R. R., Sanderson B. J. 2015. Extracts from *Calendula officinalis* Offer *in Vitro* Protection Against H₂O₂ Induced Oxidative Stress Cell Killing of Human Skin Cells. *Phytotherapy Research*, 29: 120–124
- Arana L., Salado C., Vega S., Aizpurua-Olaizola O., Arada I., Suarez T., Usobiaga A., Arrondo J. L. R., Alonso A., Goñi F. M., Alkorta I. 2015. Solid lipid nanoparticles for delivery of *Calendula officinalis* extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135: 18–26
- Armstrong G. A., Hearst J. E. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 10: 228–237
- Auldridge M. E., McCarty D. R., Klee H. J. 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 315–321
- Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. 2005. Bruselj, Evropska komisija.
http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm (10. junij 2016)
- Basu S., Eriksson M. 2000. Vitamin E in relation to lipid peroxidation in experimental septic shock. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 62, 3: 195–199
- Beug H., von Kirchbach A., Döderlein G., Conscience J. F., Graf T. 1979. Chicken Hematopoietic Cells Transformed by Seven Strains of Defective Avian Leukemia Viruses Display Three Distinct Phenotypes of Differentiation. *Cell*, 18: 375–390
- Benhusein G. M., Mutch E., Aburawi S., Williams F. M. 2010. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*, 5: 4637–4642
- Boveris A., Chance B. 1973. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134: 707–716
- Butnariu M., Coradini C. Z. 2012. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry. *Chemistry Central Journal*, 6, 35: 1–7

- Ćetković G. S., Đilas S. M., Čanadanović-Brunet J. M., Tumbas V. T. 2003. Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of Marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts. *Acta Periodica Technologica*, 34: 93–102
- Ćetković G. S., Đilas S. M., Čanadanović-Brunet J. M., Tumbas V. T. 2004. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International*, 37: 643–650
- Davies K. J. A. 2000. Oxidative Stress, Antioxidant Defences, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life Journal*, 50: 279–289
- Deaton C. M., Marlin D. J., Smith N. C., Harris P. A., Schroter R. C., Kelly F. J. 2004. Antioxidant Supplementation in Horses Affected by Recurrent Airway Obstruction. *The Journal of Nutrition*, 134: 2065–2067
- Denton R. M. 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787: 1309–1315
- Dröge W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82: 47–95
- Đilas S. M., Čanadanović-Brunet J. M., Ćetković G. S. 2002. Antioxidants in food. *Chemical Industry*, 56, 3: 105–112
- Finkel T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 10:248–253
- Finkel T., Holbrook N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408: 239–247
- Fonseca Y. M., Catini C. D., Vicentini F. T. M. C., Cardoso J. C., Cavalcanti Jr. R. L. A., Fonseca M. J. V. 2011. Efficacy of Marigold Extract-Loaded Formulations against UV-induced Oxidative Stress. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 6: 2182–2193
- Fonseca M. Y., Catini C. D., Vicentini F. T. M. C., Nomizo A., Gerlach R. F., Fonseca M. J. V. 2010. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 127: 596–601

- Frankič T., Salobir K., Salobir J. 2008. The comparison of *in vivo* antigenotoxic and antioxidative capacity of two propylene glycol extracts of *Calendula officinalis* (marigold) and vitamin E in young growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93: 688–694
- Frankič, T., Voljč M., Salobir J., Rezar V. 2009. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae Slovenica*, 94, 2: 95–102
- Fronza M., Henizmann B., Hamburger M., Laufer S., Merfort I. 2009. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 126: 463–467
- Garrett R. H., Grisham C. M. 2010. *Biochemistry*, 4th Edition. Boston, Brooks/Cole, Cengage Learning: 1183 str.
- Gong Y., Liu X., He W. H., Xu H. G., Yuan F., Gao Y. X. 2012. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia*, 83: 481–489
- Greathead H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 279–290
- Hadfield R. A., Vlahovic T. C., Khan M. T. 2008. The Use of Marigold Therapy for Podiatric Skin Conditions. *The Foot and Ankle Journal*, 1, 7: 1–8
- Hamburger M., Adler S., Baumann D., Förg A., Weinreich B. 2003. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*, 74: 328–338
- Havsteen B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32, 7: 1141–1148
- Ishemična nekroza mišic. 2005. Medeno srce.
<http://www.medenosrce.net/predmeti/patolo%C5%A1ka-fiziologija/328-seminarji/848-2005-02-28-ishemicna-nekroza-misic--povzetek-in-prezentacija-> (12. junij 2016)
- Jiménez-Medina E., Garcia-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A., Garrido F. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BioMedCentral Cancer*, 6, 119: 1–14

