

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Anja KAVČIČ

**VPLIV IZVLEČKOV IZ LUBJA BELE JELKE IN
OBMORSKEGA BORA NA FLUORESCENCO
ŽIVIH CELIC Z IZRAŽENIM ZELENIH
FLUORESCENČNIM PROTEINOM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Anja KAVČIČ

**VPLIV IZVLEČKOV IZ LUBJA BELE JELKE IN OBMORSKEGA
BORA NA FLUORESCENCO ŽIVIH CELIC Z IZRAŽENIM
ZELENIM FLUORESCENČNIM PROTEINOM**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE EFFECT OF SILVER FIR AND MARITIME PINE BARK
EXTRACTS ON FLUORESCENCE OF LIVING CELLS
TRANSFECTED WITH GREEN FLUORESCENT PROTEIN**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključno delo univerzitetnega študija 2. stopnje Strukturna in funkcionalna biologija. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je 6. 2. 2013 odobrila naslov magistrskega dela ter za mentorja imenovala prof. dr. Matejo Erdani Kreft in za recenzenta prof. dr. Petra Veraniča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Aleš KLADNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Mateja ERDANI KREFT

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Član: prof. dr. Peter VERANIČ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

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.

Anja Kavčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 576(043.2)
KG	izvleček iz lubja bele jelke/izvleček iz lubja obmorskega bora/bledenje fluorescences/prosti radikali
AV	KAVČIČ, Anja, dipl. biol. (UNI)
SA	ERDANI KREFT, Mateja (mentorica)/VERANIČ, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2015
IN	Vpliv izvlečkov iz lubja bele jelke in obmorskega bora na fluorescenco živih celic z izraženim zelenim fluorescenčnim proteinom
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XII, 53 str., 5 pregl., 17 sl., 9 pril., 53 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	

Prosti radikali nastajajo v živih celicah med celičnim metabolizmom. Prav tako nastajajo ob osvetljevanju fluorescenčnih proteinov in povzročijo njihovo bledenje, hkrati pa poškodujejo celice in vodijo v celično smrt. Glavni obrambni mehanizem celic proti prostim radikalom so antioksidanti, saj delujejo kot lovilci teh visoko reaktivnih molekul. Namen naloge je bil ugotoviti vpliv izbranih izvlečkov (izvleček lubja bele jelke (*Abies alba*) (IAA) in obmorskega bora (*Pinus pinaster*) (PYC)) na viabilnost celic MDc-2, na obnovitveno sposobnost celic, na fluorescenco zelenega fluorescenčnega proteina (GFP), izraženega v celicah MDc-2 ter ugotoviti učinkovitost izbranega izvlečka pri preprečevanju nastajanja prostih radikalov. Dokazali smo, da za razliko od PYC, IAA zviša viabilnost celic MDc-2 ne glede na čas izpostavitve. Obnovitvena sposobnost celic MDc-2 v prvih 24 urah po poškodbi se ob dodatku IAA izboljša, PYC pa obnovitveno sposobnost celic v prvih dneh po ranitvi zavre. Ugotovili smo tudi, da IAA ne spremeni ultrastrukture celic MDc-2, medtem ko PYC poveča število avtofagnih vakuol v celicah, gojenih v izbranem izvlečku 2 meseca. Dokazali smo, da oba izbrana izvlečka ne upočasnita hitrosti bledenja fluorescences GFP, vendar pa zmanjšata količino prostih radikalov v celicah. Z magistrskim delom smo dopolnili pretekle študije o delovanju IAA in PYC in dodatno potrdili njuno antioksidativno moč.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 576(043.2)
CX	silver fir bark extract/maritime pine bark extract/photobleaching/free radicals
AU	KAVČIČ, Anja, dipl. biol. (UNI)
AA	ERDANI KREFT, Mateja (supervisor)/VERANIČ, Peter (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme in Structural and functional biology
PY	2015
TI	The effect of silver fir and maritime pine bark extracts on fluorescence of life cells transfected with green fluorescent protein
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XII, 53 p., 5 tab., 17 fig., 9 ann., 53 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	

Free radicals are generated during cell metabolism. They are also released upon light excitation of fluorescent proteins. Due to free radical production in the cell, the fluorescence of fluorescent proteins starts to fade. Free radicals cause damage to cells, leading to cell death. Antioxidants are the main defence cell mechanism against free radicals. They act as scavengers of these highly reactive molecules. The main purpose of master thesis was to determine how silver fir (*Abies alba*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) extracts affect cell viability and regeneration potential and how they affect photobleaching of green fluorescent proteins (GFP) endogenously expressed in MDc-2 cells. Also, effect of extracts on ability of free radical formation was tested. We proved that silver fir extract improves cell viability and regeneration ability of cells in the first 24 hours after wounding, while maritime pine extract does not. Two months of cell exposure to silver fir extract has no effect on cell ultrastructure. On the other hand, maritime pine extract increases the number of autophagic vacuoles in the cell. Furthermore, the addition of extracts does not lower the rate of GFP photobleaching, but has the potential of free radicals scavenging. Our master thesis contributes to previous research on functions of silver fir and maritime pine extract. The most important conclusion is that both extracts were proved to have a similar antioxidative potential.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PRILOG	X
SLOVARČEK.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI MAGISTRSKEGA DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OZNAČEVANJE STRUKTUR V ŽIVIH CELICAH.....	3
2.1.1 GFP.....	3
2.2 FLUORESCENCA	4
2.2.1 Bledenje.....	5
2.3 PROSTI RADIKALI.....	5
2.3.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS).....	6
2.3.2 ROS in osvetljevanje celic	7
2.3.3 Dušikov oksid in reaktivne dušikove zvrsti (RNS).....	7
2.3.4 Nekroza in apoptoza celic.....	7
2.4 ANTIOKSIDANTI	8
2.5 IGLAVCI IN NJIHOVI IZVLEČKI.....	8
2.5.1 Obmorski bor (<i>Pinus pinaster</i>)	8
2.5.2 Bela jelka (<i>Abies alba</i>)	9

3	MATERIALI IN METODE	11
3.1	MATERIALI	11
3.1.1	Kemikalije in drobna oprema	11
3.1.2	Laboratorijska oprema	12
3.1.3	Celična linija MDc-2	13
3.1.4	Mediji za gojenje celic MDc-2	13
3.2	METODE	15
3.2.1	Delo s celicami MDc-2	15
3.2.2	Osnovni hranilni medij z dodatkom izvlečkov	16
3.2.3	Analiza rasti celic MDc-2	18
3.2.4	Preraščanje poškodbe in vitro	19
3.2.5	Analiza bledenja fluorescence GFP, izraženega v celicah MDc-2	20
3.2.6	Določanje viabilnosti celic MDc-2	22
3.2.7	Določanje metabolne aktivnosti celic	23
3.2.8	Meritve prisotnosti ROS v celicah MDc-2	25
3.2.9	Priprava vzorcev za presežno elektronsko mikroskopijo	27
4	REZULTATI	28
4.1	VPLIV IAA IN PYC NA HITROST RAZRAŠČANJA CELIC MDc-2 PO PODLAGI	28
4.2	VPLIV IAA IN PYC NA OBNOVITVENO SPOSOBNOST CELIC MDc-2	29
4.3	VPLIV IAA IN PYC NA INTENZITETO FLUORESCENCE DEZMOKOLINA- GFP (Dsc2-GFP) V CELICAH MDc-2	30
4.3.1	Intenzitete fluorescence Dsc2-GFP, ko celicam MDc-2 dodamo HM z IAA ali HM s PYC tik pred začetkom osvetljevanja	30
4.3.2	Intenzitete fluorescence Dsc2-GFP, ko celicam MDC-2 dodajamo HM z IAA ali HM s PYC 7 dni pred začetkom osvetljevanja	32

4.4	VPLIV OSVETLJEVANJA IN IZVLEČKOV IAA IN PYC NA VIABILNOST CELIC MDc-2.....	34
4.5	VPLIV IZVLEČKOV IAA IN PYC NA METABOLNO AKTIVNOST CELIC MDc-2	36
4.6	VPLIV IZVLEČKOV IAA IN PYC NA PRISOTNOST ROS V CELICAH MDc-2	37
4.7	VPLIV IAA IN PYC NA ULTRASTRUKTURO CELIC MDc-2.....	38
5	RAZPRAVA	40
5.1	IAA POSPEŠI, PYC PA UPOČASNI PRERAŠČANJE POŠKODBE	41
5.2	DODATEK IZVLEČKOV IAA ALI PYC V HM NE UPOČASNI HITROSTI BLEDENJA FLUORESCENCE Dsc2-GFP	42
5.3	IAA ZNAČILNO POVEČA METABOLNO AKTIVNOST CELIC MDc-2, PYC PA NE	43
5.4	IAA IN PYC ZMANJŠUJETA KOLIČINO ROS V CELICAH MDc-2	44
5.5	PYC POVEČA ŠTEVILO AVTOFAGNIH VAKUOL V CELICAH MDc-2	44
6	SKLEPI	45
7	POVZETEK.....	46
8	VIRI.....	48

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Uporabljene kemikalije in drobna oprema.....	11
Pregl. 2: Uporabljena laboratorijska oprema.....	12
Pregl. 3: Sestava HM za gojenje celic MDc-2.....	13
Pregl. 4: Proučevani izvlečki, ki smo jih dodajali v HM.....	14
Pregl. 5: Masa prazne in polne centrifugirke.....	16

KAZALO SLIK

Sl. 1: Jablonskijev diagram.....	5
Sl. 2: Shema izvedbe analize rasti celic MDc-2.	19
Sl. 3: Shema izvedbe testa preraščanja poškodbe.....	20
Sl. 4: Shema izvedbe poskusa za analizo bledenja fluorescence GFP, izraženega v celicah MDc-2.....	21
Sl. 5: Shema izvedbe poskusa za določitev viabilnosti celic MDc-2.	23
Sl. 6: Shema izvedbe poskusa za določanje metabolne aktivnosti celic MDc-2.....	25
Sl. 7: Shema izvedbe poskusa za določanje prisotnosti ROS v celicah MDc-2.....	26
Sl. 8: Spremljanje rasti celic v različnih HM od dneva nasaditve celic dalje.....	28
Sl. 9: Obnovitvena sposobnost celic MDc-2 po dnevih glede na dan poškodbe (dan 0).....	29
Sl. 10: Intenziteta fluorescence Dsc2-GFP v celicah MDc-2 v različnih HM, dodanih tik pred začetkom osvetljevanja.....	31
Sl. 11: Primerjava intenzitete zelene fluorescence Dsc2-GFP celic MDc-2 v različnih HM, dodanih tik pred začetkom osvetljevanja.	32
Sl. 12: Intenziteta fluorescence celic MDc-2, ki so bile 1 teden v različnih HM.....	33
Sl. 13: Primerjava intenzitete zelene fluorescence Dsc2-GFP celic MDc-2, ki so bile 1 teden v različnih HM.	34
Sl. 14: Viabilnost celic MDc-2 po dodatku IAA ali PYC v različnih časih izpostavitve, z ali brez osvetljevanja.....	36
Sl. 15: Primerjava metabolne aktivnosti 1 teden starih celic MDc-2.	37
Sl. 16: Prisotnost ROS v 1 teden starih celicah MDc-2.....	38
Sl. 17: Ultrastruktura celic MDc-2 po 2 mesecih izpostavljenosti različnim HM.	39

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Meritev osmolarnosti medijev
- Priloga B: Meritev pH medijev
- Priloga C: Odstotek pokritosti površine vidnega polja v različnih HM
- Priloga D: Odstotek pokritosti površine celic v različnih HM glede na dan ranitve
- Priloga E: Izmerjene intenzitete fluorescence Dsc2-GFP v celicah MDc-2 po različnih časih osvetljevanja
- Priloga F: Viabilnost celic MDc-2 v različnih HM
- Priloga G: Meritve absorbance po izvedbi testa MTS v celicah MDc-2
- Priloga H: Relativna metabolna aktivnost celic MDc-2 v različnih HM
- Priloga I: Relativna prisotnost ROS v celicah MDc-2 v različnih HM

SLOVARČEK

Antioksidativna moč je učinkovitost spojine za lovljenje prostih radikalov.

Dsc2 *desmocollin 2*; dezmokolin 2

Fluorescenca je fizikalni pojav, pri katerem snov oddaja svetlobo z daljšo valovno dolžino, kot je valovna dolžina absorbiranega elektromagnetnega valovanja.

FP *fluorescent protein*; fluorescenčni protein

GFP *green fluorescent protein*; zeleni fluorescenčni protein

HM *Advance-Dulbecco's modification of Eagle's medium*; hranilni medij

HM (K) hranilni medij brez dodanih izvlečkov

HM s PYC hranilni medij z dodanim izvlečkom lubja obmorskega bora

HM z IAA hranilni medij z dodanim izvlečkom lubja bele jelke

IAA izvleček iz lubja bele jelke (*Abies alba*)

karboksi-H₂DCFDA *6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*; 6-karboksi-2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat, splošni indikator ROS v celicah

M *mean*; aritmetična sredina

MDc-2 celice MDCK, ki stabilno izražajo Dsc2-GFP

N *number of scores*; velikost vzorca

PBS *phosphate buffer saline*; fosfatni pufer

PYC izvleček iz lubja obmorskega bora

RNS *reactive nitrogen species*; reaktivne dušikove zvrsti

ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktivne kisikove zvrsti
SD	<i>standard deviation</i> ; standardni odklon
SE	<i>standard error</i> ; standardna napaka
UV-svetloba	<i>ultraviolet light</i> ; ultravijolična svetloba
Viabilnost	ali živost je sposobnost celic, da v danem okolju preživijo, rastejo in se delijo.

1 UVOD

Omejujoč dejavnik v fluorescenčni mikroskopiji je fototoksični učinek svetlobe, ki se uporablja za osvetljevanje celic oziroma za vzbujanje fluorescence (Walker-Daniels 2012; Dailey in sod., 2006). Vzbujeni fluorescenčni proteini (FP) tvorijo proste radikale (Kremers in sod., 2011), ki vplivajo na bledenje fluorescence (Dailey in sod., 2006; Almuami in sod., 2008). Obenem prosti radikali povzročijo poškodbe celičnih lipidov, proteinov in DNA, kar onemogoči normalno delovanje celic (Alnuami in sod., 2008; Valko in sod., 2007; Apak, 2007).

Znano je, da se fototoksični učinek svetlobe lahko zmanjša z dodajanjem antioksidantov v medij, v katerem so opazovane celice (Dailey in sod., 2006). Antioksidanti so tudi polifenoli, ki jih vsebujeta proučevana izvlečka; izvleček lubja bele jelke (IAA) in izvleček lubja obmorskega bora (PYC).

Namen dela je bil ugotoviti, kako izbrana izvlečka (IAA in PYC) vplivata na viabilnost celic MDc-2, na njihovo sposobnost obnavljanja ter na fluorescenco v celicah MDc-2, ki stabilno izražajo zeleni fluorescenčni protein (GFP). Preveriti smo želeli tudi učinkovitost izvlečkov pri preprečevanju nastajanja prostih radikalov v celicah MDc-2.

1.1 CILJI MAGISTRSKEGA DELA

1. Določiti viabilnost, metabolno aktivnost in sposobnost obnavljanja celic MDc-2 po izpostavljenosti IAA ali PYC v različnih časovnih obdobjih (po 24 urah, 1 tednu, 2 mesecih) ter ugotoviti, kako IAA ali PYC vpliva na prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti v celicah.

2. Ugotoviti, kako dodatek IAA ali PYC v hranilni medij vpliva na fluorescenco GFP v celicah MDc-2 ob osvetljevanju z modro svetlobo.

3. Ugotoviti, kako dodatek IAA ali PYC v hranilni medij vpliva na viabilnost celic MDc-2 pri dolgotrajnem osvetljevanju z modro svetlobo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

1. Viabilnost celic MDc-2 bo po dodatku IAA ali PYC v hranilni medij večja kot pri kontroli.
2. Dodatek IAA ali PYC v hranilni medij bo zmanjšal bledenje fluorescence dezmokolina-GFP v celicah MDc-2. Preprečevanje bledenja fluorescence bo bolj učinkovito ob dodatku IAA kot ob dodatku PYC.
3. Dodatek IAA ali PYC v hranilni medij bo zmanjšal nastajanje prostih radikalov v celicah, pri čemer bo imel IAA večjo antioksidativno moč kot PYC.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OZNAČEVANJE STRUKTUR V ŽIVIH CELICAH

Za opazovanje celičnih struktur in procesov se uporabljajo fluorofori. Fluorofor je del molekule, ki je odgovoren za fluorescenco. Fluorofori so npr. nanokristali, organska barvila, kot sta fluorescein in Hoechst, lahko pa so tudi naravno ali umetno vezani na makromolekule (proteine, lipide, DNA). Kot fluorescenčna sonda se pogosto uporabljajo GFP in njegove različice (Walker-Daniels in sod., 2012).

2.1.1 GFP

Odkritje in razvoj FP je pomembno prispevalo k študiju procesov v celicah, saj še danes služijo kot uspešni označevalci izražanja genov in za sledenje proteinom v živih celicah in organizmih (van Roessel in Brand, 2002; Zhang in Brand, 2002). Najpogosteje uporabljen FP je GFP, pridobljen iz meduze *Aequorea victoria* (Chalfie in sod., 1994; Stepanenko in sod., 2008). Po uspešnem kloniranju se je začel GFP množično uporabljati za ugotavljanje izražanja genov v bakteriji *Escherichia coli* in valjastem črvu *Caenorhabditis elegans* (Kremers in sod., 2011). Zaporedje DNA, ki kodira GFP, se lahko poveže z zapisom za katerikoli drug protein, ki se izraža v celicah (Stepanenko in sod., 2008).

Tridimenzionalna struktura GFP je zvita v sodčku podobno obliko. Sestavlja jo 238 aminokislin (Stepanenko in sod., 2008). Stene sodčka tvorijo 11 β -nagubanih ploskev, skozi sodček pa diagonalno poteka α -vijačnica. V središču sodčka je dobro zaščiten fluorofor (Phillips, 1997; Stepanenko in sod., 2008; Kremers in sod., 2011) iz aminokislinskih ostankov Ser-Tyr-Gly, na mestih 65-67 (Chalfie in sod., 1994; Heim in sod., 1994). Fluorofor tako sestavljata 2 aromatska obroča, ki sta povezana z mostičkom v planarno konfiguracijo. Zaradi takšne sestave nastali sistem konjugiranih dvojnih vezi absorbira ultravijolično (UV) in modro svetlobo, oddaja pa svetlobo v zelenem delu spektra (Stepanenko in sod., 2008).

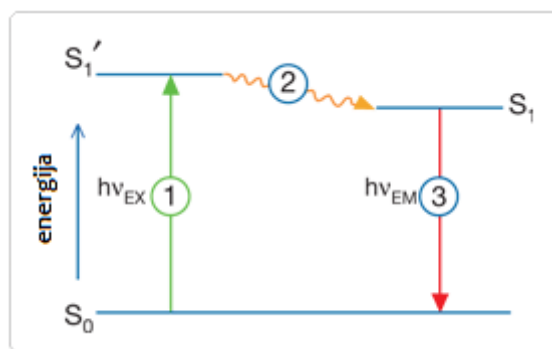
Lastnosti divjega tipa GFP so v zadnjih letih izboljšali s sintezo derivatov GFP, ki so jih dobili z mutacijami različnih, a specifičnih aminokislin v zaporedju tega proteina (Hibbs, 2004; Tsien in sod. 1998). Tako se predstavniki družine GFP med seboj razlikujejo v fotofizikalnih lastnostih, kot so valovna dolžina absorpcije in emisije, ekstinkcijski koeficient ter čas fluorescence (Kremers in sod., 2011).

