

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Helena GRAŠIČ

**UČINKI PRIPRAVKOV IZ AMERIŠKEGA SLAMNIKA  
(*ECHINACEA PURPUREA*) NA PRODUKCIJO CITOKINOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF PURPLE CONEFLOWER (*ECHINACEA  
PURPUREA*) PREPARATIONS ON CYTOKINE PRODUCTION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Alojza Ihana, dr. med., za recenzenta pa prof. dr. Vladimira Kotnika, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Maček  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Alojz Ihan  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Vladimir Kotnik  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Helena Grašič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd  
DK UDK 557.27:615.37(043.2)=163.6  
KG *Echinacea purpurea*/citokini/interlevkin-8/tumorje nekrozirajoči faktor- $\alpha$ /interlevkin 1- $\beta$ /interlevkin-10/interlevkin-6/interlevkin-12p70/THP-1/PMA /pretočna citometrija/produkcija citokinov/  
KK  
AV GRAŠIČ, Helena  
SA IHAN, Alojz (mentor)/Vladimir Kotnik (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2008  
IN UČINKI PRIPRAVKOV IZ AMERIŠKEGA SLAMNIKA (*ECHINACEA PURPUREA*) NA PRODUKCIJO CITOKINOV  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 50 str., 12 pregl., 16 sl., 49 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V mnogih *in vitro* študijah je bilo ugotovljeno, da učinkovine ameriškega slamnika spodbujajo fagocitno aktivnost makrofagov, porast izločanja različnih citokinov iz njih in pospešujejo delovanje celic NK. Najpomembnejša izmed vrst ameriških slamnikov v medicini je škrlatni ameriški slamnik (*Echinacea purpurea*). V naši raziskavi smo naredili *in vitro* poizkus vpliva različnih standardnih pripravkov ameriškega slamnika (kaftarne kisline, cikorne kisline, ehinakoziida) in njihovih kombinacij na tvorbo citokinov pri celični liniji humane akutne monocitne levkemije (THP-1). Na enak način smo analizirali tudi vpliv ekstraktov vzgojenega škrlatnega ameriškega slamnika, ki so bili plod jesenske ali poletne žetve. Analiza supernatantov po stimulaciji celične linije THP-1 s pripravki ameriškega slamnika je pokazala vpliv na produkcijo IL-8 in TNF- $\alpha$ , ni pa bilo vpliva na produkcijo IL-1 $\beta$ , IL-6 in IL-10. Ekstrakt 1 (poletne žetve) je pri koncentraciji 200  $\mu$ g/ml statistično značilno povečal produkcijo TNF- $\alpha$  in IL-8 v primerjavi z negativno kontrolo (RPMI). Vsi ostali pripravki niso povečali produkcije citokinov IL-8 in TNF- $\alpha$ . Dokazali smo, da ekstrakti poletne žetve bolj stimulirajo produkcijo citokinov TNF- $\alpha$  in IL-8. Ehinakozyd je zmanjšal produkcijo IL-8, ni pa vplival na produkcijo TNF- $\alpha$ . Cikorna kislina in ekstrakt poletne žetve sta zmanjšala produkcijo vnetnih citokinov (TNF- $\alpha$  in IL-8) pod vplivom LPS.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 557.27:615.37(043.2)=163.6  
CX *Echinacea purpurea*/cytokines/interleukin-8/tumor necrosis factor- $\alpha$ /interleukin 1- $\beta$ /interleukin-10/interleukin-6/interleukin-12p70/THP-1/PMA /flow cytometry/cytokine production/  
CC  
AU GRAŠIČ, Helena  
AA IHAN, Alojz (supervisor)/Vladimir Kotnik (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biological Department  
PY 2008  
TI THE INFLUENCE OF PURPLE CONEFLOWER (*ECHINACEA PURPUREA*) PREPARATIONS ON CYTOKINE PRODUCTION  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 50 p., 12 tab., 16 fig., 49 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB According to many *in vitro* studies it has been demonstrated that *Echinacea* stimulate phagocytic activity of the macrophages, increase the production of cytokine by macrophages, and enhance the natural killer cells function. The most important species in medicine from the genus *Echinacea* is the purple coneflower (*Echinacea purpurea*). In our research we investigated *in vitro* the influence of different standards (caftaric acid, echinacoside and cichoric acid) and their combination, on cytokine production by a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). A similar such investigation was conducted with extracts prepared from summer or autumn harvested purple coneflower. Analysis of supernatants following stimulation of the THP-1 cell line with *Echinacea purpurea* revealed an influence only on IL-8 and TNF- $\alpha$  production, but no influence on IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 production. Extract 1 (summer harvest) at a concentration 200  $\mu\text{g/ml}$  significantly enhanced TNF- $\alpha$  and IL-8 production. All other preparations failed to enhance IL-8 or TNF- $\alpha$  production. Our research reveals that summer harvest extract significantly increases the enhancement of TNF- $\alpha$  and IL-8 production. Echinacoside decreased production of IL-8, but had no influence on TNF- $\alpha$  production. Cichoric acid at a 2,0  $\mu\text{g/ml}$  concentration, and summer harvest extract at a concentration 200  $\mu\text{g/ml}$ , decreased the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-8) under LPS stimulated conditions.

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN NALOGE .....	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1	SPLOŠNO O AMERIŠKEM SLAMNIKU .....	3
<b>2.1.1</b>	<b>Zgodovina uporabe ameriškega slamnika.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Sistematika .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Razširjenost rastline .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Opis rastline .....</b>	<b>5</b>
2.2	UČINKOVINE AMERIŠKEGA SLAMNIKA .....	6
<b>2.2.1</b>	<b>Vrste učinkovin .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Cikorna kislina.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Kaftarna kislina .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Ehinakozid.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Polisaharidi .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Alkilamidi .....</b>	<b>11</b>
2.3	CITOKINI .....	11
<b>2.3.1</b>	<b>Interlevkin (IL-1).....</b>	<b>11</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Interlevkin (IL -10).....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Interlevkin (IL-8).....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Interlevkin (IL-12).....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Interlevkin (IL-6).....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.6</b>	<b>Tumorje nekrozirajoči faktor <math>-\alpha</math> in <math>\beta</math> (TNF <math>-\alpha</math> in <math>\beta</math>) .....</b>	<b>13</b>
2.4	MAKROFAGI.....	13
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1	CELIČNA LINIJA HUMANE AKUTNE MONOCITNE LEVKEMIJE (THP-1) 15	
3.2	STIMULACIJA CELIC THP-1 S PMA (FORBOL ESTER) .....	15
3.3	GOJENJE CELIČNE LINIJE THP-1 .....	16
3.4	PRIPRAVA UČINKOVIN ŠKRLATNEGA AMERIŠKEGA SLAMNIKA.....	16
<b>3.4.1</b>	<b>Priprava standardnih učinkovin .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Priprava ekstraktov.....</b>	<b>16</b>
3.5	PRIPRAVA KONTROL .....	17
3.6	IZVEDBA POSKUSA.....	17
3.7	MERJENJE CITOKINOV .....	19
<b>3.7.1</b>	<b>Oprema, reagenti .....</b>	<b>19</b>
3.8	IZVEDBA TESTA .....	20
3.9	ANALIZA CITOKINOV S PRETOČNIM CITOMETROM.....	20
3.10	STATISTIČNA OBDELAVA.....	23
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>24</b>
4.1	UČINKI PRIPRAVKOV NA PRODUKCIJO TNF- $\alpha$ .....	25
<b>4.1.1</b>	<b>Primerjava tvorbe TNF-<math>\alpha</math> med koncentracijama A in B.....</b>	<b>29</b>