- Kalvatchev Z., Walder R., Garzaro D. 1997. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 51: 176–180
- Kemper K. J. 1999. *Calendula (Calendula officinalis)*. The Longwood Herbal Task Force. <http://www.longwoodherbal.org/calendula/calendula.pdf> (7. maj 2016)
- Kishimoto S., Maoka T., Sumitomo K., Ohmiya A. 2005. Analysis of Carotenoid Composition in Petals of *Calendula officinalis* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69, 11: 2122–2128
- Kowaltowski A. J., de Souza-Pinto N. C., Castilho R. F., Vercesi A. E. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 47: 333–343
- Lah B., Malovrh S., Narat M., Cepeljnik T., Marinšek-Logar R. 2004. Detection and Quantification of Genotoxicity in Wastewater-Treated *Tetrahymena thermophila* Using the Comet Assay. *Environmental Toxicology*, 19: 545–553
- Larson R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 4: 969–978
- Lauritzen B., Lykkesfeldt J., Friis C. 2005. Evaluation of a single dose versus a divided dose regimen of amoxicillin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Research in Veterinary Science*, 79: 61–67
- Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J. A., Robinson J. P. 2003. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 10: 8516–8525
- Luna Bright Field Automated Cell Counter, Luna-BF. 2014. VitaScientific. <https://www.vitascientific.com/luna-bright-field-automated-cell-counter-luna-bf-110001.html> (23. junij 2016)
- Lu S., Li L. 2008. Carotenoid Metabolism: Biosynthesis, Regulation, and Beyond. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 7: 778–785
- Lykkesfeldt J., Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173. 502–511
- Lykkesfeldt J., Viscovich M., Poulsen H. E. 2003. Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 11: 1439–1447

- Mascotti K., McCullough J., Burger S. R. 2000. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*, 40: 693–696
- Majes J. 2011. *Zdravnik zdravi, narava ozdravi*. Dolenjske Toplice, samozaložba: 240 str.
- Miliauskas G., Venskutonis P. R., van Beek T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231–237
- Muller F. L., Lustgarten M. S., Jang Y., Richardson A., van Remmen H. 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43: 477–503
- Müller R. H., Hildebrand G. E. 1998. *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*. 2. izdaja. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: 471 str.
- Neukirch H., D'Ambrosio M., Via J. D., Guerriero A. 2004. Simultaneous Quantitative Determination of Eight Triterpenoid Monoesters from Flowers of 10 Varieties of *Calendula Officinalis* L. and Characterization of a New Triterpenoid Monoester. *Phytochemical Analysis*, 15: 30–35
- Nordberg J., Arnér E. S. J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 11: 1287–1312
- Parente L. M. L., Júnior R. S. L., Tresvenzol L. M. F., Vinaud M. C., Paula J. R., Paulo N. M. 2012. Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1–7
- Payne C. M., Bernstein C., Bernstein H. 1995. Apoptosis Overview Emphasizing the Role of Oxidative Stress, DNA Damage and Signal-Transduction Pathways. *Leukemia and Lymphoma*, 19: 43–93
- Pérez-Carreón J. I., Cruz-Jiménez G., Licea-Vega J. A., Popoca E. A., Fazenda S. F., Villa Treviño S. 2002. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicology in Vitro*, 16: 253–258
- Piccaglia R., Marotti M., Chiavari G., Gandini N. 1997. Effects of Harvesting Date and Climate on the Flavonoid and Carotenoid Contents of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 85–90