Skupna lastnost GFP in njegovih derivatov je sprememba valovne dolžine emisije kot posledica osvetljevanja. Rezultat osvetljevanja je nepovratna sprememba strukture fluoroforja. To se zgodi pri fotoaktivaciji, kjer fluorofor preide iz nefluorescirajočega v fluorescirajoče stanje, in pri bleđenju, kjer preide stanje fluorofora iz fluorescirajočega v nefluorescirajoče stanje (Henderson in sod., 2007; Kremers in sod., 2011).

2.2 FLUORESCENCA

Fluorescenca je fizikalni pojav, pri katerem snov oddaja svetlobo z daljšo valovno dolžino kot je valovna dolžina absorbirane svetlobe. Zelene fluorescenčne molekule na primer absorbirajo modro svetlobo in oddajajo zeleno svetlobo (Binder in sod., 2009).

Pojav fluorescence najlažje predstavimo z Jablonskijevim diagramom (slika 1), kjer so predstavljena energijska stanja elektronov fluorofora. V fluoroforu, ki ni absorbiral energije, so elektroni v najnižjem vibracijskem stanju S_0 (osnovno stanje). Ko fluorofori absorbirajo energijo fotona, elektroni vstopijo v vzbujeno stanje S_1' (slika 1, proces prehoda označen s številko 1), kjer je več vibracijskih ravni. V takšnem stanju elektroni ne vztrajajo dolgo časa. Del energije se v višjih vibracijskih ravneh izgubi z notranjo konverzijo in sproščanjem toplote (slika 1, označeno s številko 2). Pri tem prehodu elektrona iz vzbujenega stanja S_1' na raven S_1 , fluorofori ne oddajo fotonov. Za vrnitev elektrona v osnovno stanje morajo fluorofori preostalo absorbirano energijo izgubiti, kar se najpogosteje zgodi z oddajo fotona s količino energije, ki ustreza razliki med najnižjim možnim vzbujenim stanjem S_1 in osnovnim stanjem S_0 elektrona (slika 1, označeno s številko 3) (Elumalai, 2002; Johnson in Spence, 2010; Hibbs, 2004).



Slika 1: Jablonskijev diagram prikazuje proces prehoda elektronov v višjo energijsko raven S_1' (1) ob vzbujaanju s fotoni ter kasnejšo emisijo energije s fluorescenco (3). Označene stopnje so opisane v besedilu (slika prirejena po Johnson in Spence, 2010). Legenda: $h\nu_{EX}$ valovna dolžina absorbirane svetlobe; $h\nu_{EM}$ valovna dolžina oddane svetlobe.

2.2.1 Bledenje

Vsa svetloba, ki jo fluorofor absorbira, se ne porabi za nastanek fluorescence. Nekaj energije, ki se absorbira, se sprosti v obliki toplote ali pa se porabi za kemične reakcije (Hibbs, 2004). Ob vzbujaanju FP nastajajo prosti radikali, ki povzročijo strukturne spremembe fluoroforov (Dailey in sod., 2006; Kremers in sod., 2011). Fluorofori posledično izgubijo sposobnost fluorescence (Dailey in sod., 2006; Alnuami in sod., 2008). Pojav izgube fluorescence imenujemo bledenje (Lippincott-Schwartz in sod., 2003; Herman in sod., 2006).

2.3 PROSTI RADIKALI

Prosti radikali so molekule, ki imajo v svojih orbitalah neparno število elektronov (Alnuami in sod., 2008; Valko in sod., 2007). Zaradi težnje po pritegnitvi še enega elektrona so praviloma kratkoživi in kemijsko reaktivni. Glede na atom z neparnim elektronom razlikujemo kisikove, dušikove, ogljikove in druge proste radikale (Kreft in Pečar, 1998). V živih sistemih nastajajo kot produkti normalnega celičnega metabolizma, lahko pa so posledica delovanja okolja, npr. zaradi UV-sevanja, kajenja, strupenih kemikalij, atmosferskih onesnaževalcev (Devasagayam in sod., 2004). Celice vsebujejo antioksidante, ki koncentracijo prostih radikalov vzdržuje na ravni, pri kateri celica lahko normalno deluje. Kadar nastajanje prostih radikalov preseže celično

kapaciteto lovilcev prostih radikalov, imajo ti škodljive učinke za celico, kar imenujemo oksidativni stres. Ta nastane ali ob prekomernem nastajanju prostih radikalov ali ob pomanjkanju antioksidantov (Sies, 1997). Posledice prisotnosti prostih radikalov v celicah so spremembe celičnih lipidov, proteinov in DNA, kar onemogoči normalno delovanje celic (Alnuami in sod., 2008; Valko in sod., 2007; Apak, 2007). Prispevajo tudi k celični smrti (Dailey in sod., 2006).

2.3.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

ROS nastajajo v fizioloških razmerah kot posledica aerobnega metabolizma. Glavno mesto nastanka prostih radikalov predstavljajo mitohondriji. Elektroni, udeleženi v dihalni verigi, lahko uhajajo in reagirajo s kisikom. Posledica je nastanek superoksidnega radikala ($O_2^{\cdot-}$) (Curtin in sod., 2002) kot neizogibnega stranskega produkta in t. i. primarnega ROS (Valko in sod., 2005). Superoksidni radikal se z encimom superoksid dismutazo (SOD) najprej pretvori do vode in vodikovega peroksida (H_2O_2). Nato se H_2O_2 pretvori v vodo in kisik, kar katalizira encim katalaza (Manček in Pečar, 2001; Perdih in Pečar, 2006). Vodikov peroksid reagira tudi s Fe^{2+} ioni v t. i. Fentonovi reakciji, kjer prihaja do nastanka hidroksilnih radikalov (Curtin in sod., 2002).

Pri prekomernem nastajanju ROS se zgoraj omenjena encimska obramba zasiti (Manček in Pečar, 2001; Perdih in Pečar, 2006), zato superoksidni radikal naprej reagira z drugimi molekulami, kar privede do nastanka sekundarnih ROS. Tako ROS vključujejo še radikale, kot so hidroperoksilni radikal ($HO_2^{\cdot}$), hidroksilni radikal ($HO^{\cdot}$), karbonatni radikal ($CO_3^{\cdot-}$), peroksilni radikal ($RO_2^{\cdot}$) in alkoksilni radikal ($RO^{\cdot}$). Med ROS uvrščamo tudi nekatere spojine, ki niso radikali, kot na primer vodikov peroksid (H_2O_2) in singletni kisik (1O_2) (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.3.2 ROS in osvetljevanje celic

Osvetljevanje celic povzroči strukturne spremembe molekul v celičnih strukturah. V celicah, ki izražajo FP, so vir strukturnih poškodb prosti radikali, ki jih tvorijo vzbujeni FP (Dailey in sod., 2006; Kremers in sod., 2011). Poleg singletnega kisika, nastanejo med drugim tudi superoksidni in hidroksilni radikali ter različni peroksidi (Dailey in sod., 2006). Posledica nastanka prostih radikalov je bledenje fluorescence FP (Dailey in sod., 2006; Alnuami in sod., 2008).

2.3.3 Dušikov oksid in reaktivne dušikove zvrsti (RNS)

Dušikov oksid (NO) je majhna hidrofobna molekula, ki prehaja celične membrane. Nastaja v reakciji prevorbe L-arginina v citrulin z encimom NO sintazo. Poleg kontrole pritrjenosti celic, tonusa žil in prepustnosti žil, so za dušikov oksid znani tudi škodljivi učinki, saj je udeležen v nastanku RNS. Dušikov oksid na splošno hitro reagira s superoksidnim radikalom in tvori peroksinitrit (ONOO^-), ta pa zaradi svoje reaktivnosti povzroča poškodbe celičnih struktur. Nenehno kopičenje peroksinitrita v celicah vodi v celično smrt (Novo in Parola, 2008).

2.3.4 Nekroza in apoptoza celic

Znano je, da nastanek ROS in RNS lahko povzroči celično smrt preko ene od dveh možnih poti celične smrti, apoptoze ali nekroze (Kroemer in sod., 1998; Curtin in sod., 2002).

Nekroza nastopi kot odgovor na večje poškodbe celice. Morfološko se nekroza vidi v nabrekanju celic in mitohondrijev, poškodovani plazmalemi in sproščanju celične vsebine v zunajcelični prostor. To povzroči tudi poškodbe ali celo smrt sosednjih celic (Kroemer in sod., 1998; Curtin in sod., 2002).

Apoptoza je, v nasprotju z nekrozo, nadzorovana oblika celične smrti. Izvedba apoptoze se odraža v morfoloških in biokemijskih spremembah, in sicer pride do depolarizacije

mitohondrijev, sprememb v razporeditvi fosfolipidov, kondenzacije kromatina, fragmentacije jedra, celice se skrčijo. Celica postopno razpade na vezikle, ki jim pravimo apoptotska telesca (Kroemer in sod., 1998; Kerr in sod., 1972).

2.4 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so snovi, ki nevtralizirajo proste radikale (Devasagayam in sod., 2004; Fraga, 2007). Oksidativni stres preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov ter z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih bioloških molekul (Čajić, 2011).

Kot lovilci ROS so bili že uporabljeni nekateri karotenoidi, za katere se je izkazalo, da uspešno zaščitijo celice pred poškodbami, ki nastanejo zaradi osvetljevanja. Problem pri tem je obarvanost karotenoidov in njihova avtofluorescenca. Preizkušena je bila tudi uporaba nefluorescentnih in brezbarvnih lovilcev prostih radikalov, na primer askorbata, glutationa, analoga vitamina E, vendar zaščita celic pred z osvetljevanjem povzročenimi poškodbami ni bila učinkovita (Tsien in sod., 2006).

Kot lovilci prostih radikalov delujejo tudi polifenoli. Polifenolni antioksidanti morajo reagirati s prostimi radikali hitreje, kot ti reagirajo z biomolekulami, da se slednje zaščitijo pred oksidacijo (Apak, 2007). Polifenoli lahko poleg lovljenja prostih radikalov nevtralizirajo tudi druge pro-oksidativne molekule (Fraga, 2007).

2.5 IGLAVCI IN NJIHOVI IZVLEČKI

2.5.1 Obmorski bor (*Pinus pinaster*)

Obmorski bor (*Pinus pinaster*) spada v družino borovk (Pinaceae). Zraste med 20 in 35 metri visoko. Krošnja je rahla in široka. Iglice so toge in dolge do 25 centimetrov, v zeleno-rumenih odtenkih. Obmorski bor uspeva v zahodnem in jugozahodnem Mediteranu (Rushforth, 1986).

Pycnogenol[®] (PYC) je zaščitena blagovna znamka, ki se nanaša na njegov izvleček kot tudi na končni proizvod (izvleček, gel in tablete (Sigma, Biolandes)). Vir PYC so gozdne plantaže na jugovzhodu Francije (Packer in sod., 1999). Sestava izvlečka ni povsem znana, ve pa se, da ga sestavljajo flavonoidi (katehin, epikatehin, taksifolin), procianidini, taksoferoli in fenolne kisline. Spojine v izvlečku med seboj delujejo sinergistično, kar pomeni, da je celokupen učinek izvlečka učinkovitejši kot vsota posameznih učinkov spojin (Ku in sod., 2007; Packer in sod., 1999; Turk, 2012).

PYC so v raziskavah že dokazali antioksidativne in protivnetne učinke. Pokazali so tudi, da deluje antimikrobno in antivirusno (Grohar, 2012; Kim, 2011; Mikelj, 2012). PYC poleg zaščite organizmov pred oksidativnim stresom tudi inhibira encime (npr. lipoksigenazo, ksantin oksidazo), ki so odgovorni za nastanek ROS (Packer in sod., 1999; Ku in sod., 2007).

2.5.2 Bela jelka (*Abies alba*)

Tako kot obmorski bor spada tudi bela jelka (*Abies alba*) v družino borovk (Pinaceae). Ima stožčasto krošnjo, s 3 centimetre dolgimi sploščenimi in dvoredno nameščenimi iglicami. Na spodnji strani iglic sta dve beli progi, zgornja stran je temno zelena.

Uspeva na karbonatni in nekarbonatni matični podlagi v gorovjih srednje in južne Evrope, najpogosteje v pasu med 800 in 1500 metri nadmorske višine. Razširjena je skoraj po vsej Sloveniji. Večinoma raste v mešanih gozdovih z bukvijo (Brus, 2004).

V lubju bele jelke je veliko smole, iz katere se pridobiva terpentin. Z destilacijo terpentina z vodno paro se pridobiva terpentinovo eterično olje, ki se uporablja za izkašljevanje. Prav tako se pridobiva eterično olje iz iglic in mladih poganjkov, ki pa se uporablja za inhalacije pri prehladih, bronhitisu in astmi (Bruneton, 1999).

Raziskave na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani so pokazale, da izvleček lubja bele jelke (IAA) vsebuje podobne zmesi polifenolov kot bolj raziskani PYC. V okviru diplomskega dela iz leta 2008 so z metodo DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) primerjali antioksidativno moč polifenolnih spojin izvlečka lubja navadne smreke, IAA

in PYC. Ugotovili so, da ima PYC večjo antioksidativno moč v primerjavi z izvlečkom lubja smreke. Ugotovili so tudi, da ima IAA večjo antioksidativno moč v primerjavi s PYC. IAA torej predstavlja alternativo PYC (Mravlje, 2008). Prav tako so raziskave antioksidativne moči izvlečkov na primarnih človeških mononuklearnih celicah PBMC pokazale, da ima IAA v primerjavi s PYC preko celotnega testiranega koncentracijskega območja 0-100 µg/ml večjo antioksidativno moč (Kreft in sod., neobjavljeno).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije in drobna oprema.

Kemikalije, drobna oprema	Proizvajalec	Serijska številka
Standard za osmomat: 300 mOsmol/kg	Gonotec	30.9.0020
Standard za osmomat: 850 mOsmol/kg	Gonotek	30.9.0850
Tripansko modrilo	Invitrogen	15250
Hepes		
Pufer PBS	Gibco	14190-136
Triple select	Gibco	12563
Petrijevka s stekelcem (35 mm)	MatTek	P356-1.5-10-C
Petrijevka s stekelcem z mrežo (35 mm)	MatTek	P356-2-14-C-GRID
Petrijevka (premer 40x11 mm)	TPP, Švica	93040
Gojitvena steklenička (25 cm ²)	TPP, Švica	90026
Gojitvena steklenička (75 cm ²)	Cellstar, Greiner bio-one	658 170
Gojitvena plošča 24 - well	TPP, Švica	92024
Gojitvena plošča 96 - well	TPP, Švica	92696
Pipetor accu-jet pro	BRAND	11 E41565
Pipete (1 ml)	TPP, Švica	Q30Q2033032
Pipete (2 ml)	Cellstar, Greiner bio-one	710 160/2 ml
Pipete (5 ml)	LFG ALP	T38T2652011

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Uporabljene kemikalije in drobna oprema.

Pipete (10 ml)	LFG ALP	T07T0463064
Pipete (25 ml)	Cellstar, greiner bio-one	710 160/25 ml
Pipete (50 ml)	Ratiolab	3150011
Pasteurjeve pipete	BRAND	7477 15
Cell scraper M	TPP, Švica	99003
Centrifugirka 15 ml	TPP, Švica	91015
Centrifugirka 50 ml	BD Falcon	352070
Hemocitometer	Neubauer	BC-SS100
Sterilni filtri (pore 0, 20 µm)	Sartorius Stedium Biotech, Nemčija	17823
Dezinfekcijski robčki Pursept – A Xpress	Merz Hygiene	41792
Imerzijsko olje	Nikon Japan	101634
Parafinsko olje	Argolit d.o.o.	3-6-0792
Bencin, 100 ml	Gorenske lekarne, Galenski laboratorij	10731211
Rokavice	Kimtech	E330

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec	Serijska številka
CO ₂ Inkubator Heraeus HERA cell 150	Thermo Scientific	
Termostat Heraeus B6	Thermo Scientific	40659150
Vakuumska črpalka		
Vibracijsko mešalo MS 3 Basic	IKA	01.464456
Osmometer Osmomat 030	Gonotec	07 01 01
Merilec pH		

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Uporabljena laboratorijska oprema.

Invertni mikroskop Leica DM IL	Leica microsystems	090-135.001 III/01
Centrifuga	Eppendorf	5804R
Presevni elektronski mikroskop Phillips CM 100	Philips	
Fluorescenčni mikroskop Nikon Eclipse TE 300	Nikon	413925
Živosrebrna žarnica (moč 100W)	Ushio Electronic Inc.	0303139. HB – 10104AF
Čitalec mikrotiterskih plošč Infinite M1000	Tecan, Švica	

3.1.3 Celična linija MDc-2

Model za proučevanje so bile celice MDc-2. To so celice MDCK (Madin Darby Canine Kidney, epitelijske celice, izolirane iz pasjih ledvičnih tubulov), ki stabilno izražajo dezmokolin 2 skupaj z GFP (Dsc2-GFP).

3.1.4 Mediji za gojenje celic MDc-2

3.1.4.1 Osnovni hranilni medij (HM (K))

Preglednica 3: Sestava HM (K) za gojenje celic MDc-2.

Sestavine medija	Proizvajalec	Koncentracije v mediju
A-DMEM	Gibco	50 %
F-12 (HAM)	Gibco	50 %
FBS	Gibco	5 %
Crystacillin (Penicilin)	Pliva	100 U/ml
Streptofatol (Streptomycin)	Galenica	100 µg/ml

3.1.4.2 Hranilni medij z dodatkom IAA ali PYC

Preglednica 4: Proučevani izvlečki, ki smo jih dodajali v HM (K).

Izvleček	Vir
PYC (prah)	Sigma, Biolandes (F0400/Pycnogenol)
IAA (tekočina)	Fakulteta za farmacijo (postopek opisan pod točko 3.1.4.2.1)

Končna koncentracija posameznega izvlečka je bila 50 µg/ml HM.

3.1.4.3 Postopek pridobitve IAA

Tekoči IAA je bil pripravljen na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani po postopku dvostopenjske ekstrakcije. 5 kg zmletga lubja bele jelke so v prvi stopnji ekstrahirali s 25 l vode pri 70°C, dve uri. Vodni izvleček so pri znižanem tlaku uparili do volumna 5 l. V drugi stopnji ekstrakcije so koncentriran vodni izvleček 3-krat ekstrahirali. Za vsako ekstrakcijo so uporabili 3 l etilacetata. Etilacetatnemu izvlečku so dodali 25 ml polietilenglikola 400 in iz zmesi odparili etilacetat. Pridobili so 50 ml rjavorumenega viskoznega izvlečka IAA z vonjem po smoli.

3.2 METODE

3.2.1 Delo s celicami MDc-2

3.2.1.1 Gojenje celic

Celice MDc-2 smo gojili v sterilnih plastičnih posodah (T75, TPP) za gojenje pritrjenih celic. Uporabili smo HM (K) za gojenje celic MDc-2.

Celice smo gojili v CO₂-inkubatorju pri 37 °C, v 5 % atmosferi CO₂ in 100 % vlažnosti. Vsi postopki pripravljanja celične kulture so potekali v sterilnih razmerah v laminariju.