4.2	UČINKI PRIPRAVKOV NA PRODUKCIJO IL-8.....	30
<b>4.2.1</b>	<b>Primerjava produkcije IL-8 med koncentracijama A in B .....</b>	<b>34</b>
4.3	UČINKI PRIPRAVKOV NA PRODUKCIJO IL-1, IL-6, IL-10 IN IL-12P70 .....	35
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>36</b>
5.1	RAZPRAVA.....	36
<b>5.1.1</b>	<b>Uvod .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Analiza spodbujanja IL-1<math>\beta</math>, IL-10, IL-6 in IL-12.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Analiza spodbujanja TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Analiza spodbujanja IL-8 .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1.5</b>	<b>Zaključek.....</b>	<b>41</b>
5.2	SKLEPI.....	41
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>45</b>
	<b>ZAHVALA .....</b>	<b>50</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Shema vzorcev.....	18
Preglednica 2: Specifičnost posameznih polietilenskih delcev .....	19
Preglednica 3: Produkcija TNF- $\alpha$ (v pg/ml), ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A (glej metode). Prikazane so povprečne vrednosti produkcije TNF- $\alpha$ s standardnimi odkloni (n = 3). .....	25
Preglednica 4: Statistično značilne razlike produkcije TNF- $\alpha$ (pg/ml) med posameznimi vzorci, ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A..	26
Preglednica 5: Produkcija TNF- $\alpha$ (v pg/ml), ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B (glej metode). Prikazane so povprečne vrednosti produkcije TNF- $\alpha$ s standardnimi odkloni (n = 3). .....	27
Preglednica 6: Statistično značilne razlike produkcije TNF- $\alpha$ (pg/ml) med posameznimi vzorci, ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B..	28
Preglednica 7: Statistično značilne razlike produkcije TNF- $\alpha$ (pg/ml) med koncentracijama A in B.....	29
Preglednica 8: Produkcija IL-8 (v pg/ml), ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A (glej metode). Prikazane so povprečne vrednosti produkcije IL-8 s standardnimi odkloni (n = 3).....	30
Preglednica 9: Statistično značilne razlike tvorbe IL-8 (pg/ml) med posameznimi vzorci, ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A.....	31
Preglednica 10: Produkcija IL-8 (v pg/ml), ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B (glej metode). Prikazane so povprečne vrednosti IL-8 (pg/ml) s standardnimi odkloni (n = 3).....	32
Preglednica 11: Statistično značilne razlike tvorbe IL-8 (pg/ml) med posameznimi vzorci, ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B.....	33
Preglednica 12: Statistično značilne razlike produkcije IL-8 (pg/ml) med koncentracijama A in B.....	34

## KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Echinacea purpurea</i> (škrlatni ameriški slamnik).....	3
Slika 2: Razširjenost škrlatnega ameriškega slamnika (Natural resources conservation service, 2007).....	5
Slika 3: <i>Echinacea purpurea</i> (škrlatni ameriški slamnik).....	5
Slika 4: Kemijska zgradba cikorne kisline (Letchamo W. in sod., 1999).....	8
Slika 5: Kemijska zgradba kaftarne kisline (Dalton pharma services, 2008).....	9
Slika 6: Kemijska zgradba ehinakozida (Letchamo W. in sod., 1999).....	9
Slika 7: Monocit (Goldsby R.A. in sod., 2000).....	14
Slika 8: Makrofag (Goldsby R.A. in sod., 2000).....	14
Slika 9: Celica humane akutne monocitne levkemije THP-1 (Tsuchiya S. in sod., 1980)..	15
Slika 10: Shematični prikaz pretočnega citometra FACS (Ihan A., 1999).....	21
Slika 11: Točkasti diagram fluorescence posameznih citokinov. ....	22
Slika 12: Primer umeritvene krivulje za TNF- $\alpha$ .....	23
Slika 13: Povprečna produkcija TNF- $\alpha$ , ki jo izzovejo različni pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A. Za vsako povprečno vrednost so prikazani standardni odkloni. ....	27
Slika 14: Povprečna produkcija TNF- $\alpha$ , ki jo izzovejo različni pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B. Za vsako povprečno vrednost produkcije so prikazani standardni odkloni. ....	29
Slika 15: Povprečna produkcija IL-8, ki jo izzovejo različni pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A. Za vsako povprečno vrednost produkcije so prikazani standardni odkloni. ....	32
Slika 16: Povprečna produkcija IL-8 (pg/ml), ki jo izzovejo različni pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A. Za vsako povprečno vrednost produkcije so prikazani standardni odkloni. ....	34



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CIK	cikorna kislina
CM	RPMI-1640 z dodanim 10 % FBS in 0,1 % gentamicinom (Complete medium)
E	ehinakozid
EKST	ekstrakt
FBS	fetalni goveji serum (Fetal bovine serum)
IL	interlevkin
K	kaftarna kislina
KONC	koncentracija
LPS	lipopolisaharid
PBS	phosphate buffer saline
PS	polisaharidi
PMA	phorbol-12-myristate-13 acetate (forbol ester)
RPMI	medij za gojenje celičnih kultur (Roswell Park Memorial Institute)

## 1 UVOD

Rod *Echinacea* ali ameriški slamnik je severnoameriška avtohtona rastlina. Njeni ekstrakti so bili tradicionalno rabljeni za različna zdravljenja kot so bakterijske in virusne infekcije, rak ter AIDS (Goel V. in sod., 2002). Predstavlja eno najbolj splošnih tradicionalnih ameriških rastlinskih zdravil, ki deluje kot imunostimulant pri prehladu in gripi.

V Evropi je bil leta 1998 ameriški slamnik med desetimi najpomembnejšimi rastlinami uporabljenimi v medicinske namene (Dalby-Brown L. in sod, 2005). Izmed devetih vrst ameriškega slamnika je najbolj znana *Echinacea purpurea* L. Moench (v nadaljevanju škrlatni ameriški slamnik), ki jo poznamo zaradi njenega imunostimulatornega delovanja za zdravljenje navadnega prehlada, kašlja, bronhitisa, infekcij zgornjih dihal, virusnih okužb, bolezni kože in pomanjkljivosti imunskega sistema.

Danes je postala ena najpopularnejših rastlinskih produktov v Severni Ameriki in Evropi kot imunski podpornik predvsem pri preprečevanju in zdravljenju infekcij zgornjih dihal (Rininger in sod., 2000).

V mnogih *in vitro* imuno študijah je bilo ugotovljeno, da slamnik inducira imunski sistem preko spodbujanja nespecifičnega imunskega sistema. Spodbuja fagocitno aktivnost makrofagov, porast izločanja različnih citokinov iz njih in povečanje delovanja naravnih celic ubijalk (NK). V nasprotju pa so rezultati kliničnih preiskav *in vivo* zelo variabilni in skopi. Kljub mnogim raziskavam, ki dokazujejo ugoden vpliv na zdravje človeka s pomočjo pripravkov slamnika, je še veliko nejasnega glede natančnih mehanizmov njegovega delovanja (Goel V. in sod., 2002; Barrett B. in sod., 2003).

Lipofilni alkilamidi, polarna kavna kislina, cikorna kislina in polisaharidi so potencialne bioaktivne učinkovine v ameriškem slamniku. (Goel V. in sod., 2002). V naši raziskavi smo naredili *in vitro* poizkus vpliva različnih standardnih učinkovin (kaftarne kisline, cikorne kisline in ehinakozida) in njihovih kombinacij na tvorbo citokinov pri celični liniji humane akutne monocitne levkemije (THP-1). Prav tako smo isto stvar proučevali na ekstraktih, ki so bili plod jesenske ali poletne žetve.