- Pintea A., Bele C., Andrei S., Socaciu C. 2003. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis*, 47: 37–40
- Poulsen H. E. 2005. Oxidative DNA modifications. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57: 161–169
- Preethi K. C., Kuttan G., Kuttan R. 2009. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 113–120
- Preethi K. C., Kuttan G., Kuttan R. 2006. Antioxidant Potential of an Extract of *Calendula officinalis* Flowers *in Vitro* and *in Vivo*. *Pharmaceutical Biology*, 44, 9: 691–697
- Raal A., Kirsipuu K. 2011. Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Natural Product Research*, 25, 6: 658–662
- Roehm N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasebrook A. L. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142: 257–265
- Rosignoli P., Fabiani R., De Bartolomeo A., Spinozzi F., Agea E., Pelli M. A., Morozzi. 2001. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis*, 22, 10: 1675–1680
- Sabir S. M., Khan M. F., Rocha J. B. T., Boligon A. A., Athayde M. L. 2015. Phenolic profile, antioxidant activities and genotoxic evaluations of *Calendula officinalis*. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 316–324
- Sausserde R., Kampuss K. 2014. Composition of carotenoids in *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) flowers. V: 9th Baltic Conference on Food Science and Technology »Food for consumer well-being. Foodbalt 2014, Jelgava, 8-9 maj 2014. Rakcejeva T., Hampshire J., Hansen A. S., Karklina D., Lantto R., Shleikin A., Talou T., Venskutonis R., Vokk R., Yalcin E., Straumite E. (eds.). Jelgava, Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology: 13–18
- Saxena M. J. 2008. Herbs – a safe and scientific approach. *International Poultry Production*, 16, 2: 11–13

Silva E. J. R., Goncalves E. S., Aguiar F., Evêncio L. B., Lyra M. M. A., Coelho M. C. O. C., Fraga M. C. C. A., Wanderley A. G. 2007. Toxicological Studies on Hydroalcohol Extract of *Calendula officinalis* L. *Phytotherapy Research*, 21: 332–336

Sultana B., Anwar F., Ashraf M. 2009. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*, 14: 2167–2180

Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A. R., Simonič M., Knez Ž. 2005. Phenols proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89: 191–198

Treben M. 1980. *Zdravje iz Božje lekarne nasveti in izkušnje z zdravilnimi zelišči*. Celje, Založba Mavrica: 105 str.

Ukiya M., Akihisa T., Yasukawa K., Tokuda H., Suzuki T., Kimura A. 2006. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers. *Journal of Natural Products*, 69, 12: 1692–1696

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44–84

Wallace D. C. 2005. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *The Annual Review of Genetics*, 39: 359–407

Willfort R. 1988. *Zdravilne rastline in njih uporaba*. Maribor, Založba Obzorja: 508 str.

Wintzen M., Donker A. S., van Zuuren E. J. 2003. Recalcitrant atopic dermatitis due to allergy to Compositae. *Contact Dermatitis*, 48: 87–88