3.2.1.2 Presajanje celic

Celice smo presadili, ko so dosegle približno 90 % konfluentnost. Celicam smo odstranili HM (K) ter jim dodali encim Triple Select (Gibco). V posodico s površino dna 75 cm² smo dali po 2 ml omenjenega encima. Sledila je približno 30-minutna inkubacija pri 37 °C (prekinjanje medceličnih stikov). Delovanje encima smo zaustavili tako, da smo celicam dodali HM (K). Celice smo zatem sprali s podlage in jih prenesli v sterilno centrifugirko. Suspenzijo celic smo centrifugirali 5 minut na 200 obratih/min in pri temperaturi 23 °C (Ependorf).

3.2.1.3 Štetje celic s pomočjo hemocitometra

Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra ali Neubauerjeve šteвне komore.

Po centrifugiranju suspenzije celic smo najprej iz epruvete odsesali supernatant. Nato smo celice dobro resuspendirali v nekaj mililitrih ogretega HM (K), odvzeli 50 µl suspenzije in dodali 10 µl raztopine tripanskega modrila v sterilno epico. Suspenzijo smo premešali s pipetiranjem in po 10 µl le-te prenesli v obe števní komori na hemocitometru. Pri štetju smo posebej prešteli obarvane in neobarvane celice, ki so se nahajale v 4 kvadrantih vsake šteвне komore. Tripansko modrilo prehaja skozi

membrane poškodovanih (mrtvih) celic, zato so bile take celice obarvane modro. Neobarvane celice smo šteli kot žive.

Izračunali smo viabilnost celic:

$$\text{viabilnost} = (\text{število živih celic} \times 100) / (\text{vsota živih in mrtvih celic}). \quad \dots (1)$$

Število živih celic smo izračunali z naslednjo enačbo (za 8 prešteti kvadrantov):

$$\text{število celic/ml} = (\text{št. prešteti živih celic v 8 kvadrantih} \times 1,2 \times 10^4) / 8. \quad \dots (2)$$

3.2.1.4 Nasaditev celic

Celice MDc-2 smo nasadili v petrijevke in posodice z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm².

3.2.2 Osnovni hranilni medij z dodatkom izvlečkov

3.2.2.1 Določitev mase 1 ml IAA

Za določitev mase 1 ml IAA smo najprej stehali prazno centrifugirko. V laminariju smo s stekleno pipeto odpipetirali 1 ml IAA iz epruvete v centrifugirko. Stehtali smo polno centrifugirko in izračunali razliko v masi prazne in polne centrifugirke.

Preglednica 5: Masa prazne in polne centrifugirke.

	Masa [g]
Prazna centrifugirka	1,076
Polna centrifugirka (z 1 ml IAA)	2,254

Razlika v masah polne in prazne centrifugirke je bila 1,178 g. Toliko torej tehta 1 ml

IAA.

3.2.2.2 Priprava založne raztopine za posamezen izvleček

Izvleček lubja bele jelke: Iz izmerjene mase (prejšnja točka) 1 ml IAA smo preračunali, koliko μ l IAA potrebujemo za pripravo založne raztopine s končno koncentracijo 1 mg IAA/ml HM (K).

Izvleček lubja obmorskega bora: Preračunali smo, koliko prahu PYC potrebujemo za pripravo založne raztopine s končno koncentracijo 1 mg izvlečka/ml HM (K).

V osnovni hranilni medij smo dodali ustrezno količino posameznega izvlečka, da je bila končna koncentracija izvlečka v HM 1 mg izvlečka/ml HM (K). Vsebinsko smo dobro premešali. Tako pripravljene HM (HM z IAA in HM s PYC) smo prefiltrirali v sterilne stekleničke, ki smo jih zavili v folijo in shranili v hladilnik.

3.2.2.3 Priprava HM z IAA in HM s PYC

Iz pripravljenih založnih raztopin smo v sveže pripravljen HM (K) primešali ustrezno količino založne raztopine posameznega izvlečka, da je bila končna koncentracija posameznega izvlečka 50 μ g/ml HM (K).

3.2.2.4 Merjenje osmolarnosti

Osmometer smo najprej sprali z destilirano vodo, nato pa ga umerili s standardom 300 mOsmol/kg. Na podlagi zgornjega standarda smo izmerili osmolarnost HM z IAA. Meritev smo ponovili še za HM s PYC.

Nato smo uporabili še standard 850 mOsmol/kg ter izmerili osmolarnost obeh HM z dodanim IAA ali PYC.

Meritve osmolarnosti so podane v Prilogi A.

3.2.2.5 Merjenje pH

Pomerili smo pH za HM (K), HM z IAA in HM s PYC, in sicer na sobni temperaturi, in pH vseh treh medijev, ki so bili pred meritvijo najmanj 30 minut v inkubatorju, na 37 °C. Meritve pH so podane v Prilogi B.

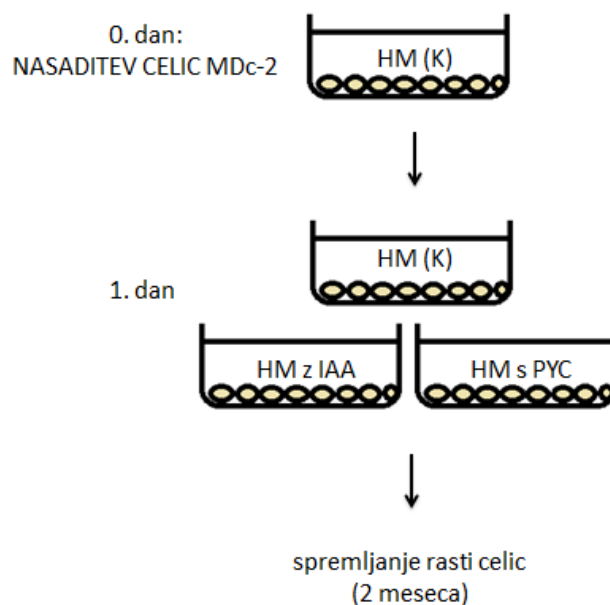
3.2.3 Analiza rasti celic MDc-2

Preverili smo vpliv HM z dodatkom IAA ali PYC na hitrost razraščanja celic MDc-2.

Celice MDc-2 smo nasadili na plastične petrijevke (TPP, 2r = 40 mm) z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm². Za vsak izvleček in kontrolo smo nasadili po 2 petrijevki. Prvih 24 h so celice rastle v HM (K), od prvega dne dalje pa v HM z izbranim izvlečkom ali v HM (K).

Celice smo redno spremljali z invertnim svetlobnim mikroskopom Leica. Prvih 14 dni smo vsak dan ob približno isti uri vsako petrijevko poslikali pri 4-kratni lastni povečavi objektiva (NA = 0.10) na 5 naključnih mestih. Po slikanju smo HM zamenjali z ustreznim svežim HM. Nato smo celice nadaljnjih 6 tednov slikali vsak drugi dan (slika 2). Poskus smo 2-krat ponovili (N za vsak HM = 20 vidnih polj).

Površino preraščenosti petrijevok smo izmerili s programom ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Meritve smo preračunali v odstotke preraščenosti površine petrijevok s celicami za posamezno poslikano vidno polje. Podatke smo zbrali v preglednici (podana v Prilogi C), izračunali povprečno vrednost, standardni odklon in standardno napako ter s Studentovim t-testom ugotavljali, ali so med celicami, ki so rasle v različnih HM, statistično značilne razlike. Vsi podatki so zbrani v Prilogi C.



Slika 2: Shema izvedbe analize rasti celic MDc-2.

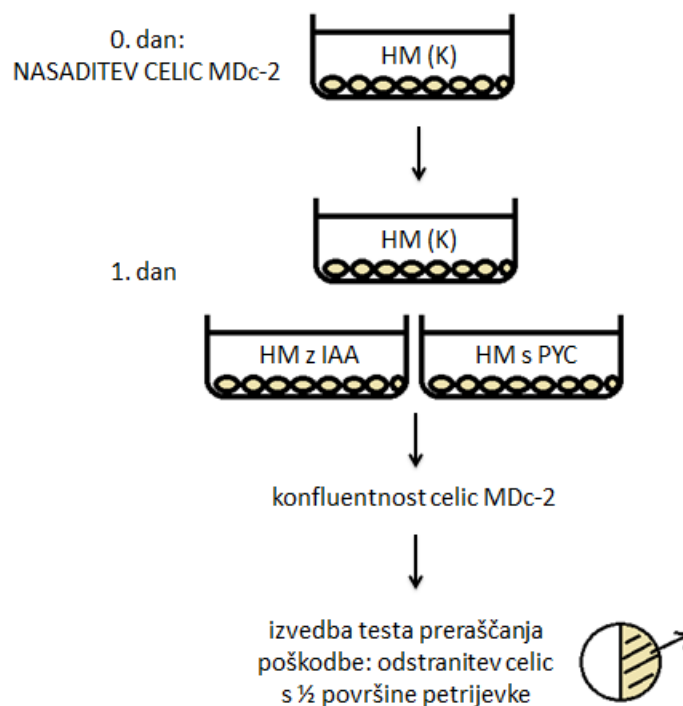
3.2.4 Preraščanje poškodbe in vitro

Preverili smo vpliv HM z dodatkom IAA in PYC na hitrost regeneracije celic MDc-2 po poškodbi.

Celice MDc-2 smo nasadili na petrijevke z mrežo (MatTek Corporation, 2 r = 35 mm) z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm². Celice smo nasadili na 18 petrijevkv; od tega 6 petrijevkv za vsak HM. Celice smo en dan po nasaditvi začeli izpostavljati HM z IAA ali HM s PYC. Za kontrolo smo uporabili celice v HM (K). Že konfluentno razrasle celice smo ranili tako, da smo s tipsom odstranili celice s polovice vsake petrijevke (slika 3) in nato vsak dan pri 40-kratni povečavi mikroskopa poslikali rob ranjene površine (invertni svetlobni mikroskop Leica) (poslikani 2 vidni polji na petrijevko, N = 12 za vsak HM).

S programom ImageJ smo izmerili površino preraščenosti celic po površini vsake petrijevke. Izračunali smo absolutne vrednosti pokritosti za vsak dan. Nato smo podatke preračunali na relativne vrednosti glede na zadnji dan meritve (5. dan), ko so bile petrijevke konfluentne. Dobljene vrednosti smo zbrali po dnevih, izračunali povprečno vrednost, standardni odklon in standardno napako ter s Studentovim t-testom

ugotavljali, ali so med celicami, ki so rasle v različnih medijih, statistično značilne razlike. Podatki so podani v Prilogi D.



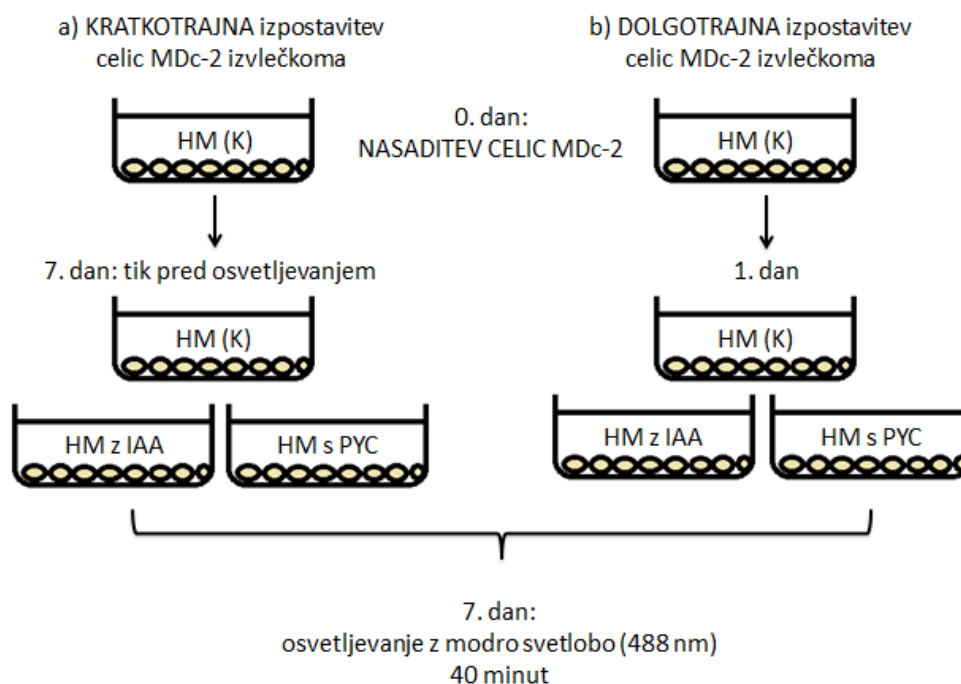
Slika 3: Shema izvedbe testa preraščanja poškodbe.

3.2.5 Analiza bledenja fluorescence GFP, izraženega v celicah MDc-2

Celice MDc-2 smo nasadili z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm² na petrijevke s stekleno podlago (MatTek Corporation, 2r = 35 mm). Celice smo nasadili na 12 petrijevk; od tega 4 za kontrolo (celice gojene v HM (K)) ter 4 za vsak HM z dodatkom izbranega izvlečka. Za opazovanje uspešnosti upočasnitve bledenja fluorescence GFP smo uporabili celice MDc-2, ki smo jih predhodno gojili 1 teden.

Ker smo želeli preveriti uspešnost upočasnitve bledenja fluorescence GFP ob kratkotrajni ali dolgotrajni izpostavitvi celic MDc-2 izbranim izvlečkoma, smo izvedli 2 sklopa različnih poskusov.

- a) Kratkotrajni vpliv izpostavitve celic MDc-2 izbranim izvlečkoma (celice izpostavljene izbranemu izvlečku tik pred začetkom osvetljevanja) smo proučili tako, da smo celičnim kulturam transficiranih celic MDc-2 tik pred osvetljevanjem zamenjali HM (K) s HM z izbranim izvlečkom: HM z IAA ali HM s PYC (koncentracija izvlečka 50 $\mu\text{g/ml}$ HM). Kontrolne celice MDc-2 so bile v HM (K). Pred osvetljevanjem smo v vsako petrijevko s celicami dodali še Hepes (20 mM) (slika 4a).
- b) Dolgotrajni vpliv izpostavitve celic MDc-2 izbranim izvlečkoma (celice posameznemu izvlečku izpostavljene 1 teden) smo proučili tako, da smo celične kulture transficiranih celic MDc-2 gojili en teden v HM (K), HM z IAA ali HM s PYC (koncentracija izvlečka 50 $\mu\text{g/ml}$ HM). Celice so bile v različnih HM vse do dneva opravljanja meritev fluorescence. Pred osvetljevanjem smo v vsako petrijevko s celicami dodali še Hepes (20 mM) (slika 4b).



Slika 4: Shema izvedbe poskusa za analizo bledenja fluorescence GFP, izraženega v celicah MDc-2.

Celice MDc-2 smo 40 minut neprekinjeno osvetljevali z modro svetlobo 488 nm na fluorescenčnem mikroskopu Nikon Eclipse TE300 pri 1000-kratni povečavi mikroskopa (100-kratna povečava objektiva Plan Fluor, NA = 1.25) in pri maksimalno odprti objektivni zaslonki. Na 10 minut smo slikali isto mesto v preparatu s konstantnim časom ekspozicije, in sicer 6 sekund. Pri osvetljevanju smo uporabili filter ND8.

Intenziteto fluorescence dezmokolina-GFP smo analizirali s programom ImageJ. Podatke smo zbrali v preglednici v Prilogi E, izračunali povprečno vrednost, standardni odklon in standardno napako ter s Studentovim t-testom preverili, ali so med celicami, ki so bile izpostavljene različnim medijem, statistično značilne razlike. Trendne črte smo analizirali s statističnim testom dvosmerna ANOVA. Prvi faktor v analizi je bil vrsta medija, v katerem smo gojili celice (HM (K), HM z IAA, HM s PYC), drugi neodvisni faktor pa je bil čas osvetljevanja celic z modro svetlobo (vsakih 10 minut smo posneli sliko osvetljevanih celic).

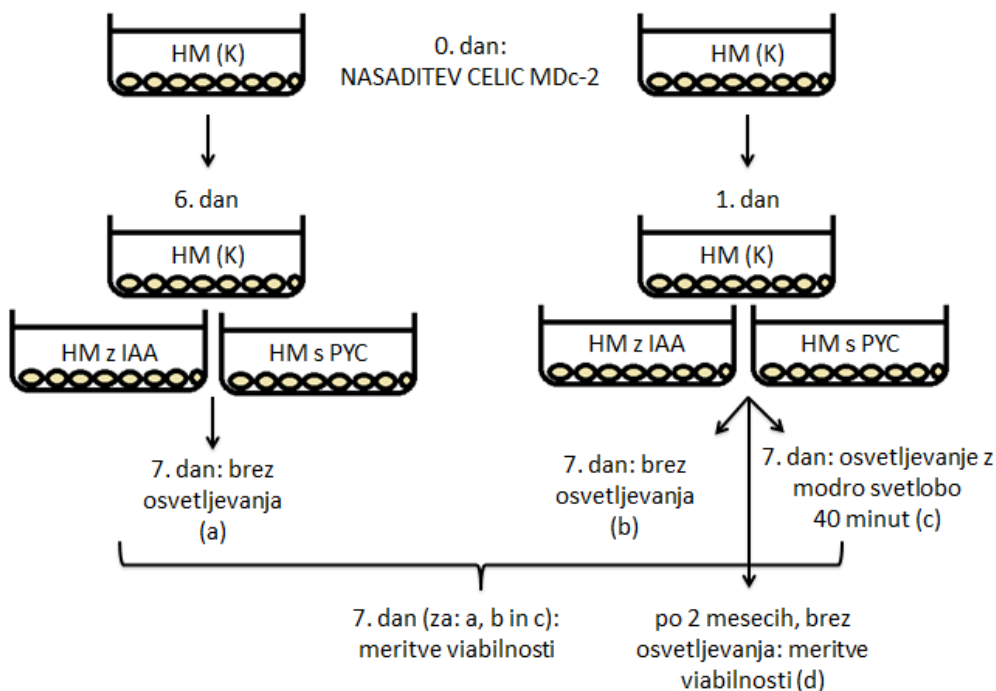
3.2.6 Določanje viabilnosti celic MDc-2

Viabilnost celic MDc-2 smo ugotavljali s štetjem celic na hemocitometru po predhodnem barvanju s tripanskim modrilom. Viabilnost smo izmerili:

- en teden starim celicam, ki smo jih 24 ur pred izvedbo testa viabilnosti gojili v HM (K) ali HM z IAA ali HM s PYC (slika 5a);
- en teden starim celicam, ki smo jih cel teden gojili v HM (K) ali HM z IAA ali HM s PYC (slika 5b);
- en teden starim celicam, ki smo jih cel teden gojili v HM (K), HM z IAA ali HM s PYC, nato pa smo jih pred izvedbo testa viabilnosti 40 minut osvetljevali z modro svetlobo (488 nm) (slika 5c);
- celicam, ki smo jih 2 meseca gojili v HM (K) ali HM z IAA ali HM s PYC (slika 5d).

Vsi poskusi so potekali v treh paralelkah (N = 3). Podatke smo zbrali v preglednici v Prilogi F, izračunali povprečno vrednost, standardni odklon in standardno napako ter s

Studentovim t-testom preverili, ali so med celicami, ki so bile izpostavljene različnim medijem, statistično značilne razlike v viabilnosti.