## 1.1 NAMEN NALOGE

V nalogi smo želeli podrobneje razjasniti kako vplivajo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika na produkcijo citokinov. *In vitro* na celični liniji THP-1 smo želeli dokazati, da se produkcija tako vnetnih kot protivnetnih citokinov poveča. Primerjali smo ekstrakt poletne in jesenske žetve, kjer smo pričakovali povečano produkcijo citokinov pri ekstraktih poletne žetve, saj vsebujejo višje koncentracije posameznih učinkovin. Preizkusili smo tudi posamezne standardne pripravke škrlatnega ameriškega slamnika (cikorno kislino, ehinakoamid in kaftarno kislino), kjer smo ugotavljali vpliv posameznih učinkovin na produkcijo citokinov. Zanimal nas je imunostimulatorni vpliv cikorne in kaftarne kisline. Za ehinakoamid smo želeli dokazati, da nima imunostimulatorne vloge, ampak deluje protivnetno. Prav tako nas je zanimalo, če cikorna kislina in ekstrakt (izbrali smo ekstrakt poletne žetve) znižajo učinek produkcije vnetnih citokinov, ki ga povzroči LPS.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SPLOŠNO O AMERIŠKEM SLAMNIKU

Ime *Echinacea* izhaja iz grške besede »echinos«, kar pomeni špica, konica. Ameriški slamnik je bila ena najpomembnejših zdravilnih rastlin severnoameriških prerijskih Indijancev. Uporabljali so sok ali kašo zdrobljene zeli ali prežvečenih koščkov korenine. Stotine komercialnih preparatov ameriškega slamnika od direktno stisnjenih sokov do etanolnih in hidrofilnih ekstraktov, do praškov izsušenih listov in cvetov je na voljo v trgovinah in lekarnah. Ameriški slamnik se najbolj široko uporablja kot preventiva ali pri zdravljenju navadnega prehlada z zmožnostjo stimuliranja imunskega sistema.



Slika 1: *Echinacea purpurea* (škrlatni ameriški slamnik)

#### 2.1.1 Zgodovina uporabe ameriškega slamnika

Beli priseljenci v Severni Ameriki so prevzeli uporabo slamnika od Indijancev. Prva zgodovinska omemba ameriškega slamnika je bila od Clytona v *Flori Virginici* (1762) in od Schöpfa v *Material Medica Americana*. Leta 1852 je bil ameriški slamnik prvič naveden v »Ecclectic Dispensatory of the United States« kot uspešno zdravilo za sifilis. Prvi farmacevtski pripravek je začel izdelovati in prodajati nemec H.C.F. Meyer leta 1869 pod oznako »Meyers Blutreiniger« (Meyerjevo zdravilo za čiščenje krvi). Prepoznavnost je zelo naraščala.

### 2.1.2 Sistematika

Ameriški slamnik, ki so ga včasih uvrščali v rod *Rudbeckia* je zelnata trajnica, in danes spada v rod *Echinacea*, družino nebinovk (*Asteraceae*) oziroma košarnic (*Compositae*) ter v red *Asterales*.

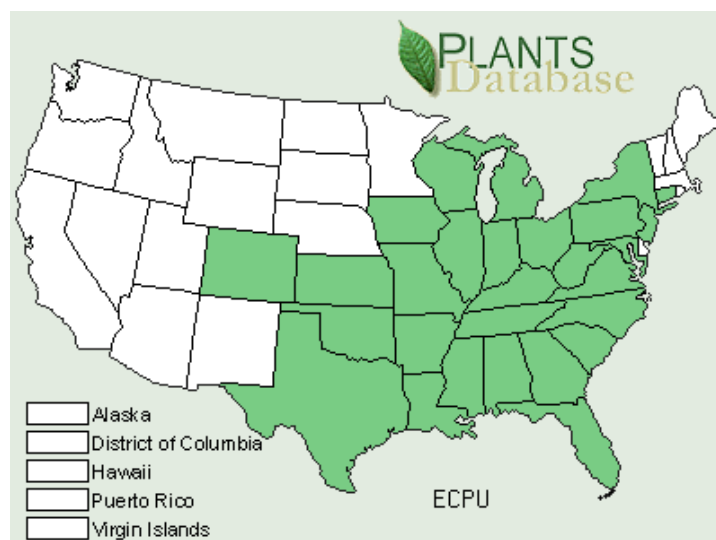
Od devetih vrst slamnika se v zdravstvene namene uporabljajo tri:

- *Echinacea purpurea* L. Moench – škrlatni ameriški slamnik
- *Echinacea angustifolia* DC. Var. *Angustifolia* – ozkolistni ameriški slamnik
- *Echinacea pallida* Nutt. – blede ameriški slamnik

Vse tri imajo nekoliko drugačno kemijsko zgradbo in za vse tri je bilo dokazano, da delujejo kot modulatorji imunskega sistema. Izkazalo se je, da je aktivnost povzročena v kombinaciji cikorne kisline, polisaharidov in alkilamidov, ki so prisotni v vseh treh rastlinah, vendar v različnih razmerjih.

### 2.1.3 Razširjenost rastline

Domovina škrlatnega ameriškega slamnika je vzhodni in srednji del Severne Amerike: od Georgije do Louisiane, na severu do Virginije, Ohaia, Michigana, Ilnois in Iowe. Rastišča so svetli gozdovi in prerije, pobočja in goščave listnatih gozdov (McGregor, 1968; Foster, 1991; cit. po Remškar, 2003).



Slika 2: Razširjenost škrlatnega ameriškega slamnika (Natural resources conservation service, 2007)

Škrlatni ameriški slamnik zaradi njegove lepote in pomembnosti v medicini gojijo v naravi v Združenih Državah, Kanadi in Evropi, še posebej v Nemčiji (Barrett B. in sod., 2003). Gojijo ga tudi v Avstraliji, v severni in vzhodni Afriki, v Aziji, Latinski Ameriki, kot novo pridelano vrsto pa ga gojijo tudi v Novi Zelandiji (Remškar, 2003).

#### 2.1.4 Opis rastline

Škrlatni ameriški slamnik je do 2 metra visoka trajnica.



Slika 3: *Echinacea purpurea* (škrlatni ameriški slamnik)

Ima pokončno steblo, ki je rahlo dlakavo in odebeljeno na vrhu, kjer nosi cvetno glavico. Listi so premenjalno nameščeni in dlakavi. Pritlični so jajčaste do suličaste oblike, priostreni in grobo napiljeni. Stebelni listi so nekoliko manjši, skoraj celorobi ter skoraj brez peclja.

Cvetovi so koški, veliki 2 – 5 cm. Zunanji cvetovi so škrlatno vijoličasti jezičasti cvetovi, ki so sterilni in dolgi 4 - 6 cm. V sredini v centralnem stožcu pa so oranžno-rdeči cevasti cvetovi, ki so precej trdi.

Pod cvetno glavico je steblo votlo. Korenine so dokaj globoke in so belkasto-rjave barve. Ima tudi kratko koreniko s številnimi stranskimi koreninami, s katero rastlina prezimi. Škrlatni ameriški slamnik prvo leto cveti od septembra, v naslednjih letih pa od julija naprej.

Rastlina ima najraje sončne lokacije, vendar so barve cvetov najbolj žive, kadar ni izrazito sončno (Remškar, 2003).

## 2.2 UČINKOVINE AMERIŠKEGA SLAMNIKA

Sestavine vsake od vrst ameriškega slamnika so podobne, opazne so le nekatere razlike v aktivnih komponentah. Razlike se pojavljajo tudi glede na geografsko lokacijo, stopnjo razvoja rastline, čas žetve, rastne pogoje in ali gre za korenine ali nadzemne dele rastline (Percival S.S. in sod., 2000).

Pred evropsko kolonizacijo so številni prvotni narodi uporabljali pripravke slamnika za različne namene. Uporabljali so ga za zdravljenje bolezni dihal in prebavil, zobobola, opeklin, vnetja dlesni, mumpsa, ošpic in gonoreje. Pogosto pa so poročali tudi o njegovi uporabi pri ugrizih kač, pikih mrčesa in na splošno pri zastrupitvah. Evropski naseljenci pa so se učili od prvotnih prebivalcev o teh avtohtonih rastlinah (Barrett B., 2003).

Oralno uživanje pripravkov ameriškega slamnika se uporablja za zdravljenje navadnega prehlada, infekcije dihal, infekcije sečil in celjenje ran. Korenine bledega ameriškega slamnika se uporabljajo za zdravljenje virusu gripi podobnim infekcijam.