ZAHVALA

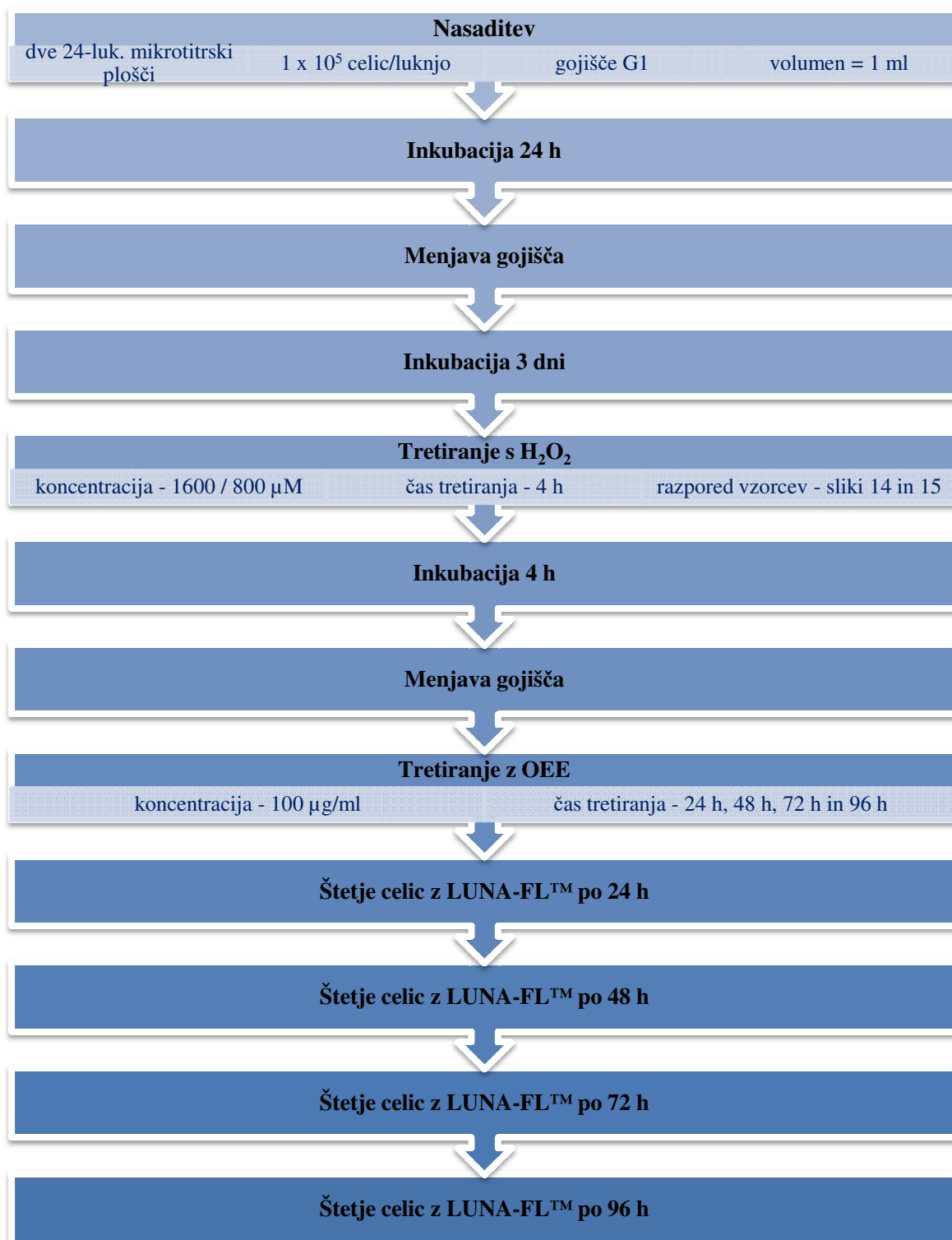
Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat za ves trud, pomoč in potrpežljivost pri izvedbi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem tudi doc. dr. Vidi Rezar za priskrbo ognjičevih ekstraktov ter za njen čas in vse nasvete med raziskovalnim delom. Zahvaljujem se tudi sodelavcem v celičnem laboratoriju za vse spodbudne besede, nasvete in pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala recenzentu prof. dr. Roku Kostanjšku za hiter in natančen pregled magistrske naloge ter vse koristne napotke. Zahvala gre tudi prof. Sonji Lenarčič za lektoriranje in spodbudne besede.

Posebna zahvala pa gre moji družini in prijateljem, ki so me v tem času vztrajno podpirali in spodbujali.