Slika 5: Shema izvedbe poskusa za določitev viabilnosti celic MDc-2.

3.2.7 Določanje metabolne aktivnosti celic

Z namenom ugotoviti, ali izvlečki obeh iglavcev spremenijo metabolno aktivnost celic MDc-2, smo uporabili test metabolne aktivnosti celic (test MTS). Metabolno aktivne celice razgradijo tetrazolijevo barvilo (reagent MTS) do obarvanega formazanskega produkta, ki je topen v HM, kjer gojimo celice. Z merjenjem absorbance pri 490 nm lahko določimo količino nastalega reduciranega produkta, ki je sorazmerna s številom živih celic (Promega, 2012).

Celice MDc-2 smo nasadili na mikrotiterne plošče s 96 vdolbinicami z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm². Za vsak izvleček in kontrolo smo nasadili 12 vdolbinic (N =

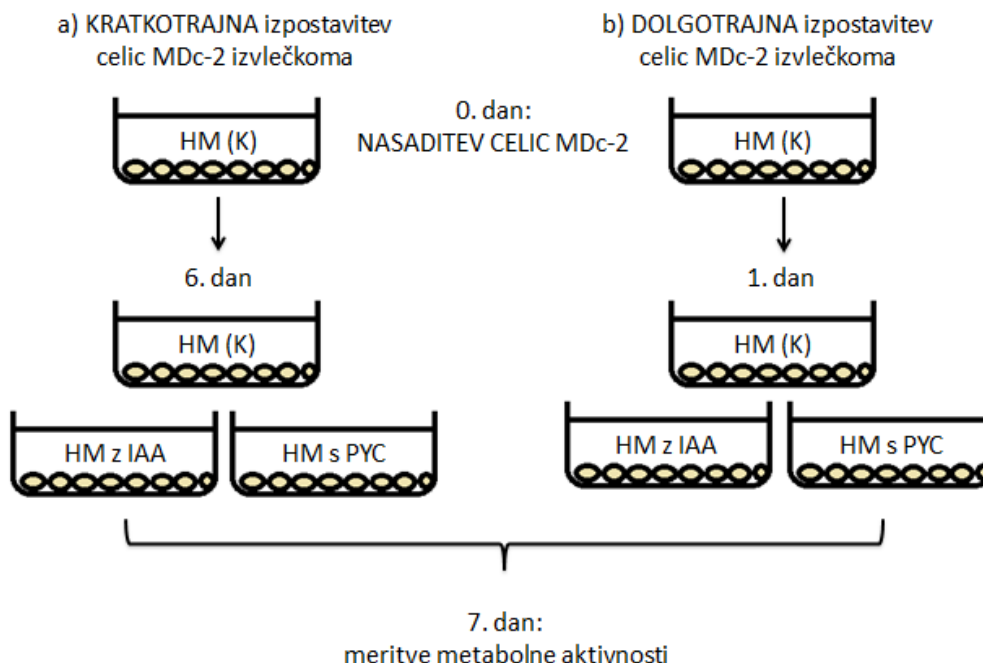
12). Pred izvedbo meritev metabolne aktivnosti celic MDc-2, so bile celice posameznemu izvlečku izpostavljene: a) 24 ur (slika 6a) ali b) 1 teden (slika 6b).

Sedmi dan po nasaditvi celic smo vsem vdolbinicam mikrotiterne plošče odpipetirali HM. Vdolbinice smo sprali s HM. Takoj za tem smo izvedli test metabolne aktivnosti celic, za kar smo uporabili kit za določanje viabilnosti celic s kolorimetrično metodo (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, 2012) in delali po navodilih proizvajalca. Fluorescenco vzorcev smo pomerili po 45 minutah s čitalcem mikrotiterskih plošč Tecan Infinite 200 pri valovni dolžini ekscitacije 492 nm in emisije 527 nm. Rezultate smo izrazili kot razmerje izmerjenih absorbanc:

$$\text{Relativna metabolna aktivnost celic} = (A_v - A_{k0}) / (A_k - A_{k0}), \quad \dots(3)$$

kjer je A_v absorbanca posameznih vzorcev celic, A_k absorbanca celic v HM brez izvlečkov, A_{k0} absorbanca HM brez celic. Podatki izmerjenih absorbanc so zbrani v Prilogi G.

Iz izmerjenih absorbanc (Priloga G) smo izračunali relativno metabolno aktivnost celic za posamezno meritev in podatke zbrali v Prilogi H. Izračunali smo še povprečno vrednost, standardni odklon in standardno napako ter s Studentovim t-testom preverili, ali so med celicami, ki so bile izpostavljene različnim medijem, statistično značilne razlike v relativnih vrednostih metabolne aktivnosti celic.



Slika 6: Shema izvedbe poskusa za določanje metabolne aktivnosti celic MDc-2.

3.2.8 Meritve prisotnosti ROS v celicah MDc-2

Za detekcijo nastalih ROS v celicah MDc-2 smo uporabili barvilo 6-karboksi-2, 7-diklorodihidrofluoresceindiacetat (karboksi- H_2DCFDA), ki omogoča, da nastanek in količino ROS spremljamo z merjenjem fluorescence. Barvilo karboksi- H_2DCFDA vstopi v celico, kjer mu znotrajcelične esteraze odstranijo acetatne skupine. Po aktivaciji z znotrajceličnimi esterazami je barvilo tarča oksidacije s strani ROS. Nastane fluorescirajoči karboksi-2,7-diklorofluorescein. Oksidacija karboksi- H_2DCFDA se odrazi v intenziteti fluorescence, ki jo lahko izmerimo.

Celice MDc-2 smo nasadili na mikrotiterne plošče s 96 vdolbinicami z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/ cm^2 . Za vsak izvleček in kontrolo smo nasadili 6 vdolbinic ($N = 6$). Pred izvedbo meritev prisotnosti ROS v celicah MDc-2, so bile celice posameznemu izvlečku izpostavljene: a) 24 ur (slika 7a) ali b) 1 teden (slika 7b).

Na dan izvedbe meritev prisotnosti ROS (en teden stare celice MDc-2) smo vse vdolbinice dvakrat sprali s pufrom PBS, ki je vseboval Ca^{2+} in Mg^{2+} ione

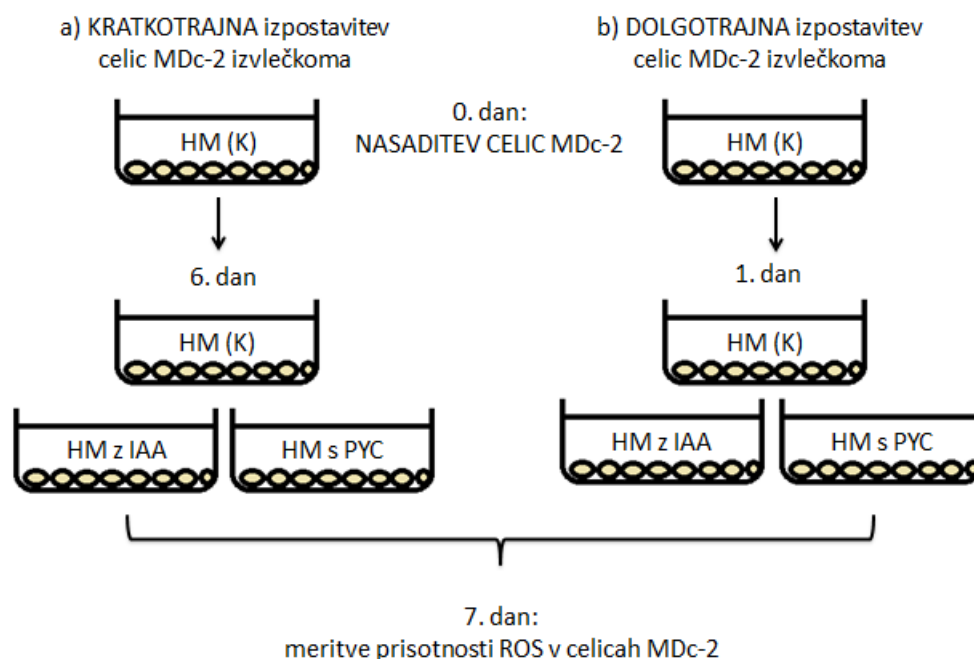
(PBS/Ca²⁺/Mg²⁺) in dodali 10 µM barvilo karboksi-H₂DCFDA v PBS/Ca²⁺/Mg²⁺. Celice smo z barvilom inkubirali 45 minut na 37 °C. Inkubacija je potekala v temi. Po 45-minutni inkubaciji smo vsako vdolbinico mikrotiterne plošče dvakrat sprali s pufrom PBS/Ca²⁺/Mg²⁺, nato pa dodali po 100 µl PBS/Ca²⁺/Mg²⁺ v vsako vdolbinico. Pomerili smo fluorescenco vzorcev s čitalcem mikrotiterskih plošč Tecan Infinite 200 pri valovni dolžini ekscitacije 492 nm in emisije 527 nm.

Za negativno kontrolo smo v prazne vdolbinice na mikrotiterski plošči dodali PBS/Ca²⁺/Mg²⁺ skupaj z 10 µM karboksi-H₂DCFDA. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 1 mM H₂O₂ v PBS/Ca²⁺/Mg²⁺, ki smo ga dodali celicam hkrati s karboksi-H₂DCFDA.

Za preračun količine ROS smo uporabili naslednjo enačbo:

$$\text{Relativna količina ROS v celicah} = (A_v - A_{k0}) / (A_k - A_{k0}), \quad \dots(4)$$

kjer je A_v fluorescenca posameznih vzorcev celic, A_k fluorescenca celic v HM brez izvlečkov, A_{k0} fluorescenca PBS/Ca²⁺/Mg²⁺ (brez celic).



Slika 7: Shema izvedbe poskusa za določanje prisotnosti ROS v celicah MDc-2.

Za izračun količine ROS v celicah, ki so bile med 45-minutno inkubacijo izpostavljene H_2O_2 v $\text{PBS}/\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ smo uporabili enačbo (4), kjer smo kot A_{k0} upoštevali meritve fluorescence H_2O_2 v $\text{PBS}/\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (brez celic).

Vsi podatki so zbrani v Prilogi I. Izračunali smo povprečne vrednosti količine ROS v celicah, standardni odkon in standardno napako. Rezultate smo vrednotili s statistično metodo Studentovim t-testom.

3.2.9 Priprava vzorcev za presevno elektronsko mikroskopijo

Za pregled ultrastrukture celic smo uporabili celice MDc-2, ki so bile 2 meseca od dneva nasaditve v osnovnem hranilnem mediju brez izvlečkov HM (K), HM z IAA ali HM s PYC.

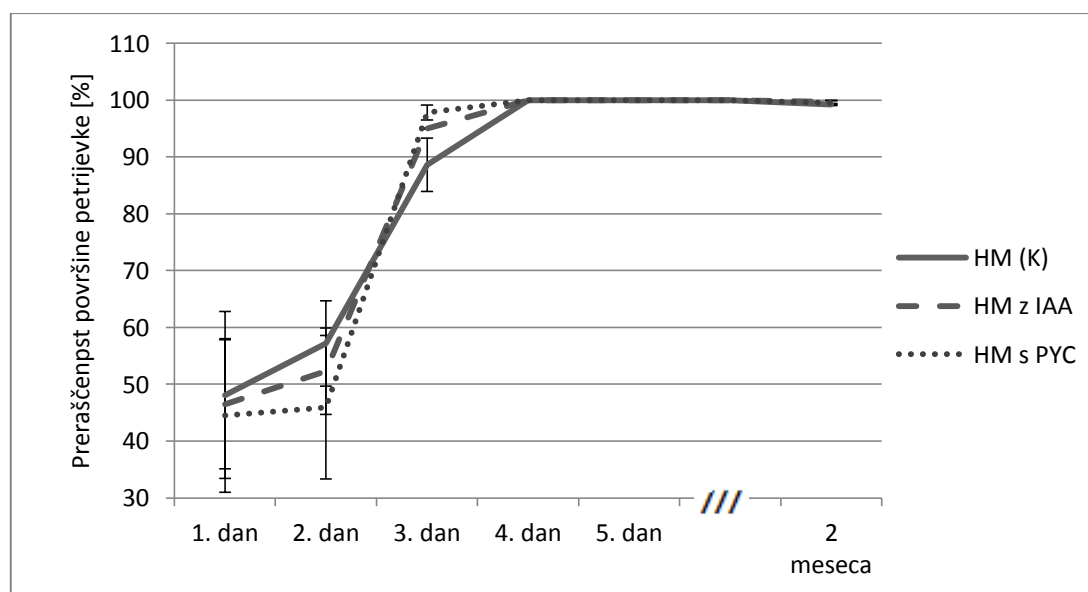
Pri pripravi preparatov za presevno elektronsko mikroskopijo smo celice najprej fiksirali 3 ure v mešanici 4,5 % paraformaldehida (w/v) in 2 % glutaraldehida (v/v) (pri 4 °C). Čez noč je sledilo spiranje pri 4 °C z 0,2 M kakodilatnim pufrom (pH 7,2 - 7,4). Celice smo naslednji dan 1 uro (pri 4°C) postfiksirali v 2 % osmijevem tetraoksidu (OsO_4) v 0,2 M kakodilatnem pufru. Po osmiranju smo celice sprali z destilirano vodo. Nato smo dodali raztopljeni 2 % uranilacetat v vodni raztopini za 1 uro pri sobni temperaturi v temi in potem sprali z destilirano vodo. Sledila je dehidracija z alkoholi (etanol) in vklop v Epon. Na ultratankih rezinah (60 nm) smo učinke antioksidantov preverili s presevnim elektronskim mikroskopom (Philips CM100).

4 REZULTATI

4.1 VPLIV IAA IN PYC NA HITROST RAZRAŠČANJA CELIC MDc-2 PO PODLAGI

Prvih 24 ur so celice MDc-2 rastle v HM (K), od prvega dne dalje pa v HM z izbranim izvlečkom ali v HM (K). Ugotovili smo, da je bila že 2. dan (ko so bile celice prvih 24 ur v različnih hranilnih medijih) hitrost razraščanja celic v HM z IAA in v HM s PYC višja kot v HM (K) (slika 8; naklona krivulj HM z IAA in HM s PYC sta bolj strma od naklona krivulje HM (K)). Tretji dan je bila preraščenost petrijevke s celicami MDc-2 v HM z IAA in HM s PYC večja kot v primeru uporabe HM (K). V vseh treh hranilnih medijih so celice dosegle konfluentnost v manj kot tednu dni. Po 2 mesecih od dneva nasaditve so se celice pričele luščiti, zato rahel padec v pokritosti površine petrijevke. Pokritost površine s celicami pri vseh petrijevkah je bila v zadnjem mesecu opazovanja med 99% in 100% (Priloga C).

Ugotovili smo, da je hitrost razraščanja celic MDc-2 v izbranih HM podobna (Studentov t-test, $p > 0,05$).



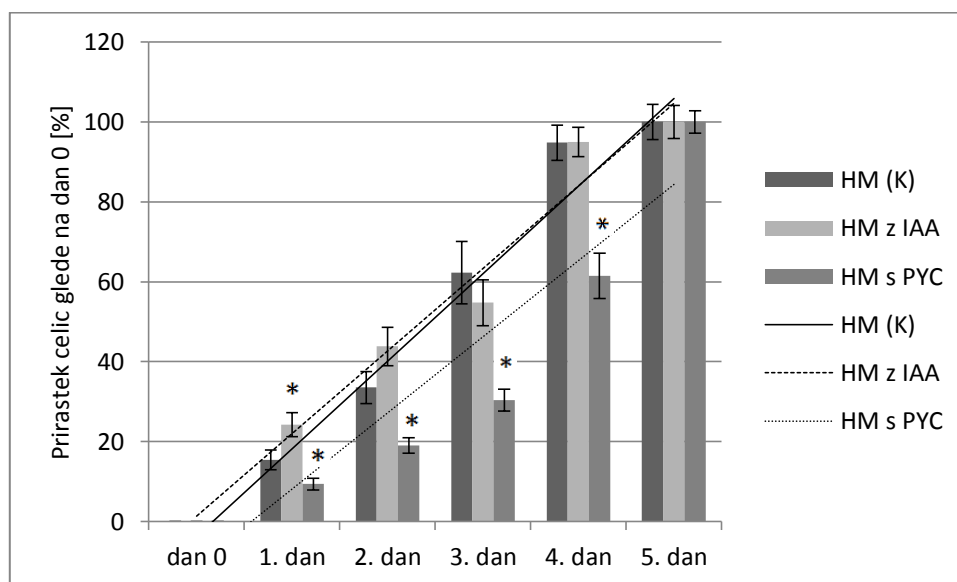
Slika 8: Spremljanje rasti celic v različnih HM od dneva nasaditve celic dalje. Preraščenost petrijevke je izražena v odstotkih. Najhitreje se začno razraščati celice v HM brez izvlečkov (HM). Po dveh dneh pa je

razraščanje hitrejše pri celicah v HM z IAA ali v HM s PYC. Od petega dne dalje je bila preraščenost petrijevk s celicami 100%.

4.2 VPLIV IAA IN PYC NA OBNOVITVENO SPOSOBNOST CELIC MDc-2

Obnovitveno sposobnost celic MDc-2 smo preverili s testom zaraščanja poškodbe ("wound healing"). Rezultati so prikazani kot relativne vrednosti $\pm$ SE v celičnem prirastku glede na dan ranitve.

V prvih 24 urah je obnovitvena sposobnost celic MDc-2 v HM z IAA statistično značilno večja od celic v kontroli (HM (K)), od 2. do 5. dne pa podobna s celicami v HM (K). Obnovitvena sposobnost celic MDc-2, ki so bile v HM s PYC, je v prvih 4 dneh v primerjavi s kontrolo statistično značilno manjša. Peti dan je obnovitvena sposobnost celic MDc-2 v vseh izbranih HM podobna (Slika 9, Priloga D).



Slika 9: Obnovitvena sposobnost celic MDc-2 po dnevih glede na dan poškodbe (dan 0). Studentov t-test je v prvih 4 dneh pokazal statistično značilno manjšo obnovitveno sposobnost celic, ki so bile v HM s PYC glede na kontrolo (celice v HM (K)). Obnovitvena sposobnost celic MDc-2 v HM z IAA je prvi dan statistično značilno večja, kasneje pa podobna kontroli. Legenda: * $p < 0,05$ (Studentov t-test).