Ameriški slamnik je najbolj znan prav zaradi efekta stimuliranja imunskega sistema. Stimulacija nekaterih imunskih celic kot so makrofagi, drugi monociti in celice NK je bila že velikokrat dokazana *in vitro*. Randolph in sodelavci so leta 2003 ugotovili, da ekstrakti škrlatnega ameriškega slamnika vplivajo na ekspresijo genov za citokine celične linije THP-1. Celice THP-1 so bile inkubirane z naraščajočimi koncentracijami ekstraktov škrlatnega ameriškega slamnika (10, 50 in 250 µg/ml). Rezultati so pokazali, da ekspresija genov v primerjavi z negativno kontrolo (ICAM) narašča s koncentracijo pri sledečih citokinih: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ .

Vendar pa, če in kako ti imunostimulansi izboljšajo zdravje človeka, je slabo razumljivo. Boljši izraz kot imunostimulacija je torej imunomodulacija, saj ne gre vedno za pospeševanje, ampak tudi supresijo. Nekateri imunski efekti so koristni, drugi škodljivi. Koristne imunomodulacije vključujejo redukcijo škodljivih odgovorov gostitelja, kot je vnetje. Vnetje je najpomembnejši znak infekcije navadnega prehlada in vnetja žrela za katere se je ameriški slamnik primarno uporabljal. Vnetje vključuje otekanje tkiva (se kaže v vazodilataciji in prepustnosti kapilar) in infiltracijo levkocitov. Ta proces je primarno povzročen z substancami, ki jih izločajo makrofagi: toksični kisikovi radikali, peroksid, NO (dušikov oksid), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , levkotrieni in drugi. Medtem ko ameriški slamnik aktivira makrofage in vpliva na njihovo sekrecijo citokinov *in vitro*, poskusi *in vivo* še niso dovolj skladni.

Nekatere imuno študije so pokazale, da je efekt kombinacije substanc večji kot seštevek efekta vsake substance posebej (Kim H-O. in sod., 2000).

### **2.2.1 Vrste učinkovin**

Imunostimulatorni učinek ameriškega slamnika pripisujemo torej različnim snovem, kot so: derivati kavne kisline, lipofilni alkilamidi in polisaharidi. Derivati kavne kisline spadajo med fenilpropanoide, ki so fenoli in so dobri antioksidanti. Najpomembnejši derivat kavnih kislin je cikorna kislina iz škrlatnega ameriškega slamnika, ehinakozid v bledem ameriškem slamniku ter ozkolistnem ameriškem slamniku in kaftarna kislina (Dalby-Brown L. in sod., 2005).



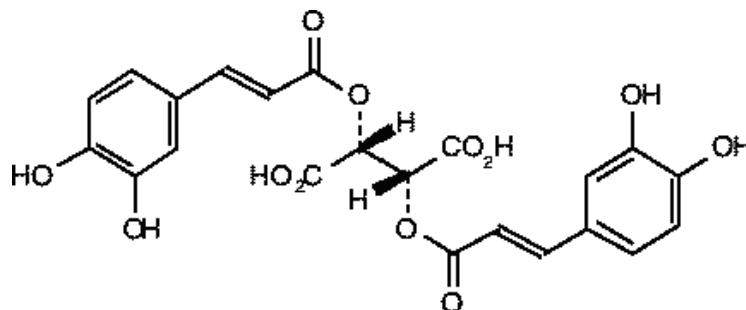
Glikoproteini, polialkeni, polialkani, eterična olja (z glavnimi sestavinami: humulen, borneol, bornil acetat, germakren D, kariofilen) sodijo prav tako med pomembnejše snovi, na katere je vezan učinek ameriškega slamnika. Prisotne so tudi manj pomembne učinkovine kot so flavonoidi, alkaloidi, triterpeni, fitosteroli, smole, betain, grenke snovi, rudninske snovi, maščobna, palmitinska, miristinska, linolna in karotinska kislina (Bauer in Wagner, 1998; cit. po Remškar, 2003).

## 2.2.2 Cikorna kislina

Cikorna kislina (2,3-O-dikafeoil vinska kislina) je torej derivat kavne kisline. V različnih komercialnih pripravkih iz škrlatnega ameriškega slamnika so bile najdene zelo različne koncentracije cikorne kisline, kar je najverjetneje posledica encimatske aktivnosti v svežih ekstraktih, ki vodi do razpada cikorne kisline (Bone K., 2008). Cikorna kislina je zelo občutljiva na razpad zaradi različnih postopkov shranjevanja (sušenje, zmrzovanje,...) po žetvi (Kim H-O. in sod., 2000).

Izmed derivatov kavne kisline le cikorna kislina stimulira fagocitno aktivnost *in vitro* in *in vivo* (Bauer in sod., 1989). Ima tudi protivirusno aktivnost, saj je bilo ugotovljeno, da inhibira integrazo virusa HIV-1 in njegovo replikacijo (Kim H-O. in sod., 2000).

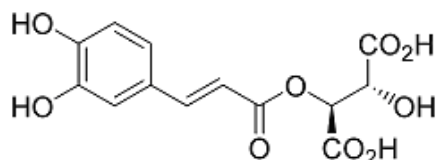
Nahaja se v vseh rastlinskih delih, vendar v največjih koncentracijah v koreninah in cvetovih. Najdemo jo v škrlatnem ameriškem slamniku, v bledem ameriškem slamniku, v ozkolistnem ameriškem slamniku pa je zastopana le v sledih.



Slika 4: Kemijska zgradba cikorne kisline (Letchamo W. in sod., 1999)

### 2.2.3 Kaftarna kislina

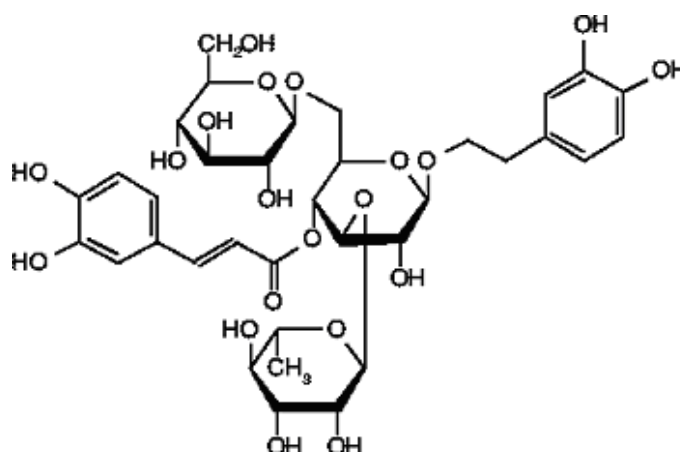
Kaftarna kislina (2-O-kofeil vinska kislina) se nahaja pretežno v nadzemnih delih rastline (Perry in sod., 2001; cit. po Jager, 2004). V objavah nismo zasledili imunostimulatorne vloge kaftarne kisline, čeprav ji jo nekateri pripisujejo.



Slika 5: Kemijska zgradba kaftarne kisline (Dalton pharma services, 2008)

### 2.2.4 Ehinakozid

Ehinakozid je prav tako derivat kavne kisline, kjer je le-ta vezana na sladkorje. Ehinakozida ni v škrlatnem ameriškem slamniku (Remškar, 2003). Najprej je bil izoliran iz korenin ozkolistnega ameriškega slamnika, pozneje pa najden tudi v bledem ameriškem slamniku. Ima zanemarljiv baktericidni in protivirusni učinek in ne kaže imunostimulatornega učinka. Ehinakozid varuje kolagen pred reaktivnimi kisikovimi spojinami in ima antioksidativno in protivnetno aktivnost (Pellati F. in sod., 2003). Ponavadi ehinakozid služi kot markerska spojina kvalitete ekstraktov ameriškega slamnika.