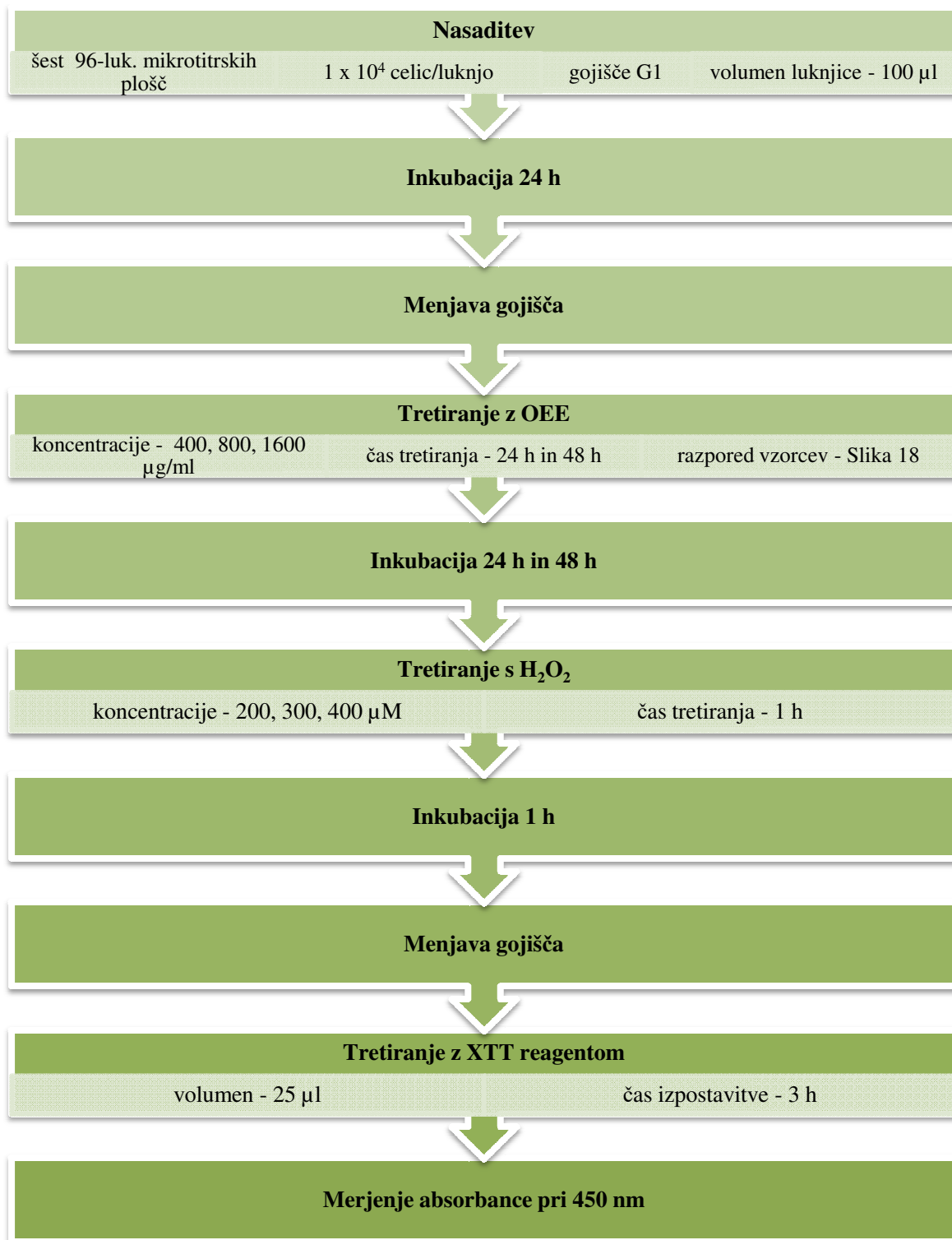
PRILOGA A

Shematični prikaz poteka poskusa o popravljalnem delovanju OEE na HD11 po oksidativnem stresu povzročenim s H₂O₂



PRILOGA B

Shematični prikaz poteka XTT poskusa o zaščitnem delovanju OEE na HD11 pred oksidativnim stresom povzročenim s H₂O₂



PRILOGA C

Shematični prikaz poteka XTT poskusa o popravljalnem delovanju OEE na HD11 po oksidativnem stresu povzročenim s H₂O₂