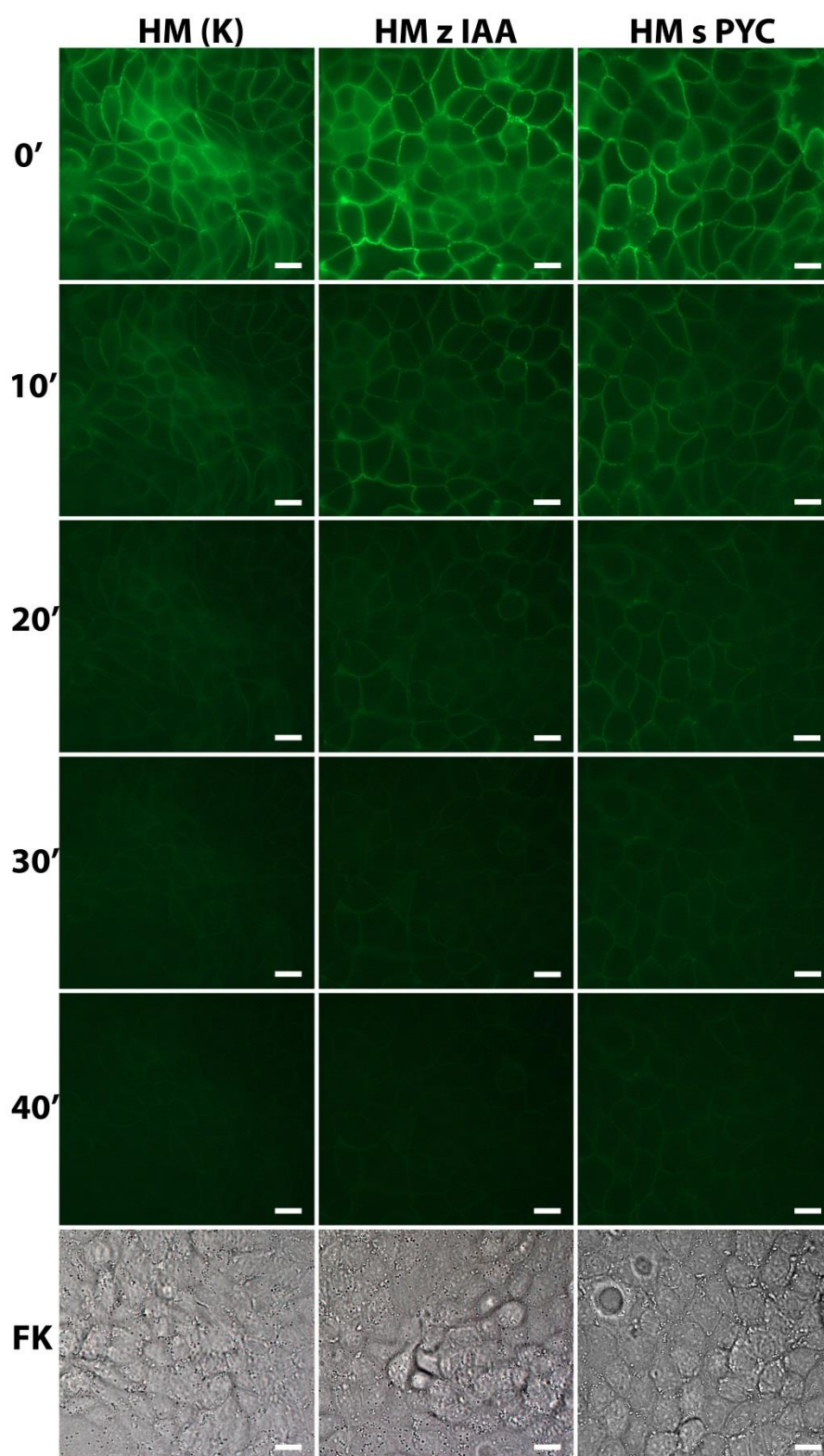
4.3 VPLIV IAA IN PYC NA INTENZITETO FLUORESCENCE DEZMOKOLINA-GFP (Dsc2-GFP) V CELICAH MDc-2

Celice MDc-2 smo pred začetkom osvetljevanja gojili v HM (K) ali HM z IAA ali HM s PYC bodisi cel teden bodisi tik pred začetkom osvetljevanja. Osvetljevali smo jih 40 minut z modro svetlobo. Primerjali smo intenzitete fluorescence Dsc2-GFP v celicah v HM brez ali z izvlečkoma (IAA ali PYC). Primerjali smo tudi naklone trendnih črt. Ugotovili smo, da izbrana izvlečka upočasnita hitrost bledenja fluorescence Dsc2-GFP.

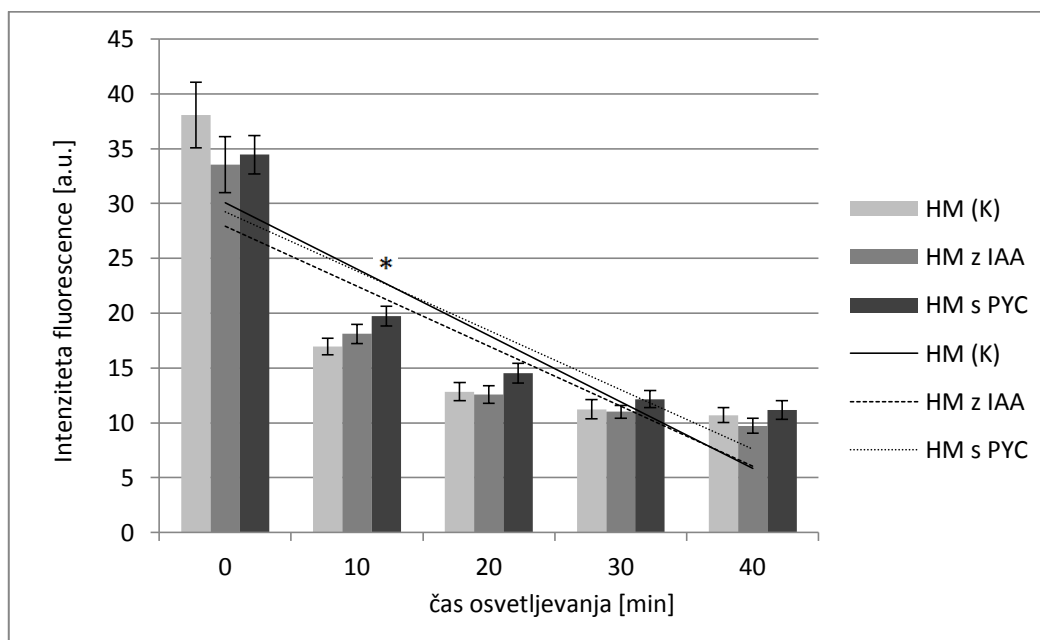
4.3.1 Intenzitete fluorescence Dsc2-GFP, ko celicam MDc-2 dodamo HM z IAA ali HM s PYC tik pred začetkom osvetljevanja

Intenziteta fluorescence Dsc2-GFP v izbranih HM je bila v celotnem času opazovanja celic MDc-2 podobna (Studentov t-test, $p > 0,05$) (slika 10 in 11). V deseti minuti opazovanja je bila intenziteta fluorescence Dsc2-GFP v celicah v HM s PYC statistično značilno višja (Studentov t-test, $p < 0,05$) (slika 11) (Priloga E).

Trendne črte smo analizirali s statističnim postopkom ANOVA. Primerjali smo tudi smerne koeficiente premic. Smerni koeficient Δk bledenja fluorescence Dsc2-GFP je bil pri kontroli -6,05. Smerni koeficient bledenja fluorescence Dsc2-GFP je bil manjši, če so bile celice v HM z izbranim izvlečkom. Ko so bile celice v HM z IAA, je bil smerni koeficient bledenja fluorescence $\Delta k = -5,48$. Ko pa so bile celice v HM s PYC, je bil smerni koeficient bledenja fluorescence $\Delta k = -5,42$ (slika 11). Čeprav se vidi trend počasnejšega bledenja fluorescence Dsc2-GFP, če so celice v HM z izbranim izvlečkom, statistična analiza ANOVA ni pokazala statistično značilnih razlik v naklonu trendnih črt ($p > 0,05$).



Slika 10: Intenziteta fluorescence Dsc2-GFP v celicah MDc-2 v različnih HM, dodanih tik pred začetkom osvetljevanja. Čas osvetljevanja 0-40 minut. Stolpci: (HM (K)) Celice MDc-2 v HM brez izvlečkov. (HM z IAA) Celice MDc-2 v HM z dodatkom IAA. (HM s PYC) Celice MDc-2 v HM z dodatkom PYC. (FK) Po koncu osvetljevanja posnetek osvetljevanih celic s faznim kontrastom. Velikost merilca: 10 µm.

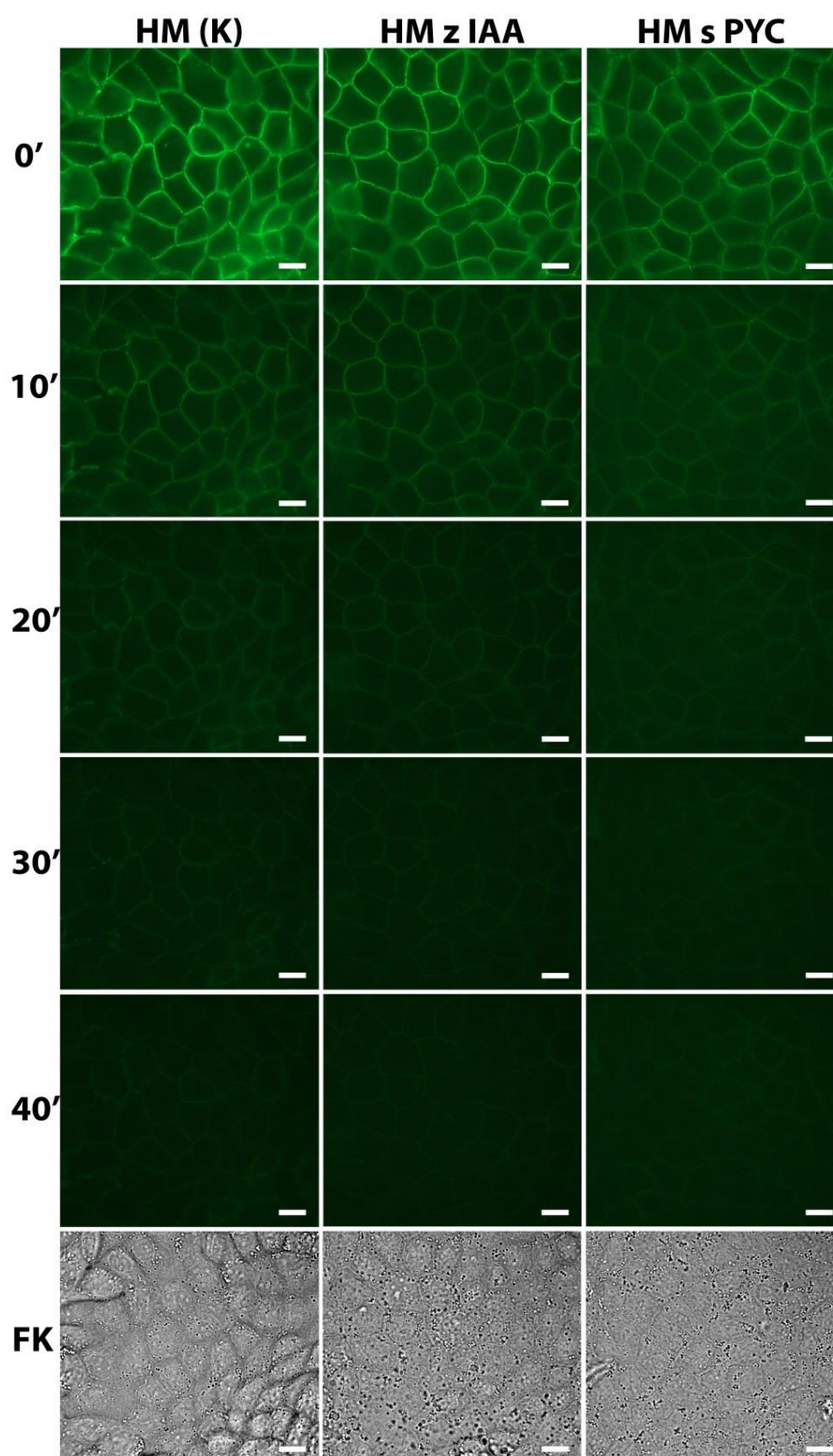


Slika 11: Primerjava intenzitete zelene fluorescence Dsc2-GFP celic MDc-2 v različnih HM, dodanih tik pred začetkom osvetljevanja. Prikazani so različni časi osvetljevanja. Intenziteta fluorescence Dsc2-GFP je bila statistično značilno manjša v celicah, ki so bile v HM s PYC, v 10. minuti osvetljevanja. Legenda: * $p < 0,05$ (Studentov t-test).

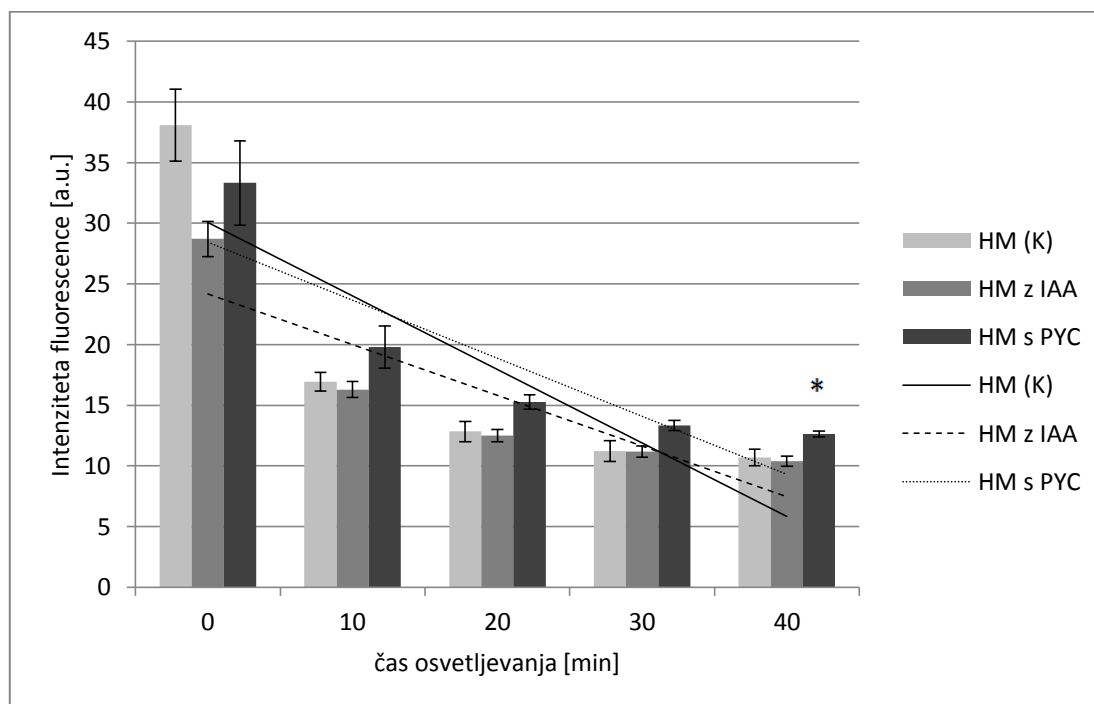
4.3.2 Intenzitete fluorescence Dsc2-GFP, ko celicam MDC-2 dodajamo HM z IAA ali HM s PYC 7 dni pred začetkom osvetljevanja

Intenziteta fluorescence Dsc2-GFP je bila v prvih 30 minutah osvetljevanja podobna v vseh celicah, ne glede na HM (slika 12 in 13). Po 40 minutah opazovanja pa je bila intenziteta fluorescence Dsc2-GFP v celicah v HM s PYC statistično značilno višja (slika 13, Priloga E).

Trendne črte smo analizirali s statističnim postopkom ANOVA. Primerjali smo tudi smerne koeficiente premic. Smerni koeficient Δk bledenja fluorescence Dsc2-GFP je bil pri kontroli -6,05. Smerni koeficient bledenja fluorescence Dsc2-GFP je bil manjši, če so bile celice v HM z izbranim izvlečkom. Ko so bile celice v HM z IAA, je bil smerni koeficient bledenja fluorescence $\Delta k = -4,17$. Ko pa so bile celice v HM s PYC, je bil smerni koeficient bledenja fluorescence $\Delta k = -4,78$ (slika 13). Čeprav se vidi trend počasnejšega bledenja fluorescence Dsc2-GFP, če so celice v HM z izbranim izvlečkom, analiza ni pokazala statistično značilnih razlik v naklonu trendnih črt ($p > 0,05$).



Slika 12: Intenziteta fluorescence celic MDc-2, ki so bile 1 teden v različnih HM. Čas osvetljevanja 0-40 minut. Stolpci: (HM (K)) Celice MDc-2 v HM brez izvlečkov. (HM z IAA) Celice MDc-2 v HM z dodatkom IAA. (HM s PYC) Celice MDc-2 v HM z dodatkom PYC. (FK) Po koncu osvetljevanja posnetek osvetljevanih celic s faznim kontrastom. Velikost merilca: 10 μ m.



Slika 13: Primerjava intenzitete zelene fluorescence Dsc2-GFP celic MDc-2, ki so bile 1 teden v HM (K) in v HM s posameznim izvlečkom, po različnih časih osvetljevanja. Statistično značilno višjo intenziteto fluorescence med vzorci smo ugotovili pri celicah v HM s PYC v zadnji minuti osvetljevanja. Legenda: * $p < 0,05$ (Studentov t-test).

4.4 VPLIV OSVETLJEVANJA IN IZVLEČKOV IAA IN PYC NA VIABILNOST CELIC MDc-2

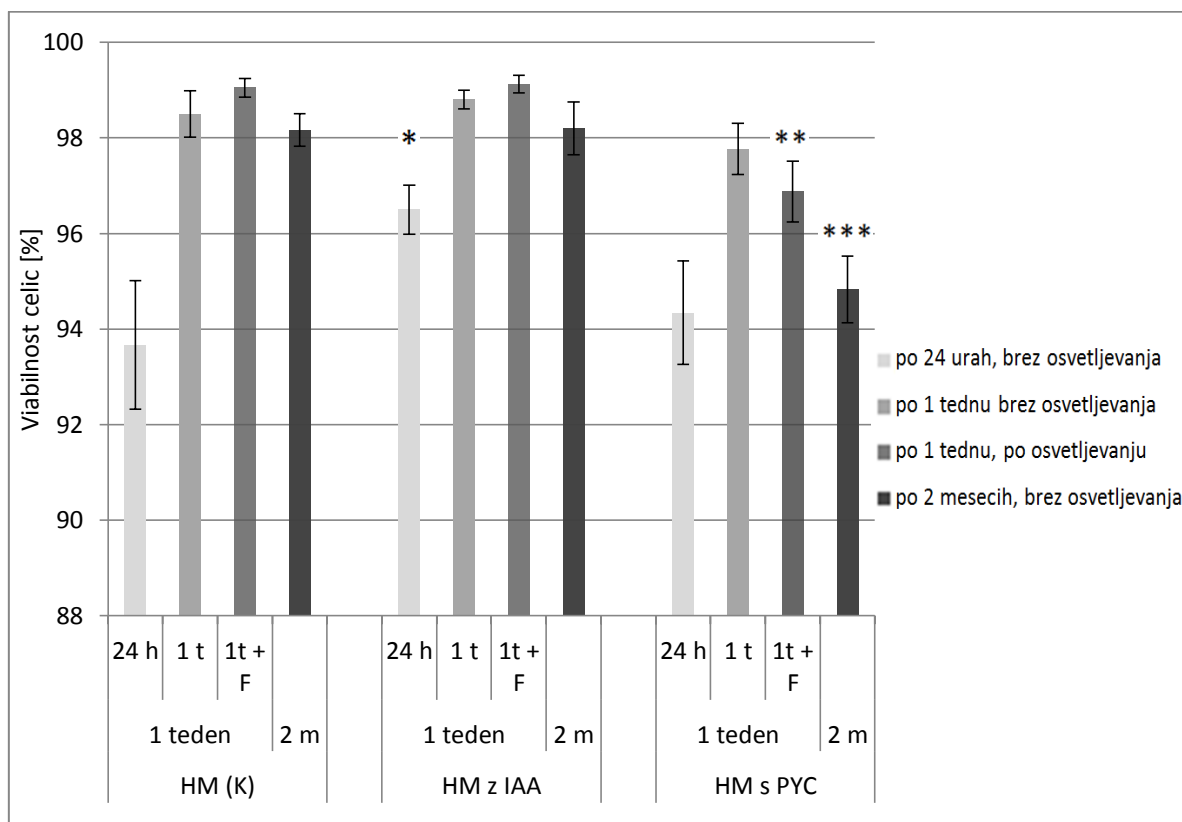
Viabilnost celic je bila pri vseh vzorcih, ne glede na izvleček ali čas izpostavljanja celic izvlečkom, visoka, in sicer nad 92% (slika 14, Priloga F).