Slika 6: Kemijska zgradba ehinakozida (Letchamo W. in sod., 1999)

### 2.2.5 Polisaharidi

Polisaharide uvrščamo med primarne metabolite rastline, saj so gradniki celičnih sten in vključeni v metabolizem celic, kar pomeni, da jih vsebujejo vse rastline. Poleg cikorne kisline in alkilamidov bi naj bili pomembni za imunostimulatorno delovanje škrlatnega ameriškega slamnika.

Iz škrlatnega ameriškega slamnika so izolirali dva imunostimulativna polisaharida in sicer Polisaharid 1 (PS 1), 4-O metil-glukuronoarabinoksilan s povprečno molekulsko maso 350 kDa in Polisaharid 2 (PS 2), ki je kisli arabinoramnogalaktan s povprečno relativno molekulsko maso 450 kDa (Remškar, 2003). Ameriški slamnik vsebuje tudi fruktozo, ki tvori polimere fruktana (Giger in sod., cit. po Remškar, 2003).

Očiščeni polisaharidi iz nadzemnih delov škrlatnega ameriškega slamnika imajo visok potencial aktivacije makrofagov *in vitro* in so popolnoma netoksični v tkivnih kulturah. Čeprav polisaharidi vplivajo tudi na delovanje celic T in B, je njihov največji učinek na makrofage.

Makrofagi, ki so bili stimulirani z očiščenimi polisaharidi kažejo stimulacijo izločanja IL-1 v primerjavi z nestimuliranimi makrofagi, vendar pa se večje izločanje IL-1 v primerjavi z LPS šibko izrazi. (Stimpel in sod., 1984). Inkubacija makrofagov z kislim polisaharidom arabinogalaktanom skupaj z LPS kaže podobne rezultate izločanja IL-1 kot inkubacija samo z LPS. Polisaharid arabinogalaktan pa močno inducira produkcijo TNF- $\alpha$  v odvisnosti od koncentracije pri makrofagih. Že zelo nizke koncentracije arabinogalaktana (manj kot 4  $\mu$ g/ml) imajo stimulativen učinek na produkcijo TNF- $\alpha$ . Z višanjem koncentracije arabinogalaktana se poveča izločanje TNF- $\alpha$  (Luettig in sod., 1989).

Iz rezultatov *in vitro* študij bi lahko sklepali na podoben učinek *in vivo*, vendar zaradi slabe absorpcije in mobilnosti polisaharidov v organizmih tega ne moremo trditi.

## 2.2.6 Alkilamidi

Alkilamidi so lipofilne komponente ekstrakta ameriškega slamnika. Spodbujajo proliferacijo alveolarnih makrofagov in spodbujajo sproščanje IL-1 in TNF- $\alpha$  iz njih.

Med manj pomembnimi molekulami v slamniku so antociani in flavonoidi, ki bi naj prav tako imeli antioksidativne zmožnosti.

## 2.3 CITOKINI

V sredini šestdesetih let so odkrili, da so nad kulturami limfocitnih celic dejavniki, ki spodbujajo razmnoževanje in zorenje celic imunskega sistema. Ti dejavniki so citokini, ki so skupina regulacijskih glikoproteinov. Izločajo jih skoraj vse celice, predvsem pa celice T pomagalka Th in makrofagi. Identificiranih je bilo preko sto različnih humanih citokinov.

Citokini delujejo tako, da se vežejo s specifičnimi receptorji na membrano tarčne celice in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Na receptorje se vežejo z močno afiniteto, zato lahko posredujejo biološke učinke v pikomolarnih koncentracijah. Izdelovanje citokinov je skrbno uravnano, izločanje je kratkotrajno in delujejo na kratke razdalje. Med številnimi fiziološkimi odzivi za katere je potrebna udeležba citokinov, je razvoj humoralnega in celično posredovanega odziva, sprožitev vnetja, uravnavanje hemopoeze, uravnavanje celičnega razmnoževanja in diferenciacije ter zdravljenje ran (Vozelj, 2000). Njihova najpomembnejša lastnost je pleiotropnost, kar pomeni, da v različnih tarčnih celicah sprožajo različne biološke učinke. Citokini obsegajo družine molekul kot so rastni faktorji, interferoni, interlevkini in kemokini.

### 2.3.1 Interlevkin (IL-1)

IL-1 obstaja v dveh oblikah: IL-1 $\alpha$  in IL-1 $\beta$ . Kodirata ju dva različna gena, imata pa enake biološke funkcije in sta ključna **vnetna citokina**. IL-1 $\alpha$  gradi 271 aminokislin, IL-1 $\beta$  pa 269. IL-1 $\beta$  prevladuje pri ljudeh, medtem ko IL-1 $\alpha$  pri miših. IL-1 izdelujejo predvsem aktivirani makrofagi in deluje na različne celice, najbolj na limfocite B in T ter makrofage.

Pri limfocitih B spodbuja njihovo proliferacijo in sintezo imunoglobulinov. Domnevajo, da se IL-1 sprošča iz makrofagov med apoptozo. Povzroča vročino, resorbcijo kosti, proteolizo mišic in povečano nastajanje proteinov akutne faze. Deluje neposredno ali pa posredno preko spodbujanja drugih citokinov npr. IL-6 ali TNF- $\alpha$  (Vozelj, 2000).

### 2.3.2 Interlevkin (IL -10)

IL-10 je homodimerni protein iz 160 aminokislin in ima močan biološki učinek na celice T. Izdelujejo ga T<sub>H0</sub> in T<sub>H2</sub> mišje celice. Njegovo nastajanje preprečuje IFN- $\gamma$ . Najpomembnejši funkciji IL-10 sta preprečevanje od LPS spodbujenega izdelovanja citokinov (IL-1, TNF- $\alpha$  in drugih). Preprečuje tudi izdelovanje reaktivnih kisikovih presnovkov in NO v makrofagih, celicah T<sub>H</sub> in NK. Končni učinek je **preprečevanje imunskega vnetja**, ki ga posredujejo celice. IL-10 ima stimulativen učinek na celice B in na sluznične mastocite (Vozelj, 2000).

### 2.3.3 Interlevkin (IL-8)

IL-8 je neglikozilirani protein iz 72 aminokislin. Izločajo ga makrofagi, endotelijske celice, fibroblasti, keratinociti, hepatociti, hondrociti in mnoge tumorske celične linije. Deluje na nevtrofilce. IL-8 nastaja kot odziv na stimulacijo TNF. Sintezo IL-8 med drugimi inducirajo PMA, virusi in bakterijski lipopolisaharid. Deluje antiapoptotsko. Produkcija IL-8 je velika pri nekaterih rakavih celičnih linijah, kar je v skladu z višjo koncentracijo IL-8 v serumu bolnikov z hepatocelularnim karcinomom (Osawa Y., 2002.; Vozelj, 2000).

### 2.3.4 Interlevkin (IL-12)

IL-12 izdelujejo celice B ter monociti in makrofagi. Je edini citokin, ki ga ne izdelujejo celice T in je zaradi delovanja na celice NK mediator naravne imunosti. Najmočnejši induktor sinteze IL-12 so bakterije, njihovi produkti in paraziti. Okrepi imunski odziv celic Th1 in s tem celično posredovano imunost. IL-12 zavira nastanek protiteles IgE pri alergijskih reakcijah (Vozelj, 2000).

### 2.3.5 Interlevkin (IL-6)

IL-6 je bil dolgo znan kot vnetni citokin, danes ga uvrščamo med **protivnetne citokine**, saj nekoliko bolj deluje protivnetno. Deluje na povečano izločanje proteinov akutne faze in tudi na sintezo protivnetnih citokinov kot je IL-10.