Primerjali smo viabilnosti celic MDc-2, ki so rastle v treh različnih HM le zadnjih 24 ur pred izvedbo meritev (slika 4, oznaka 24 h) in ugotovili, da so imele celice v HM z IAA statistično značilno višjo viabilnost kot celice v kontroli ali v HM s PYC. Viabilnost celic v HM z IAA je bila $96,50 \pm 0,51$ %, v HM s PYC $94,34 \pm 1,08$ % in v HM (K) $93,42 \pm 1,14$ %. Med viabilnostjo celic v HM (K) in HM s PYC ni bilo statistično značilnih razlik.

Če so celice MDc-2 rastle v treh različnih HM cel teden pred izvedbo meritev (slika 4, oznaka 1 t), je bila njihova viabilnost v vseh izbranih medijih podobna, in sicer v HM (K) $99,05 \pm 0,20$ %, v HM z IAA $98,80 \pm 0,20$ % in v HM s PYC $97,77 \pm 0,54$ %.

Če so celice MDc-2 rastle v različnih HM cel teden in bile nato osvetljevane z modro svetlobo (488 nm) 40 minut (slika 4, oznaka 1 t + F), se je izkazalo, da celicam MDc-2 v HM s PYC osvetljevanje škodi. Viabilnost teh celic je bila po osvetljevanju statistično značilno nižja ($96,88 \pm 0,64$ %) od viabilnosti celic v HM (K) ($99,05 \pm 0,20$ %) in v HM z IAA ($99,13 \pm 0,18$ %). Primerjava viabilnosti kontrolnih celic ($99,05 \pm 0,20$ %) s celicami v HM z IAA ($99,13 \pm 0,18$ %) ni pokazala statistično značilnih razlik.

Primerjali smo tudi viabilnosti celic MDc-2, ki so bile 2 meseca pred izvedbo meritev v HM (K) ali HM z IAA ali PYC (slika 4, oznaka 2 m) in ugotovili, da je bila viabilnost celic v HM z IAA višja ($98,20 \pm 0,55$ %) od viabilnosti celic v kontroli ($98,17 \pm 0,34$ %), a ne statistično značilno različna (Studentov t-test, $p > 0,05$). Viabilnost celic, ki smo jih 2 meseca gojili v HM s PYC, je bila statistično značilno nižja ($94,83 \pm 0,70$ %) od viabilnosti kontrolnih celic ($98,17 \pm 0,34$ %) in od viabilnosti celic v HM z IAA ($98,20 \pm 0,55$ %).

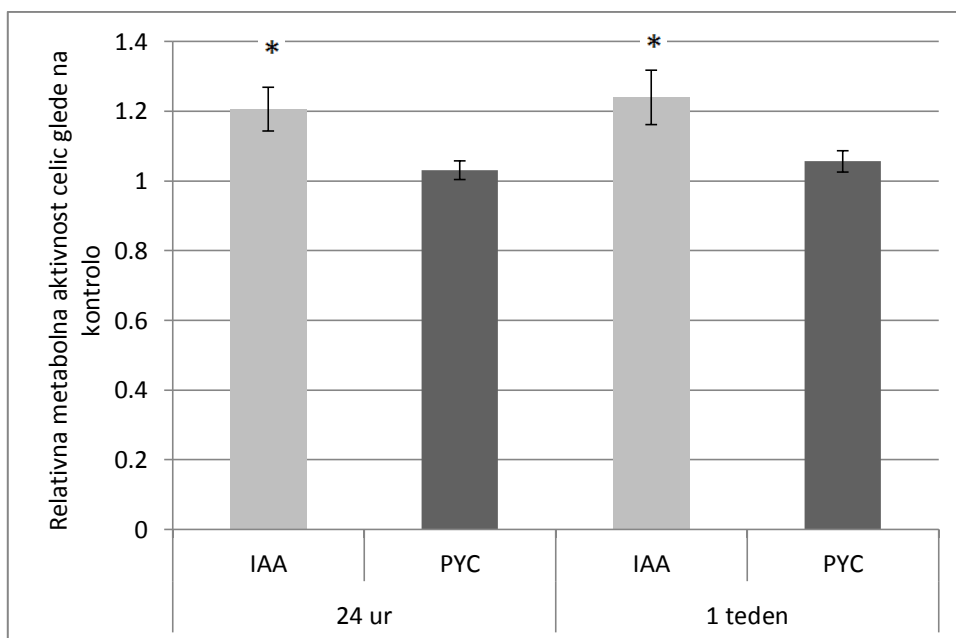


Slika 14: Viabilnost celic MDc-2 po dodatku IAA ali PYC v različnih časih izpostavitve, z ali brez osvetljevanja v primerjavi s kontrolnim medijem. Viabilnost 1 teden starih celic MDc-2, ki so bile izpostavljene HM z IAA ali HM s PYC 24 ur (oznaka: 24 h), 1 teden starih celic MDc-2, ki so bile celoten teden v različnih HM, brez osvetljevanja (oznaka: 1 t) in po 40 minutah osvetljevanja z modro svetlobo (oznaka: 1t + F) ter celic MDc-2, ki so bile izvlečkoma izpostavljene 2 meseca od dneva nasaditve (oznaka: 2 m). Legenda: * Viabilnost 1 teden starih celic, ki so bile 24 ur v HM z IAA in niso bile osvetljevale, je statistično značilno višja kot viabilnost celic v HM (K) in HM s PYC (Studentov t-test, $p < 0,05$). ** Statistično značilno nižja viabilnost 1 teden starih celic, ki so bile 1 teden v HM s PYC, po osvetljevanju - glede na viabilnost celic v HM (K) in HM z IAA (Studentov t-test, $p < 0,05$). *** Statistično značilno nižja viabilnost 2 meseca starih celic, ki so bile 2 meseca v HM s PYC - glede na viabilnost celic v HM (K) in HM z IAA (Studentov t-test, $p < 0,05$).

4.5 VPLIV IZVLEČKOV IAA IN PYC NA METABOLNO AKTIVNOST CELIC MDc-2

Metabolna aktivnost celic MDc-2 v HM z IAA je bila statistično značilno višja od metabolne aktivnosti kontrolnih celic ne glede na čas izpostavitve IAA. Pri kratkotrajni izpostavitvi IAA je bila relativna metabolna aktivnost celic glede na kontrolo $1,21 \pm 0,06$, pri dolgotrajni izpostavitvi IAA pa $1,24 \pm 0,08$ (slika 15, Priloga H).

Metabolna aktivnost celic MDc-2 v HM s PYC ni bila statistično značilno različna od metabolne aktivnosti kontrolnih celic ne glede na dolžino izpostavitve. Pri kratkotrajni izpostavitvi PYC (zadnjih 24 ur pred izvedbo testa MTS) je bila relativna metabolna aktivnost celic glede na kontrolo $1,06 \pm 0,03$, pri dolgotrajni izpostavitvi PYC (1 teden) pa $1,03 \pm 0,03$ (slika 15, Priloga H).



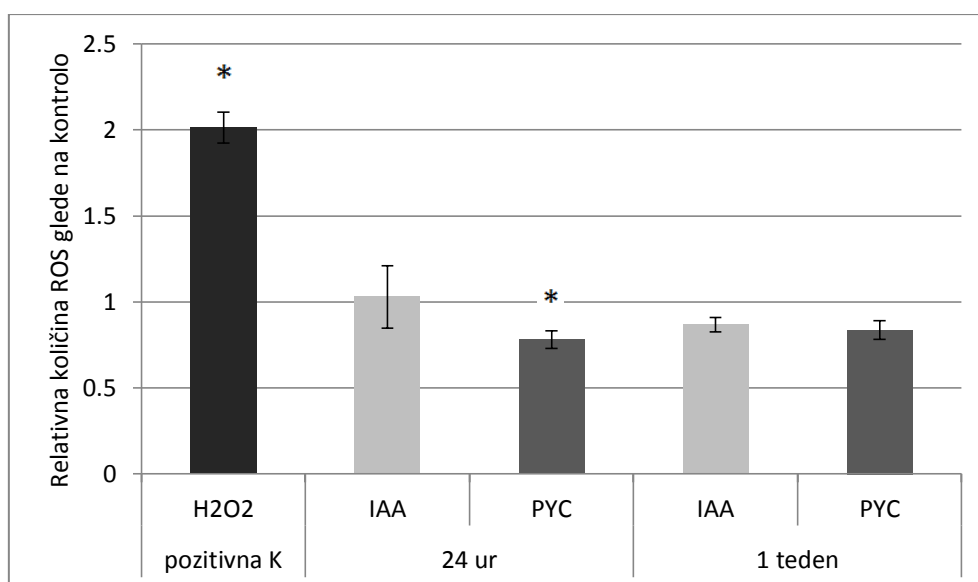
Slika 15: Primerjava metabolne aktivnosti 1 teden starih celic MDc-2, ki so bile izpostavljene HM z IAA ali HM s PYC bodisi zadnjih 24 ur bodisi en teden pred testom MTS. Prikazana je relativna metabolna aktivnost celic glede na metabolno aktivnost celic v HM (K). Vrednosti so prikazane kot povprečne vrednosti metabolne aktivnosti celic $\pm$ SE. Legenda: * $p < 0,05$ (Studentov t-test).

4.6 VPLIV IZVLEČKOV IAA IN PYC NA PRISOTNOST ROS V CELICAH MDc-2

V celicah, ki smo jih kratkotrajno (24 ur) izpostavili HM z IAA, je bila relativna količina ROS podobna kontroli, in sicer $1,03 \pm 0,05$. V celicah, ki so bile 24 ur v HM s PYC, pa se je relativna količina ROS statistično značilno zmanjšala glede na kontrolo ($0,78 \pm 0,04$).

Če so bile celice izvlečkoma izpostavljene dalj časa (1 teden), je bila relativna količina ROS v celicah v HM z IAA $0,87 \pm 0,05$ in v celicah v HM s PYC $0,84 \pm 0,04$. V obeh primerih je bila torej nižja kot pri kontroli, vendar razlika ni bila statistično značilno različna.

Analiza je pokazala, da dodatek izvlečka PYC v HM za 24h v celicah MDc-2 zmanjša količino ROS (slika 16, Priloga I).



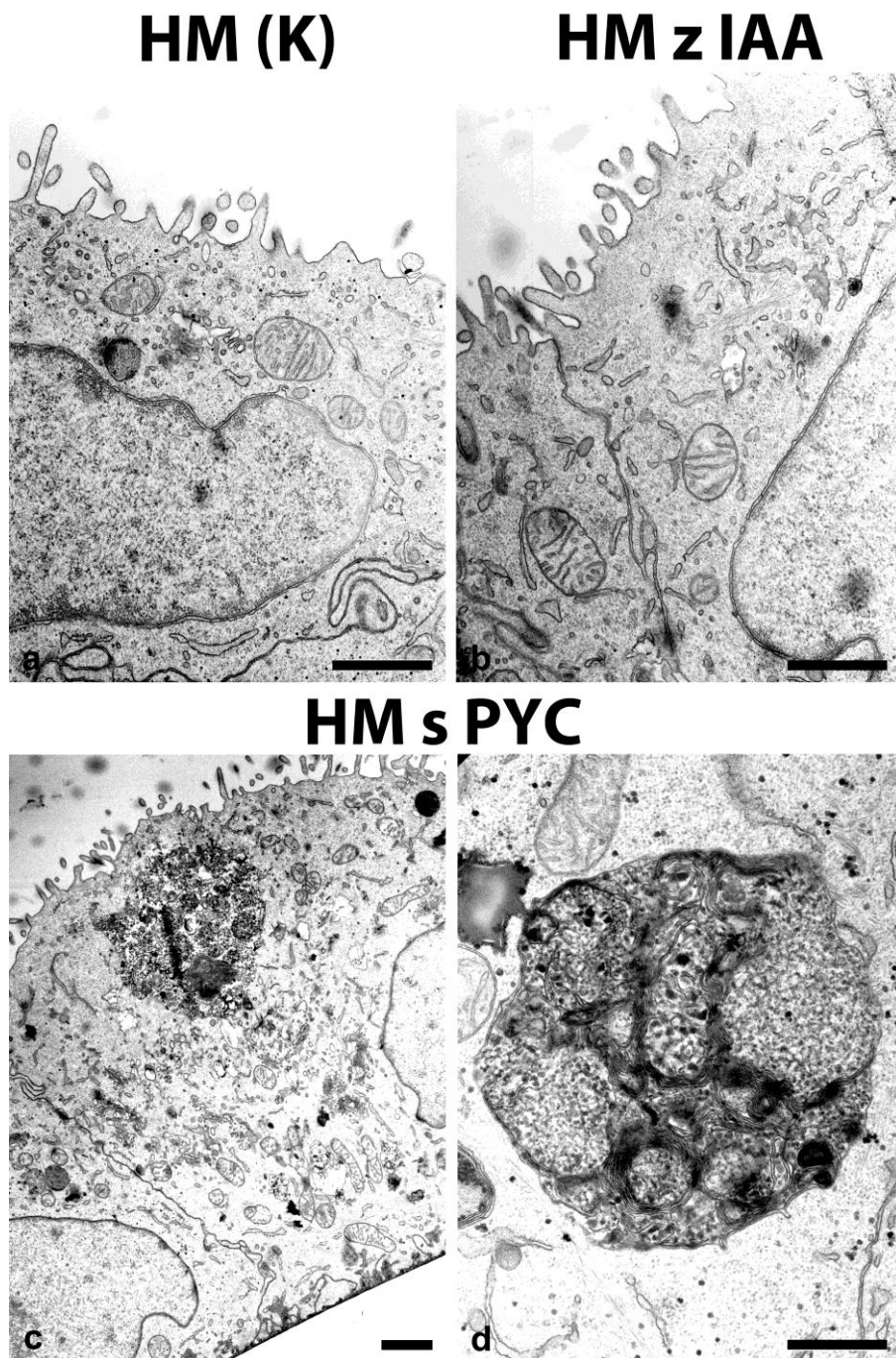
Slika 16: Prisotnost ROS v 1 teden starih celicah MDc-2, ki so bile kratkotrajno (24 ur) ali dolgotrajno (1 teden) izpostavljene medijem z izbranim izvlečkom (HM z IAA ali HM s PYC). Relativna količina ROS je prikazana glede na količino ROS v celicah v HM (K). Za pozitivno kontrolo smo izmerili količino ROS v 1 teden starih celicah MDc-2, ki smo jim dodali vodikov peroksid. Legenda: *p < 0,05 (Studentov t-test).

4.7 VPLIV IAA IN PYC NA ULTRASTRUKTURO CELIC MDc-2

S presevno elektronsko mikroskopijo smo preverili učinke dolgotrajnega (2 meseca) delovanja IAA in PYC na celice MDc-2.

Dokazali smo, da se ultrastruktura celic po 2 mesecih v HM z IAA (slika 17 b) ne razlikuje od ultrastrukture celic v HM brez izvlečkov (slika 17 a). Celice, ki so bile 2

meseca v HM s PYC, so za razliko od kontrolnih celic vsebovale več avtofagnih vakuol (slika 17 c in d). Prisotne so bile tudi posamezne nekrotične celice.



Slika 17: Ultrastruktura celic MDc-2 po 2 mesecih izpostavljenosti različnim HM. (a) kontrola (HM (K)); (b) HM z IAA; (c) HM s PYC; (d) povečana avtofagna vakuola celice MDc-2, ki je bila v HM s PYC. Merilca: 1 μ m.

5 RAZPRAVA

Vpliv delovanja proučevanih izvlečkov IAA in PYC na organizme in na same celice je slabo raziskan. To velja predvsem za IAA, ki je novost na tržišču. V magistrski nalogi smo ugotavljali vpliv izbranih izvlečkov na rast celic MDc-2 in njihovo sposobnost obnavljanja, učinkovitost izvlečkov pri preprečevanju bledenja GFP ter ovrednotili njihovo antioksidativno moč.

Izpostavitve celic UV-svetlobi sproži nastanek ROS (Dailey in sod., 2006; Kremers in sod., 2011). Sime in sod. so pokazali, da nanos losjona z 0,1 % PYC na kožo po tem, ko je bila izpostavljena UV-svetlobi, zmanjša vnetno reakcijo kože in nastanek opeklin. Nanos losjona s PYC pri kronični izpostavljenosti kože UV-svetlobi zavre nastanek tumorjev. Glavna spojina v PYC, ki omogoča zaščitni učinek, je procianidin. Procianidin absorbira UV-svetlobo in prepreči njeno škodljivo delovanje (Sime in sod., 2004). Na podlagi zgoraj omenjenih raziskav smo sklepali, da bo dodatek PYC v HM ščitil celice pred modro svetlobo (488 nm), s katero smo jih osvetljevali 40 minut. Meritve viabilnosti so pokazale, da PYC v primerjavi s celicami v HM (K) in tistimi v HM z IAA slabše ščiti celice pred modro svetlobo, s katero smo jih osvetljevali. Prav tako se je izkazalo, da je viabilnost celic v HM s PYC po 40 minutah osvetljevanja nižja od viabilnosti celic pred osvetljevanjem, kar pa ne velja za celice v HM (K) in v HM z IAA. Viabilnost celic v HM (K) in celic v HM z IAA je bila po osvetljevanju višja od viabilnosti celic, ki jih nismo osvetljevali. Nižja viabilnost celic v HM s PYC bi lahko bila tudi posledica daljšega delovanja proteolitičnega encima, ki je bil potreben za pripravo celične suspenzije. Za prekinitev medceličnih stikov je bil namreč za celice v HM s PYC potreben daljši čas kot za celice v HM z IAA ali celice v HM (K). To posredno lahko pomeni, da so imele celice v HM s PYC močnejše medcelične stike kot celice v HM (K) ali celice v HM z IAA ali pa je PYC zmanjšal delovanje proteolitičnih encimov.

Po dveh mesecih izpostavljanja celic HM s posameznim izvlečkom, je bila viabilnost celic najnižja v HM s PYC. Številke potrjujejo tudi sprotne opažanja. Ob vsaki menjavi HM je bilo v stekleničkah s HM s PYC največ od podlage ločenih odmrlih celic.

Viabilnost celic je bila najvišja v HM z IAA ne glede na čas izpostavljenosti IAA ali osvetljevanje.

5.1 IAA POSPEŠI, PYC PA UPOČASNI PRERAŠČANJE POŠKODBE

Piknogenolu je bilo dokazano antioksidativno in protivnetno delovanje (Jeong in sod., 2013; Grohar, 2012, Kim, 2011; Mikelj, 2012). Gouchang (1993) ter Packer in sod. (1999) so preverili učinkovitost PYC pri zaščiti različnih tkiv pred poškodbami, povzročenimi z UV-sevanjem. Ugotovili so, da PYC ščiti človeške fibroblaste pred lipidno peroksidacijo (Guochang, 1993) in zmanjša citotoksičen vpliv UV-sevanja na primarne keratinocyte ter celično linijo keratinocitov HaCaT.

Piknogenol pospešuje tudi celjenje površinskih ran, a zavira nastanek krast (Blazso in sod., 2004). Proučevano je bilo tudi celjenje globljih dermalnih ran. Pokazalo se je, da je gibanje epitelnih celic ob dodatku PYC počasnejše v primerjavi s kontrolo. Prav tako je bilo ugotovljeno, da so se po treh dneh od nastanka ran te še rahlo povečale, nato pa v nadaljnjih dveh dneh zmanjšale. Po sedmih dneh je bila velikost ran, zdravljenih s PYC, manjša kot pri kontroli (Jeong in sod., 2013). V naši nalogi smo pokazali, da dodatek PYC v poškodovano celično kulturo v prvih 4 dneh upočasni njeno zaraščanje. To se ujema z rezultati Jeong in sod. (2013). Pri proučevanju hitrosti preraščanja površine petrijevke od dneva nasaditve, se je prav tako izkazalo, da dodatek PYC v medij v prvih 24 urah upočasni proliferacijo in razraščanje celic v primerjavi s celicami v HM (K) in tudi v primerjavi s celicami v HM z IAA.

Nasprotno je dodatek IAA v HM pospešil obnovitveno sposobnost celic MDc-2, in sicer v prvih 24 urah od dneva ranitve. Kasneje se je zaraščanje poškodbe odvijalo podobno hitro kot pri celicah v kontroli. Obnovitvena sposobnost celic v HM z IAA se ujema tudi s hitrostjo preraščanja celic. Tudi s tem poskusom smo pokazali stimulativen učinek IAA na proliferacijo in razraščanje celic v prvih dneh po nasaditvi.

5.2 DODATEK IZVLEČKOV IAA ALI PYC V HM NE UPOČASNI HITROSTI BLEDENJA FLUORESCENCE Dsc2-GFP

Če FP vzbujamo s kratkovalovno svetlobo, se tvorijo ROS (Dailey in sod., 2006; Kremers in sod., 2011), ki so odgovorni za bledenje fluorescence (Dailey in sod., 2006; Alnuami, 2008). Fototoksični učinek svetlobe se lahko zmanjša z dodajanjem antioksidantov v medij, v katerem so opazovane celice (Dailey in sod., 2006).

Alnuami in sod. (2008) so ugotovili, da fluorescenca GFP blede, če se GFP izpostavi H_2O_2 ali če se ga osvetljuje z UV-svetlobo. Če so uporabili kombinacijo H_2O_2 in UV, je bilo bledenje fluorescence GFP še hitrejše. V tem primeru je po 10 minutah fluorescenca GFP padla na 40 % začetne intenzitete fluorescence. Ob dodatku različnih antioksidantov (to je tiouree, askorbata in DMSO) pred izpostavitvijo H_2O_2 , se je po 30 minutah izpostavljanja UV-svetlobi izguba fluorescence zmanjšala. Antioksidativno moč DMSO pri preprečevanju bledenja fluorescence pri osvetljevanju z modro svetlobo je na celicah MDc-2 pokazala tudi Berčič (2012). Proučila je tudi vpliv resveratrola in kurkumina na preprečevanje bledenja Dsc2-GFP, vendar ta dva antioksidanta nista preprečila bledenja.

V naši raziskavi smo preverili, kako učinkoviti so antioksidanti iz IAA in PYC pri preprečevanju bledenja fluorescence. Polifenoli, ki so v izvlečkih, imajo namreč večjo antioksidativno moč kot npr. askorbat (Saint-Cricq de Gaulejac, 1999). Poleg tega so raziskave na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani pokazale večjo antioksidativno moč IAA v primerjavi s PYC (Mravlje, 2008).

Fluorescenco Dsc2-GFP v celicah MDc-2 smo v 10-minutnih intervalih merili 40 minut. Ugotovili smo, da fluorescenca Dsc2-GFP v celicah MDc-2 ob osvetljevanju z modro svetlobo blede, kljub dodatku antioksidantov iz omenjenih izvlečkov v HM. Po 10 minutah je fluorescenca Dsc2-GFP celic v HM (K) padla na 45 % začetne intenzitete, medtem ko je bil padec fluorescence v primeru dodanih izvlečkov manjši, in sicer na 54 % – 59 % začetne intenzitete fluorescence. Padec intenzitete je bil sicer manjši kot pri poskusih, ki so jih opravili Alnuami in sod. (2008), vendar je bila fluorescenca Dsc2-GFP tudi v našem primeru po 20 minutah od začetka osvetljevanja celic komaj še opazna (sliki 10 in 12).

Primerjava smernih koeficientov, ki nakazujejo hitrost bledenja fluorescence Dsc2-GFP v celicah MDc-2, je pokazala, da dodatek IAA ali PYC v HM ne vpliva na bledenje fluorescence (sliki 11 in 13).

Pokazali smo, da dodatek izvlečkov IAA ali PYC v hranilni medij ne upočasni hitrosti bledenja fluorescence Dsc2-GFP.

5.3 IAA ZNAČILNO POVEČA METABOLNO AKTIVNOST CELIC MDc-2, PYC PA NE

V metabolno aktivnih celicah se tetrazolijevo barvilo z encimi dihalne verige v mitohondrijih spreminja v topen formazan. Količina nastalega formazana se odraži v absorbanci, merjeni pri valovni dolžini 490 nm. Absorbanca je sorazmerna s številom živih celic v kulturi (Promega, 2012), kar se ujema z analizo viabilnosti celic MDc-2 s tripanskim modrilom, ki smo jo opravili v magistrski nalogi. Tetrazolijevo barvilo lahko poleg encimov dihalne verige v formazan pretvarjajo še drugi celični encimi, kot so dehidrogenaze, oksidaze in peroksidaze. Test MTS tako ni le pokazatelj živosti celic in aktivnosti mitohondrijev, ampak celotne metabolne aktivnosti celice (Berridge, 2005).

Ugotovili smo, da je metabolna aktivnost celic, ki so bile kratkotrajno ali dolgotrajno izpostavljene HM z IAA, statistično značilno večja od metabolne aktivnosti celic v HM (K) (slika 15). Metabolna aktivnost celic, ki so bile v HM s PYC, pa je podobna metabolni aktivnosti celic v HM (K) ne glede na čas izpostavljenosti izvlečku.

Povečano metabolno aktivnost celic raziskovalci razlagajo kot posledico povečane tvorbe ROS in zato tudi povečano aktivacijo obrambnih mehanizmov, ki skušajo povrniti ravnovesje radikalov v celici (Kocbek in sod., 2010). Meritve metabolne aktivnosti celic MDc-2, predvsem tistih v HM z IAA, nakazujejo na morebitno povečano aktivnost obrambnih mehanizmov za zmanjšanje ROS v celicah. Meritve metabolne aktivnosti celic MDc-2 smo dopolnili z meritvami količine ROS v celicah MDc-2, ki so pokazale zmanjšano prisotnost ROS v celicah MDc-2.

5.4 IAA IN PYC ZMANJŠUJETA KOLIČINO ROS V CELICAH MDc-2

Dodatek antioksidantov v HM prepreči nastajanje ROS in RNS in zmanjša njihovo škodljivo delovanje v celicah. Virgili in sod. (1998) so pokazali, da inkubacija mišjih makrofagov celične linije RAW 246.7 s PYC učinkovito zmanjša nastajanje ROS in RNS v teh celicah.

Tudi mi smo želeli preveriti, kako učinkovito v celicah MDc-2 odstranjujejo ROS antioksidanti v izvlečkih IAA in PYC. Uporabili smo barvilo karboksi- H_2DCFDA , ki vstopi v celice in se ob prisotnosti ROS oksidira ter začne fluorescirati. Rezultati so pokazali, da tako 24-urna kot tudi enotedenska inkubacija celic s HM s posameznim izvlečkom zmanjšata količino ROS v celicah. Zmanjšanje količine ROS v celicah je bilo ne glede na vrsto izvlečka in ne glede na čas izpostavljenosti izvlečku podobno učinkovito (slika 16). Sklepamo, da izvlečka podobno dobro odstranjujeta ROS iz celic, in da imata podobno antioksidativno moč.

5.5 PYC POVEČA ŠTEVILO AVTOFAGNIH VAKUOL V CELICAH MDc-2

Podobnost celic MDc-2, ki so rasle v HM z IAA, s celicami, ki so rasle v HM (K), smo pokazali tudi s presevno elektronsko mikroskopijo (slika 17). V obeh hranilnih medijih so imele celice normalno ultrastrukturo in ni bilo opaznih poškodb membran. Mitohondriji so bili normalni, v citoplazmi so bile videti številne skladovnice Golgijevega aparata. Celice so rastle v enem skladu, ponekod tudi v večceličnih skupkih, ki so se sčasoma odluščili. Ultrastruktura večine celic MDc-2, ki so rasle v HM s PYC je bila normalna, le v nekaterih celicah so bile prisotne velike avtofagne vakuole, v katerih so bili prisotni mitohondriji. Nekaj celic je bilo nekrotičnih. Nekrotične celice, ki smo jih opazili v celicah v HM s PYC, bi lahko tako bile posledica prisotnosti ROS (Novo in sod., 2008) ali pa porušjenja membranskega potenciala mitohondrijev (Kocbek in sod., 2010).

Ugotovili smo, da IAA ne spremeni ultrastrukture celic MDc-2, PYC pa poveča število avtofagnih vakuol v celicah.

6 SKLEPI

- Dodatek IAA v hranilni medij zviša viabilnost celic MDc-2 ne glede na čas izpostavitve izvlečku in ne glede na dodatno osvetljevanje celic z modro svetlobo, dodatek PYC v HM pa viabilnost celic v vseh primerih zmanjša.
- Obnovitvena sposobnost celic v HM z IAA je v prvih 24 urah po poškodbi boljša, v HM s PYC pa v prvih štirih dneh slabša kot pri kontroli v HM (K).
- Izpostavljenost posameznemu izvlečku ne upočasni bledenja fluorescence Dsc2-GFP, ki ga stabilno izražajo celice MDc-2.
- Metabolna aktivnost celic v HM z IAA je glede na celice v HM s PYC ali v HM (K) povečana.
- Zmanjšanje količine ROS je v celicah MDc-2 ne glede na vrsto izvlečka in čas izpostavljenosti izvlečku podobno učinkovito. Lahko rečemo, da imata izvlečka podobno antioksidativno moč.
- V vseh treh hranilnih medijih imajo celice MDc-2 dobro ohranjeno ultrastrukturo. Za razliko od celic MDc-2 v HM (K) ali v HM z IAA, je v citoplazmi celic MDc-2 v HM s PYC več avtofagnih vakuol.

7 POVZETEK

Kljub 20-letnim raziskavam znanstveniki še vedno niso našli popolnega fluorescenčnega proteina (FP). Poleg barve je pri ocenjevanju primernosti FP za poskus pomembna še stabilnost proteina pri spremembah pH in temperaturi ter majhno bledenje fluorescence proteina. Ena možnost, ki omogoča daljše opazovanje fluorescentno označenih struktur, je torej z izbiro FP z majhnim bledenjem fluorescence. Druga možnost za podaljševanje fluorescence je z zmanjševanjem koncentracije prostih radikalov, ki nastajajo pri osvetljevanju FP, in sicer z dodajanjem antioksidantov v medij, v katerem so opazovane celice. To je bil tudi glavni namen magistrskega dela. Torej preveriti, kako izbrana izvlečka iz lubja bele jelke (IAA) in obmorskega bora (PYC) vplivata na prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v celicah in posledično vplivata na fluorescenco v živih celicah ob osvetljevanju z modro svetlobo. Z dodatkom posameznega izvlečka v hranilni medij (HM) nismo upočasnili hitrosti bledenja Dsc2-GFP.

V magistrski nalogi smo proučili odziv celic na različne koncentracije izvlečkov v HM od dneva nasaditve dalje. Ugotovili smo, da prisotnost IAA ali PYC v HM poveča hitrost razraščanja celic v prvih dneh po nasaditvi. Vlogo IAA in PYC pri spodbujanju obnove tkiva po poškodbi smo proučili še s testom preraščanja poškodbe *in vitro*. Rezultati so pokazali, da je obnovitvena sposobnost celic v HM z IAA v prvih 24 urah boljša v primerjavi s kontrolo. Ugotovili smo tudi, da PYC v prvih dneh po poškodbi zavira preraščanje poškodovanega področja.

Dodatno smo učinke izvlečkov ovrednotili z analizo viabilnosti celic po štiriindvajseturni, enotedenski in dvomesečni izpostavitvi posameznemu izvlečku ter z analizo viabilnosti celic po dodatku posameznega izvlečka in 40-minutnim osvetljevanjem z modro svetlobo. Ugotovili smo, da dodatek IAA v HM poveča viabilnost celic MDc-2 ne glede na čas izpostavljenosti izvlečku, dodatek PYC v HM pa viabilnost zmanjša. Dodatek IAA tudi poveča viabilnost osvetljevanih celic v primerjavi s PYC.

Proučili smo tudi metabolno aktivnost celic po kratkotrajni (24 ur) in dolgotrajni (1 teden) izpostavitvi izvlečkoma. Uporabili smo metodo izmere metabolne aktivnosti celic, t. i. test MTS. Ugotovili smo, da je metabolna aktivnost celic MDc-2 v HM z IAA višja, metabolna aktivnost celic v HM s PYC pa podobna s celicami v HM (K) ne glede na čas izpostavljenosti izbranemu izvlečku. Te ugotovitve nakazujejo na povečano aktivnost obrambnih mehanizmov za zmanjšanje ROS v celicah MDc-2, še posebno tistih, ki so bile v HM z IAA.

Antioksidativno moč antioksidantov v izvlečkih smo ovrednotili s prisotnostjo ROS v celicah po kratkotrajni (24 ur) in dolgotrajni (1 teden) izpostavitvi izvlečkoma. Za ovrednotenje smo uporabili fluorescenčno barvilo karboksi- H_2DCFDA , ki fluorescira ob prisotnosti ROS v celicah. Fluorescenco smo izmerili s čitalcem mikrotiternih plošč. Tako PYC kot IAA uspešno zmanjšata količino ROS v celicah, zaradi česar menimo, da snovi v obeh izvlečkih delujejo antioksidativno.

Na koncu smo s presevnim elektronskim mikroskopom proučili še ultrastrukturo celic MDc-2. Dodatek IAA ne spremeni ultrastrukture celic MDc-2, medtem ko PYC poveča število avtofagnih vakuol v celicah.

Z magistrskim delom smo dopolnili pretekle študije o delovanju IAA in PYC, saj IAA in PYC do sedaj še nista bila preizkušena na ledvičnih epitelijskih celicah MDc-2. Dokazali smo, da za razliko od PYC, IAA zviša viabilnost celic MDc-2 ne glede na čas izpostavitve. Obnovitvena sposobnost celic MDc-2 se v prvih 24 urah po ranitvi ob dodatku IAA izboljša, medtem ko PYC obnovitveno sposobnost celic v prvih dneh po poškodbi zavre. Dokazali smo tudi, da izvlečka ne upočasni hitrosti bledenja Dsc2-GFP. Po drugi strani pa izbrana izvlečka zmanjšata količino ROS v celicah MDc-2.

8 VIRI

- Alnuami A. A., Zeedi B., Quadri S. M., Ashraf S. S. 2008. Oxyradical-induced GFP damage and loss of fluorescence. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43: 182-186
- Apak R. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with CUPRAC assay. *Molecules*, 12: 1496-1547
- Berčič T. 2012. Učinek lovilcev prostih radikalov v fluorescenčni mikroskopiji celic transfeciranih z zelenim fluorescenčnim proteinom. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Oddelek za biokemijo: 78 str.
- Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. 2005 Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11: 127-152
- Binder M. D., Hirokawa N., Windhorst U. 2009. *Encyclopedia of Neuroscience*. Binder M. D., Hirokawa N., Windhorst U. (eds.). Heidelberg, Springer: 4398 str.
- Blazso G, Gabor M, Schonlau F, Rohdewald P. 2004. Pycnogenol accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytotherapy Research*, 18: 579-581
- Bruneton J. 1999. *Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants*. 2. ed. Bruneton J. (eds.). Paris, Technique & Documentation Lavoisier: 1119 str.
- Brus R. 2004. *Drevesne vrste na Slovenskem*. 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 399 str.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802–805
- Curtin J., Donovan M., Cotter T. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, 265, 1-2: 49-72
- Ćajič A. 2011. Karakterizacija in poskus identifikacije komponent antioksidativnega ekstrakta lubja navadne jelke (*Abies alba*). Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo: 70 str.

- Dailey M. E., Manders E., Soll D.R., Terasaki M. 2006. Confocal Microscopy of living cells. V: Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3. ed. Pawley J.(ed.). New York, Springer: 381-403
- Devasagayam T. P. A., Tilak J. C., Bloor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S., Lele R. D. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. Journal of Association of Physicians of India, 52: 794-804
- Diaspro A., Chirico G., Usai C., Ramoino P., Dobrucki J. 2006. Confocal Microscopy of living cells. V: Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3. ed. Pawley J.(ed.). New York, Springer: 690-702
- Elumalai P., Atkins P., de Paula J. 2002. Atkins' physical chemistry. 8. ed. De Paula J. (ed.). Oxford, Oxford University Press: 1000 str.
- Fraga C. G. 2007. Plant Polyphenols: How to Translate their in vitro Antioxidant Actions to in vivo Conditions. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 59, 4-5: 308-315
- Grohar T. 2012. Separacija in identifikacija flavonoidov v polietilenglikolnem izvlečku lubja navadne jelke (*Abies alba*). Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo: 124 str.
- Guochang Z. 1993. Ultraviolet radiation-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts and antioxidant protection. Biological research reports from University of Jyväskylä, 33: 1-86
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1999. Free radicals in Biology and Medicine. 3. ed. Halliwell B., Gutteridge J. M. (ed.). Oxford, Oxford University Press: 963 str.
- Heim R., Prasher D. C., Tsien R. Y. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91: 12501-12504

- Henderson J. N., Al HW, Campbell R. E., Remington S. J. 2007. Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 16: 6672-6677
- Herman B., Parry-Hill M., Johnson I. D., Davidson M. W. 2006. Fluorescence Microscopy Interactive Java Tutorials: Photobleaching. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/fluorescence/photobleaching/> (15. jan. 2014)
- Hibbs A. R. 2004. *Confocal Microscopy for Biologists*. 1. ed. Hibbs A. R. (ed.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 467 str.
- Jeong M J, Jeong S J, Lee S H, Kim Y S, Choi B D, Kim S H, Go A, Kim S E, Kang S S, Moon C J, Kim J C, Kim S H, Bae C S. 2013. Effect of Pycnogenol on Skin Wound Healing. *Applied Microscopy*, 43: 133-139
- Johnson I. in Spence T. Z. M. 2010. *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 11. ed. Johnson I., Spence M. T. Z. (ed.). Eugene, Life Technologies Corporation: 1060 str.
- Kerr J. F., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239
- Kim Y.J., Kim Y. A., Yokozawa T. 2011. Pycnogenol modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in high glucose-treated renal tubular cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2196-2201
- Kocbek P., Teskač K., Kreft M.E., Kristl J. 2010. Toxicological Aspects of Long-Term Treatment of Keratinocytes with ZnO and TiO₂ Nanoparticles. *Small Journal*, 6, 17: 1908-1917
- Kreft S. in Pečar S. 1998. Vloga radikalov pri obolenjih. *Farmacevtski vestnik*, 49: 469-481
- Kremers G.-J., Gilbert S. G., Cranfill P. J., Davidson M. W., Piston D. W. 2011. Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124: 157-160

- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*, 60: 619-642
- Ku CS, Jang JP, Mun SP. 2007. Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *Journal of Wood Science*, 53: 524-528
- Lippincott-Schwartz J., Altan-Bonnet N., Patterson G. H. 2003. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature Cell biology*, 5: S7-S14
- Manček B, Pečar S. 2001. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farmacevtski Vestnik*, 52: 133-144.
- Mikelj A. 2012. Vpliv izvlečka iz lubja bele jelke (*Abies alba* Mill.) na funkcionalne in morfološke spremembe arterij pri budrah krmljenih z aterogeno krmo. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo: 112 str.
- Mravlje V. 2008. Analiza antioksidativnih spojin v skorji navadne smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) in skorji navadne jelke (*Abies alba* Mill.). Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo: 114 str.
- Novo P. in Parola M. 2008. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 1: 5
- Packer L, Rimbach G, Virgili F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine*; 27: 704-724
- Perdih A, Pečar S. 2006. Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. *Farmacevtski Vestnik*, 57: 24-29.
- Phillips, G. N. J. 1997. Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 821-827

Promega protokol. 2012. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay
Technical Bulletin. Madison, Promega Corporation: 12 str.