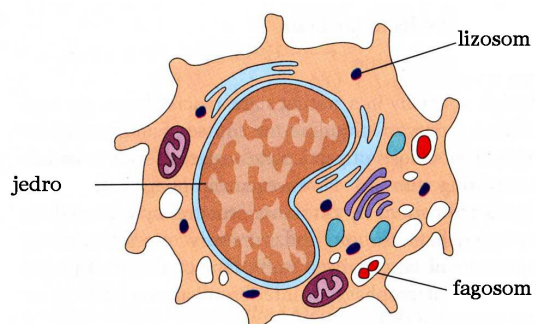
IL-6 izdelujejo različni celični tipi v odziv na IL-1. Pospešujoče deluje na razmnoževanje in zorenje celic B ter s tem okrepi izločanje imunoglobulinov. Raven IL-6 je povečana predvsem pri okužbah s po Gramu negativnimi bakterijami, kar je odziv na TNF. Deluje neposredno na hepatocite, da sintetizirajo CRP (Vozelj, 2000).

### 2.3.6 Tumorje nekrozirajoči faktor $-\alpha$ in $\beta$ (TNF $-\alpha$ in $\beta$ )

TNF  $-\alpha$  in  $\beta$  je najpomembnejši mediator imunskega odziva na po Gramu negativne bakterije in tudi za druge infektivne mikroorganizme. Izdelujejo ga različne celice, makrofagi, celice NK, astrociti in Kuppferjeve celice, kot odgovor na bakterije, viruse, različne citokine in imunske komplekse (Vozelj, 2000). Visoke koncentracije TNF- $\alpha$  povzročijo kaheksijo, poškodbe tkiva in intravaskularno koagulacijo.

## 2.4 MAKROFAGI

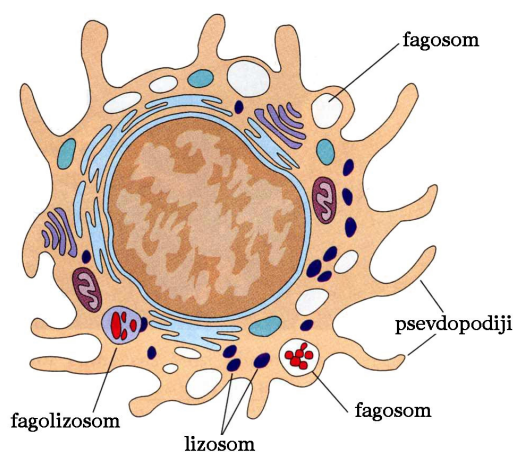
Monociti se razvijejo iz matične celice v kostnem mozgu. So velike, ameboidne celice, premera 10 – 15  $\mu\text{m}$ , z velikim ledvičastim jedrom in zrnato citoplazmo, ki vsebuje lizosome, fagocitne vakuole in citoskeletne elemente. Iz kostnega mozga vstopijo monociti v krvni obtok, kjer ostanejo 8 ur, nato pa migrirajo v tkiva in se diferencirajo v tkivne makrofage. Celica se poveča 5 – 10 krat, poveča se število celičnih organelov, posebej lizosomov. Fagocitna aktivnost močno naraste in producira velike količine hidrolitičnih encimov.



Slika 7: Monocit (Goldsby R.A. in sod., 2000)

Makrofagi so raztreseni po celem telesu, nekateri postanejo pritrjeni, drugi so potujoči. V različnih delih telesa dobijo pritrjeni makrofagi različne oblike in različne funkcije. V možganih jih imenujemo mikroglijske celice, v pljučih alveolarni makrofagi, v kostnem mozgu osteoklasti in v jetrih Kupfferjeve celice.

Makrofagi so regulatorne celice, ki igrajo pomembno vlogo pri celično posredovani imunosti, kot antigen predstavljajoče celice in vnetne celice s sposobnostjo ubijanja tumorskih in mikrobnih celic. Njihova aktivnost se vrši preko produkcije različnih citokinov, kar pomeni, da je količina sproščenih citokinov pokazatelj njihove aktivacije (Haza A.I. in sod., 2003).

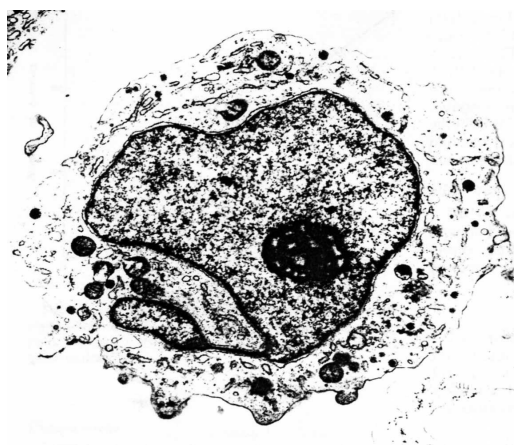


Slika 8: Makrofag (Goldsby R.A. in sod., 2000)

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 CELIČNA LINIJA HUMANE AKUTNE MONOCITNE LEVKEMIJE (THP-1)

Celice THP-1 so linija celic humane akutne monocitne levkemije. Pridobljene so bile iz krvi eno leto starega fantka z akutno monocitno levkemijo. Celice so zmožne fagocitirati delce lateksa, fagocitirajo tudi senzibilizirane eritrocite. V premeru so velike 12 - 14  $\mu\text{m}$ , imajo bazofilno citoplazmo, ki vsebuje majhna azurofilna zrna in nekaj vakuol. Jedro je nepravilne oblike. Elektronska mikroskopija kaže, da imajo nagubano jedro, v katerem je jasno vidno jedrce. V citoplazmi je veliko sekretornih veziklov (v premeru 0,2 - 0,5  $\mu\text{m}$ ), lipidnih kapljic in običajnih komponent citoplazme (mitohondriji, zrnati endoplazmatski retikulum in Golgijev aparat). Virusnih struktur ni bilo najdenih. Analiza kariotipa je pokazala, da ima večina celic diploidno število kromosomov (46, XY), njihov podvojitveni čas je 26 ur. Celična linija ni odporna za hepatitis B, humane viruse imunske pomanjkljivosti in druge povzročitelje. Ugotovljeno je bilo, da celična linija ne povzroča bolezni pri odraslih zdravih ljudeh (Tsuchiya S. in sod., 1980).



Slika 9: Celica humane akutne monocitne levkemije THP-1 (Tsuchiya S. in sod., 1980)

#### 3.2 STIMULACIJA CELIC THP-1 S PMA (FORBOL ESTER)

Kadar izpostavimo celice THP-1 učinkovini PMA (phorbol-12-myristate-13 acetate), pride do diferenciacije v makrofage. Forbol ester aktivira proteinsko kinazo C (PKC), ta pa je vključena v uravnavanje celične proliferacije, diferenciacije in drugih celičnih funkcij. Proces diferenciacije spremlja proces izgube proliferativne zmožnosti. Tako se celice THP-1 odzovejo na PMA s skoraj popolno ustavitvijo proliferacije. Pod vplivom PMA pride do



diferenciacije celic THP-1, kar vključuje fagocitno aktivnost, pritrditev celic na podlago, tvorjenje nekaterih citokinov (na primer: TNF- $\alpha$ ), izražanje površinskih antigenov in ustavitev celične proliferacije (Schwende H. in sod., 1996).

### 3.3 GOJENJE CELIČNE LINIJE THP-1

Celice THP-1 smo gojili v mediju RPMI 1640 z dodanim 10 % FBS, 2 mM L-glutaminom, 100 U/ml penicilinom, 100  $\mu$ g/ml streptomycinom ter 0,05 mM 2-merkaptotanolom na 37 °C in atmosferi 5 % CO<sub>2</sub>. Celice smo precepljali na 2 do 3 dni. Pred precepljanjem smo celice opazovali pod faznokontrastnim mikroskopom, da smo videli, če so lepih oblik in če tvorijo skupke, kar je pomenilo, da se delijo. Postopek precepljanja je potekal tako, da smo celice najprej centrifugirali 5 minut pri 1600 obratih. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v svežem mediju. Nato smo celice prešteli v hemocitometru, jih razredčili do koncentracije  $1 \times 10^6$  celic/ml in inkubirali za 48 ali 72 ur.