<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/> (5. sep. 2013)

Rushforth K. 1986. Bäume. Über 350 Arten. 2. Aufl. Rushforth K. (Hrsg.). Bern, Hallwag: 192 str.

Saint-Cricq de Gaulejac N., Provost C., Vivas N. 1999. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 425-431

Sime S., Reeve V.E. 2004. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. Photochemistry & Photobiology, 79, 2: 193-198

Singer A. J. in Clark R. A. 1999. Cutaneous wound healing. The New England Journal of Medicine, 341: 738-746

Stepanenko O. V., Verkhusha V. V., Kuznetsova I. V., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2008. Fluorescent Proteins as Biomarkers and Biosensors: Throwing Color Lights on Molecular and Cellular Processes. Current Protein and Peptide Science, 9, 4: 338-369

Tsien R. Y., Ernst L., Waggoner A. 2006. Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry. V: Handbook of Biological Confocal Microscopy. Pawley J. B. (eds.). New York, Springer: 338-352

Turk E. 2012. Razvoj spektrofotometrične izvedbe Krl Fischerjeve metode za ugotavljanje vsebnosti vode in optimizacija topil za ekstrakcijo polifenolov iz lubja navadne jelke (*Abies alba* Mill.). Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo: 114 str.

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 & Cell Biology, 39: 44-84

Van Roessel P. in Brand A. H. 2002. Imaging into the future:visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nature of Cell Biology*. 4, 1: E15-E20

Virgili F., Kobuchi H., Packer L. 1998. Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol): Scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in active murine RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 7-8: 1120-1129

Walker-Daniels J. 2012. Live Cell Imaging Methods Review. Labome: The world of laboratories.

<http://www.labome.com/method/Live-Cell-Imaging-Methods-Review.html> (28. avg. 2012)

Zhang J., Campbell R. E., Ting A. Y., Tsien, R. Y. 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3: 906-918

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mateji Erdani Kreft, ki je ob svojem delu vedno našla dovolj časa za pomoč in koristne nasvete pri delu v laboratoriju in pri izdelavi magistrske naloge. Še posebej pa se zahvaljujem za vse spodbudne besede, prijaznost in potrpežljivost v lepih in tudi manj lepih trenutkih.

Za pregled magistrskega dela se zahvaljujem prof. dr. Mateji Erdani Kreft, prof. dr. Petru Veraniču in doc. dr. Alešu Kladniku.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim na Inštitutu za biologijo celice: prof. dr. Petru Veraniču, izr. prof. dr. Roku Romihu, doc. dr. Andreji Erman, doc. dr. Daši Zupančič, asist. dr. Samu Hudoklinu, asist. dr. Nataši Resnik, asist. dr. Tanji Višnjar, mladi raziskovalki Urški Dragin Jerman, Sabini Železnik, Nadi Dubarič Pavlica, Lindi Štrus in Marini Jeriha.

Za uvajanje v delo v laboratoriju, praktične nasvete, za prijetno vzdušje in zabavne trenutke, ki smo jih skupaj preživele v laboratoriju, predvsem pa za spodbudne besede, in nesebično pomoč bi se še posebej zahvalila Sanji Čabraja in Maji Četojevič.

Iskrena zahvala tudi prof. dr. Samotu Kreftu s Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani ter doc. dr. Mojci Pavlin, Jasni Lojk in Maruši Rajh s Fakultete za elektrotehniko, Univerze v Ljubljani.

Na koncu bi se zahvalila še Miji, družini in prijateljem za podporo v času študija.

PRILOGE

Priloga A

Meritev osmolarnosti hranilnih medijev z dodanim IAA ali PYC

Osmolarnost HM z IAA je pri standardu 300 mOsmol/kg 331 mOsmol/kg, pri standardu 856 mOsmol/kg pa 338 mOsmol/kg.

Osmolarnost HM s PYC je pri standardu 300 mOsmol/kg 320 mOsmol/kg, pri standardu 856 mOsmol/kg pa 321 mOsmol/kg.

Priloga B

Meritev pH medijev

Hranilni medij	pH	T medija [°C]	pH	T medija [°C]
HM z IAA	7,75	25,0	8,01	33,9
HM s PYC	7,79	25,0	8,02	34,1
HM (K)	7,51	25,0	8,06	32,9

Priloga C

Odstotek pokritosti površine vidnega polja v različnih HM

Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

Celice v HM brez dodanih izvlečkov (HM (K))

	1. dan	2. dan	3. dan	5. dan	2 meseca
M [%]	48,10	57,18	88,63	100	99,24
N	20	20	20	20	20
SD	20,77	10,68	6,65	0	0,11
SE	14,68	7,55	4,70	0	0,08

Celice v HM z IAA

	1. dan	2. dan	3. dan	5. dan	2 meseca
M [%]	46,48	52,28	94,98	100	99,66
N	20	20	20	20	20
SD	16,05	10,75	0,16	0	0,36
SE	11,35	7,60	0,11	0	0,26

Nadaljevanje: Priloga C: Odstotek pokritosti površine vidnega polja v različnih HM.
 Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD)
 in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

Celice v HM s PYC

	1. dan	2. dan	3. dan	5. dan	2 meseca
M [%]	44,51	45,96	97,79	100	99,54
N	20	20	20	20	20
SD	19,13	17,90	1,86	0	0,66
SE	13,52	12,66	1,31	0	0,47

Studentovi t-testi

	1. dan	2. dan	3. dan
T-test med HM (K) in HM z IAA	0,938	0,692	0,406
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,874	0,526	0,201
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,921	0,710	0,166

	4. dan	5. dan	2 meseca
T-test med HM (K) in HM z IAA	0,000	0,000	0,423
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,000	0,000	0,423
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,000	0,000	0,000

Priloga D

Odstotek pokritosti površine celic v različnih HM glede na dan ranitve

Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

Celice v HM brez dodanih izvlečkov (HM (K))

	dan ranitve	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan
M [%]	0	15,50	33,53	32,33	94,81	100
N	12	12	12	12	12	12
SD	0	9,89	16,01	25,95	13,17	9,97
SE	0	2,47	4,00	7,82	4,39	4,45

Celice v HM z IAA

	dan ranitve	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan
M [%]	0	24,23	43,81	54,81	94,98	100
N	12	12	12	12	12	12
SD	0	14,73	23,46	21,47	12,91	13,06
SE	0	3,01	4,79	5,74	3,73	4,13

Nadaljevanje: Priloga D: Odstotek pokritosti površine celic v različnih HM glede na dan ranitve. Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

Celice v HM s PYC

	dan ranitve	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan
M [%]	0	9,42	19,04	30,41	61,51	100
N	12	12	12	12	12	12
SD	0	8,46	10,94	12,67	24,89	9,67
SE	0	1,47	1,90	2,76	5,71	2,79

Studentovi t-testi

	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan
T-test med HM (K) in HM z IAA	0,045	0,130	0,044	0,977	0,999
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,030	0,001	0,002	0,001	0,998
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,000	0,000	0,000	0,000	0,999

Priloga E

Izmerjene intenzitete fluorescence Dsc2-GFP v celicah MDc-2 po različnih časih osvetljevanja

Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

a) Celice izpostavljene mediju tik pred osvetljevanjem

Celice v HM brez dodanih izvlečkov (HM (K))

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
Meritev 1	45,05	18,27	13,70	11,80	11,32
Meritev 2	33,19	18,93	14,87	13,33	12,22
Meritev 3	36,37	16,80	12,60	11,41	10,83
Meritev 4	30,76	16,09	13,23	11,60	10,94
Meritev 5	45,05	14,67	9,84	8,02	8,15
M [a.u.]	38,08	16,95	12,84	11,23	10,69
N	5	5	5	5	5
SD	6,66	1,71	1,88	1,95	1,52
SE	2,98	0,76	0,84	0,87	0,68

Celice v HM z IAA

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
Meritev 1	34,86	17,49	14,61	11,65	10,31
Meritev 2	34,50	18,51	13,05	11,24	11,00
Meritev 3	30,71	17,67	12,52	11,23	9,64
Meritev 4	41,54	21,07	13,06	12,19	10,53
Meritev 5	26,14	15,79	9,69	8,69	7,17
M [a.u.]	33,55	18,10	12,58	11,00	9,73
N	5	5	5	5	5
SD	5,69	1,93	1,80	1,35	1,51
SE	2,54	0,86	0,80	0,60	0,67

Nadaljevanje: Priloga E: Izmerjene intenzitete fluorescence Dsc2-GFP pri celicah MDc-2 po različnih časih osvetljevanja.

Celice v HM s PYC

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
Meritev 1	34,34	18,57	15,21	12,62	11,48
Meritev 2	37,48	20,14	15,99	13,82	12,29
Meritev 3	38,82	22,57	15,45	12,30	12,02
Meritev 4	32,75	20,12	14,99	12,80	12,18
Meritev 5	28,92	17,24	10,96	9,29	7,89
M [a.u.]	34,46	19,73	15,52	12,16	11,17
N	5	5	5	5	5
SD	3,93	2,00	2,03	1,70	1,86
SE	1,76	0,89	0,91	0,76	0,83

Studentovi t-testi

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
T-test med HM (K) in HM z IAA	0,281	0,346	0,829	0,831	0,343
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,326	0,046	0,211	0,445	0,668
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,775	0,228	0,148	0,266	0,214

b) Celice izpostavljene mediju 1 teden pred osvetljevanjem

Celice v HM brez dodanih izvlečkov (HM (K))

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
Meritev 1	45,05	18,27	13,70	11,80	11,32
Meritev 2	33,19	18,93	14,87	13,33	12,22
Meritev 3	36,37	16,80	12,60	11,41	10,83
Meritev 4	30,76	16,09	13,23	11,60	10,94
Meritev 5	45,05	14,67	9,84	8,02	8,15
M [a.u.]	38,08	16,95	12,84	11,23	10,69
N	5	5	5	5	5
SD	6,66	1,71	1,88	1,95	1,52
SE	2,98	0,76	0,84	0,87	0,68

Nadaljevanje: Priloga E: Izmerjene intenzitete fluorescence Dsc2-GFP v celicah MDc-2 po različnih časih osvetljevanja.

Celice v HM z IAA

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
Meritev 1	24,56	14,49	11,86	10,41	9,76
Meritev 2	29,00	16,41	11,69	10,79	9,67
Meritev 3	30,22	16,67	12,51	11,02	10,60
Meritev 4	31,04	17,59	13,95	12,53	11,51
M [a.u.]	28,70	16,29	12,5	11,19	10,38
N	4	4	4	4	4
SD	2,89	1,30	1,03	0,93	0,86
SE	1,44	0,65	0,51	0,43	0,43

Celice v HM s PYC

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
Meritev 1	26,88	17,38	13,96	12,24	12,21
Meritev 2	29,66	17,67	14,58	13,08	12,28
Meritev 3	42,76	24,86	16,55	14,21	13,18
Meritev 4	34,02	19,28	16,01	13,79	12,94
M [a.u.]	33,33	19,80	15,27	13,33	12,65
N	4	4	4	4	4
SD	6,94	3,48	1,21	0,86	0,48
SE	3,47	1,74	0,60	0,43	0,24

Studentovi t-testi

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
T-test med HM (K) in HM z IAA	0,036	0,544	0,755	0,968	0,732
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,331	0,149	0,061	0,088	0,044
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,264	0,108	0,013	0,015	0,004

Priloga F

Viabilnost celic MDc-2 v različnih HM

Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

a) Celice 24 ur v HM (K) ali v HM z IAA ali PYC, brez osvetljevanja

	HM (K)	HM z IAA	HM s PYC
	94,29	95,65	92,31
	90,72	95,92	96,77
	92,59	97,94	95,54
	96,06	96,47	92,72
M [%]	93,42	96,50	94,34
N	4	4	4
SD	2,29	1,02	2,17
SE	1,14	0,51	1,08

Studentovi t-testi

T-test med HM (K) in HM z IAA	0,049
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,581
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,121

Nadaljevanje: Priloga F: Viabilnost celic MDc-2 v različnih HM. Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

b) Celice 1 teden v HM (K) ali v HM z IAA ali PYC, brez osvetljevanja

	HM (K)	HM z IAA	HM s PYC
	97,71	98,95	96,77
	99,39	98,41	98,62
	98,41	99,04	97,92
M [%]	98,50	98,80	97,77
N	3	3	3
SD	0,84	0,34	0,93
SE	0,48	0,20	0,54

Studentovi t-testi

T-test med HM (K) in HM z IAA	0,602
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,370
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,147

Nadaljevanje: Priloga F: Viabilnost celic MDc-2 v različnih HM. Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

c) Celice 1 teden v HM (K) ali v HM z IAA ali PYC, po 40 minutah osvetljevanja

	HM (K)	HM z IAA	HM s PYC
	98,71	99,16	97,63
	99,07	99,44	95,62
	99,38	98,8	97,38
M [%]	99,05	99,13	96,88
N	3	3	3
SD	0,34	0,32	1,10
SE	0,20	0,18	0,64

Studentovi t-testi

T-test med HM (K) in HM z IAA	0,780
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,030
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,027

Nadaljevanje: Priloga F: Viabilnost celic MDc-2 v različnih HM. Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

d) Celice 2 meseca v HM (K) ali v HM z IAA ali PYC, brez osvetljevanja

	HM (K)	HM z IAA	HM s PYC
	98,4	98,3	93,9
	98,6	99,1	96,2
	97,5	97,2	94,4
M [%]	98,17	98,20	94,83
N	3	3	3
SD	0,59	0,95	1,21
SE	0,34	0,55	0,70

Studentovi t-testi

T-test med HM (K) in HM z IAA	0,961
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,012
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,019

Priloga G

Meritve absorbance po izvedbi testa MTS v celicah MDc-2, ki so bile posameznemu izvlečku izpostavljene 24 ur ali 1 teden, po odšteti absorbanci blank kontrole (absorbanca samega HM, brez celic)

Absorbance so podane v arbitrarnih enotah [a.u.].

24 ur			1 teden		
HM (K)	HM z IAA	HM s PYC	HM (K)	HM z IAA	HM s PYC
0,278	0,3326	0,2919	0,3507	0,5869	0,3175
0,301	0,368	0,2776	0,3757	0,5531	0,3451
0,286	0,3463	0,3337	0,4455	0,4582	0,3235
0,289	0,3545	0,2827	0,3604	0,3579	0,3156
0,2582	0,2726	0,2733	0,2589	0,2726	0,3017
0,2448	0,3075	0,256	0,2885	0,3084	0,2768
0,2826	0,3003	0,2961	0,2864	0,3719	0,3099
0,2613	0,4245	0,3166	0,2865	0,2969	0,3042
0,3007	0,2697	0,2964	0,2551	0,3914	0,3244
0,2899	0,3467	0,2832	0,2921	0,3065	0,2877
0,3477	0,3303	0,3071	0,3052	0,3013	0,3362
0,2875	0,4528	0,2987	0,317	0,3554	0,3368

Priloga H

Relativna metabolna aktivnost celic MDc-2 v HM s posameznim izvlečkom ali HM brez izvlečkov (HM (K))

Preračun je narejen glede na podatke iz Priloge G. Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

	24 ur			1 teden		
	HM (K)	HM z IAA	HM s PYC	HM (K)	HM z IAA	HM s PYC
	1,000	1,196	1,050	1,000	1,822	1,054
	1,000	1,223	0,922	1,000	1,610	1,056
	1,000	1,210	1,166	1,000	1,145	0,843
	1,000	1,227	0,979	1,000	1,146	1,028
	1,000	1,056	1,058	1,000	1,053	1,165
	1,000	1,256	1,046	1,000	1,069	0,959
	1,000	1,063	1,048	1,000	1,299	1,082
	1,000	1,625	1,212	1,000	1,036	1,062
	1,000	0,897	0,986	1,000	1,534	1,272
	1,000	1,196	0,977	1,000	1,049	0,985
	1,000	0,950	0,883	1,000	0,987	1,102
	1,000	1,575	1,039	1,000	1,121	1,062
M [%]	1,00	1,21	1,03	1,00	1,24	1,06
N	12	12	12	12	12	12
SD	0,00	0,22	0,09	0,00	0,27	0,11
SE	0,00	0,06	0,03	0,00	0,08	0,03

Studentovi t-testi

	24 ur	1 teden
T-test med HM (K) in HM z IAA	0,007	0,011
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,278	0,093
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,017	0,039

Priloga I

Relativna prisotnost ROS v celicah MDc-2 v HM s posameznim izvlečkom ali HM brez izvlečkov (HM (K))

V prvem stolpcu so podane relativne vrednosti prisotnosti reaktivnih kisikovih zvrsti po dodatku vodikovega peroksida H_2O_2 celicam tik pred poskusom (pozitivna kontrola). Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredina (SE).

			24 ur		1 teden	
	H_2O_2	HM (K)	HM z IAA	HM s PYC	HM z IAA	HM s PYC
	2,612	1,249	0,965	0,710	0,880	0,776
	1,722	1,164	0,975	0,748	0,823	0,852
	1,921	0,833	1,032	0,729	0,814	0,842
	2,271	0,842	1,098	0,710	1,107	0,890
	1,353	1,211	0,871	0,823	0,700	0,672
	2,205	0,767	1,240	0,965	0,880	0,994
M [%]	2,01	1,01	1,03	0,78	0,87	0,84
N	6	6	6	6	6	6
SD	0,45	0,22	0,13	0,10	0,13	0,11
SE	0,18	0,09	0,05	0,04	0,05	0,04

Studentovi t-testi

	24 ur	1 teden
T-test med HM (K) in HM z IAA	0,859	0,202
T-test med HM (K) in HM s PYC	0,041	0,113
T-test med HM z IAA in HM s PYC	0,004	0,680
T-test med HM (K) in H_2O_2	0,001	