### 3.4 PRIPRAVA UČINKOVIN ŠKRLATNEGA AMERIŠKEGA SLAMNIKA

#### 3.4.1 Priprava standardnih učinkovin

Standardne učinkovine smo naročili pri proizvajalcu (LGC Promochem GmbH):

- Cikorna kislina (CIK)
- Kaftarna kislina (K)
- Ehinakozid (E)

#### 3.4.2 Priprava ekstraktov

##### Ekstrakt 1:

Ekstrakt 1 smo pripravili iz svežih rastlin, ki so bile nabrane poleti, 15. 07. 2006 (v nadaljevanju bom uporabila izraz **poletna žetev**). Najprej smo drogo raztopili v 70 % etanolu, masno razmerje med drogo in topilom je bilo 2:1. Nato smo za 15 minut (pri 30 °C) dali raztopino v ultrazvočno kadičko (Sonis 4, Iskra). Ultrazvočna kadička vpliva na količino ekstrahiranih učinkovin. Za tem smo vse skupaj centrifugirali pri sobni

temperaturi 15 minut in pri 4200 obratih ter filtrirali s filter papirjem (Rundfilter, MN 640md; 5,5 cm). Ekstraktu smo na koncu odparili topilo z rotavaporjem pri 40 °C.

#### Ekstrakt 2:

Ekstrakt 2 smo pripravili iz svežih rastlin, ki so bile plod jesenske žetve (nabrane: 10. 11. 2006). Uporabili smo topilo 70 % etanol, razmerje med rastlino in topilom je bilo 2:1. Nadaljnji postopek je bil enak kot pri ekstraktu 1.

#### Ekstrakt 3:

Uporabili smo ekstrakt, ki je na voljo na tržišču kot zdravilo z imenom Immunol. Ekstraktu smo odparili topilo z rotavaporjem pri 40 °C.

### 3.5 PRIPRAVA KONTROL

Za negativno kontrolo smo izbrali celice THP-1 v mediju RPMI 1640, ki je bilo enako mediju v katerem smo gojili celično linijo za pripravo na poskus. Kot pozitivno kontrolo smo vzeli LPS od bakterije *Escherichia coli* v koncentraciji 400 ng/ml. LPS je bakterijski endotoksin, ki je odgovoren za septični šok tako pri ljudeh in živalih po infekciji s po Gram negativnimi bakterijami. LPS je stimulator sinteze vnetnih citokinov, kot so IL-1, IL-8 in TNF- $\alpha$  (Haza A.I. in sod. 2003).

### 3.6 IZVEDBA POSKUSA

Poskus smo izvedli v mikrotitrskih ploščah s 96 luknjami z ravnim dnom. Celicam smo zamenjali medij. V luknje smo nacepili  $1,5 \times 10^6$  celic/ml, v vsako luknjo 200  $\mu$ l, oz.  $3 \times 10^5$  celic. Celice smo nato diferencirali v makrofage z dodatkom PMA v koncentraciji 10 ng/ml in inkubirali 24 ur. Naslednji dan smo pod fazno kontrastnim mikroskopom opazovali diferenciacijo celic in pritrditev na plošče. Odpipetirali smo medij s PMA in dvakrat sprali s čistim medijem (brez PMA), tretjič pa dodali PMA in spet inkubirali za 24 ur. Tretji dan smo najprej odpipetirali medij in celice še enkrat sprali s svežim medijem. Nato smo celicam dodajali ekstrakte oziroma standarde po shemi v preglednici 1. Vsak vzorec smo na ploščo dali v treh ponovitvah.

Preglednica 1: Shema vzorcev

<b>KONTROLE</b>			
<b>NEGATIVNA KONTROLA</b>	<b>RPMI</b>	RPMI + 10 % FBS	
<b>POZITIVNA KONTROLA</b>	<b>LPS</b>	400 ng/ml	
<b>VZORCI</b>		<b>KONC A</b>	<b>KONC B</b>
<b>CIKORNA KISLINA</b>	<b>CIK</b>	2 µg/ml	20 µg/ml
<b>CIKORNA K. + EHINAKOZID</b>	<b>CIK+E</b>	2 µg/ml CIK 2 µg/ml E	20 µg/ml CIK 20 µg/ml E
<b>CIKORNA K.+ EHINAKOZID+ KAFTARNA K.</b>	<b>CIK+E+ K</b>	20 µg/ml CIK 20 µg/ml E 20 µg/ml K	20 µg/ml CIK 20 µg/ml E 20 µg/ml K
<b>EKSTRAKT 1</b>	<b>EKST 1</b>	20 µg/ml	200 µg/ml
<b>EKSTRAKT 2</b>	<b>EKST 2</b>	20 µg/ml	200 µg/ml
<b>EKSTRAKT 3</b>	<b>EKST 3</b>	20 µg/ml	200 µg/ml
<b>CIKORNA K. + LPS</b>	<b>CIK+LPS</b>	2 µg/ml CIK 400 ng/ml LPS	
<b>EKSTRAKT 1 + LPS</b>	<b>EKST 1+LPS</b>		200 µg/ml, 400 ng/ml LPS

Prazna polja v preglednici so osenčena

### 3.7 MERJENJE CITOKINOV

BD CBA (BD™ Cytometric Bead Array) je sistem reagentov za sočasno detekcijo delcev na podlagi njihove fluorescence, meritve izvajamo s pretočno citometrijo. Metoda BD CBA je analogna metodi ELISA, vendar ima več prednosti. Potrebujemo le eno serijo razredčitev standardov za določitev šestih umeritvenih krivulj, metoda omogoča merjenje v zelo kratkem času in zelo majhnem vzorcu.

BD™ CBA Human Inflammation Kit je komplet reagentov za kvantitativno merjenje naslednjih citokinov: IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF in IL-12p70. Omogoča hkratno merjenje šestih različnih citokinov v istem vzorcu in je optimiziran za merjenje specifičnih proteinov v supernatantih celičnih ali tkivnih kultur.

#### 3.7.1 Oprema, reagenti

- Human Inflammation Standards: Liofilizirani rekombinantni humani proteini.
- Human Inflammation Capture Beads (A1-A6): Specifični lovilni polietilenski delci, fluorescirajo od najbolj do najmanj bleščečih kot kaže preglednica 2:

Preglednica 2: Specifičnost posameznih polietilenskih delcev

Lovilni polietilenski delec	specifičnost
(najsvetlejši) A1	IL-8
A2	IL-1 $\beta$
A3	IL-6
A4	IL-10
A5	TNF
(najtemnejši) A6	IL-12p70

Human Inflammation PE Detection Reagent: Konjugirana protitelesa za IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF in IL-12p70. Za vsak vzorec potrebujemo 50  $\mu$ l reagenta.

- Assay diluent: puferski proteini za rekonstitucijo liofiliziranih standardov in njihovo redčenje.
- Wash Buffer: Phosphate buffer saline (PBS) vsebuje detergent in proteine. Uporabimo ga za spiranje resuspendiranje delcev za analizo.

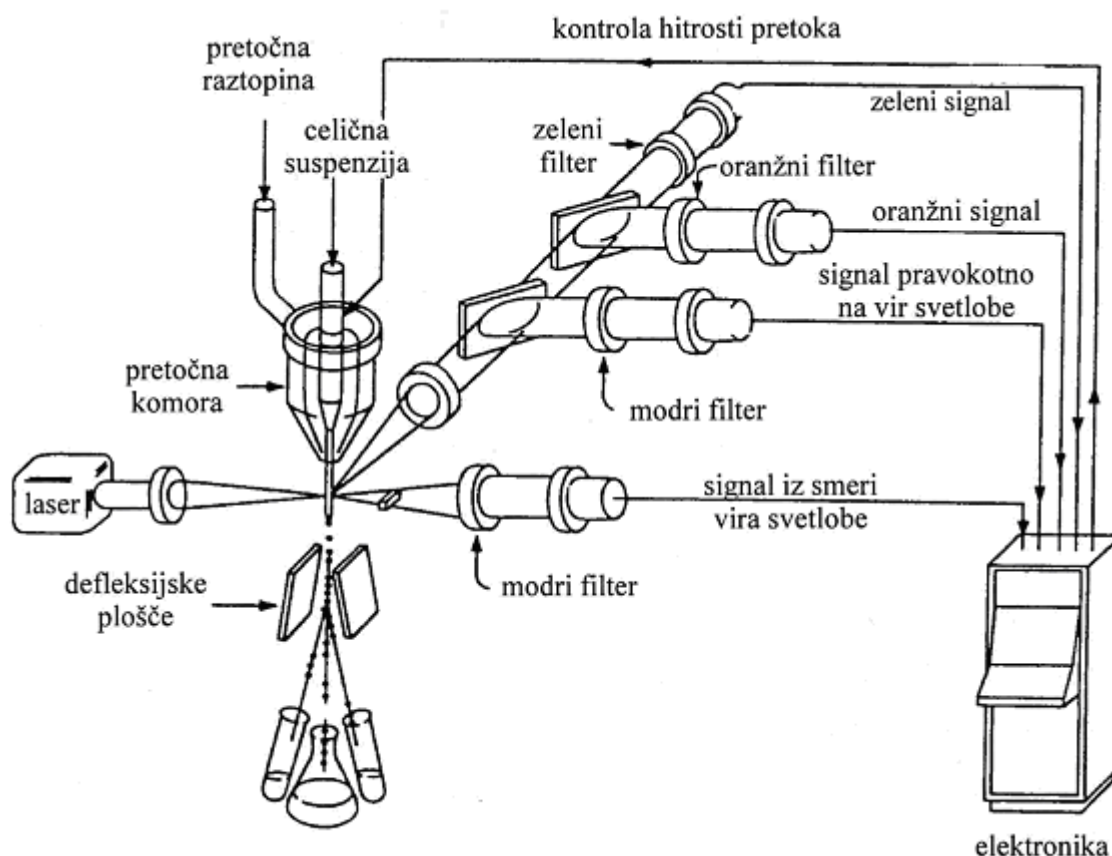
### 3.8 IZVEDBA TESTA

Za izvedbo testa potrebujemo 50  $\mu$ l vzorca (ali standarda). Najprej smo naredili serijo razredčitev standardnih citokinov za določitev umeritvene krivulje. Nato smo tako seriji standardov kot našim vzorcem dodali mešanico 50  $\mu$ l lovilnih polietilenskih delcev (Human Capture Beads) in 50  $\mu$ l konjugiranih protiteles (PE Detection Reagent). Inkubirali smo 3 ure pri sobni temperaturi, da so nastali sendvič kompleksi. Po treh urah smo v vsako epruveto dodali 1 ml pufra PBS (Wash Buffer) in centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih. Supernatante smo zavrgli, spet dodali 300  $\mu$ l PBS v vsako epruveto in resuspendirali usedlino. Vsako epruveto smo pred analizo vortkesirali 3-5 sekund. Epruvete s suspenzijami citokinov, ki so se vezali, smo dali v pretočni citometer (BD FACScan<sup>TM</sup>).

### 3.9 ANALIZA CITOKINOV S PRETOČNIM CITOMETROM

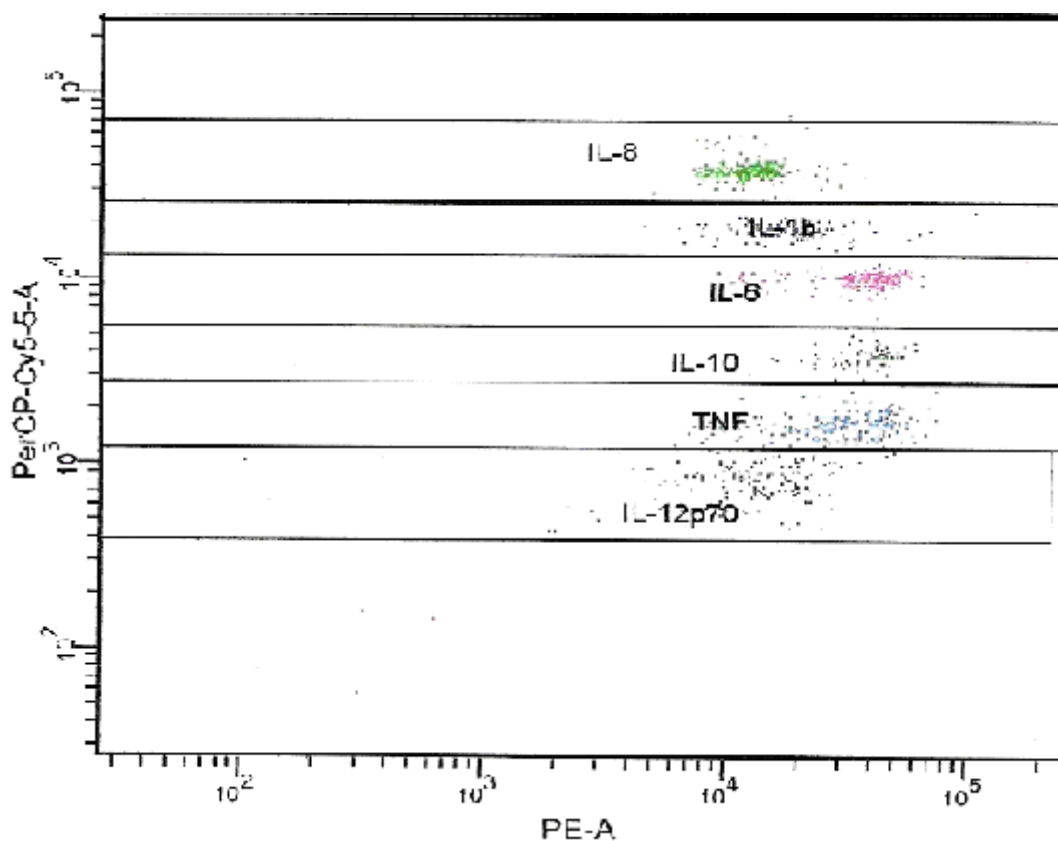
Pretočna citometrija je metoda za ločevanje različnih delcev na podlagi fluorescence. V osnovi je enaka fluorescenčni mikroskopiji, vendar je odčitavanje odstotka obarvanih delcev ali celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo celice ali druge delce (v našem primeru citokine vezane z lovilnimi polietilenskimi delci in konjugiranimi protitelesi), ki jih določamo, v suspenziji. Suspenziji dodamo monoklonska protitelesa, ki so označena s fluorescenčnim barvilom. Počakamo, da se fluorescenčna barvila vežejo na celične ali druge antigene. Nato speremo protitelesa, ki se niso vezala na antigene, in nato pripravljeno suspenzijo analiziramo s pretočnim citometrom. V pretočnem citometru delci eden za drugim potujejo skozi ozek snop svetlobe. Ko pride delec v območje svetlobnega žarka, se le-ta lahko odbije ali lomi, lahko pa se tudi absorbira v molekulah fluorokromnih barvil, ki so vezana na monoklonska

protitelesa. Fluorokromi nato oddajajo svetlobo večjih valovnih dolžin, ki jo analizira sistem fotosprejemnikov (fotodetektorjev). Svetlobo merita dva fotodetektorja. Eden meri svetlobo iz smeri vira FALS in ugotavlja velikost celic. Drugi detektor se imenuje RALS, meri pravokotno na smer vira in sprejema svetlobo odbito od celice, ki je v skladu z granulacijo in površinsko strukturo. V treh detektorjih, ki so opremljeni z barvnimi filtri merimo fluorescenčno svetlobo. V detekcijski coni je sistem leč, ki prejeto svetlobo posredujejo fotopomnoževalkam. Fotopomnoževalke optične impulze spremenijo v električne, konvertorji pa v končne digitalne impulze (Givan, 1992; Shapiro, 1993, cit. po Kopitar A.N., 2004; Ihan A., 1999).



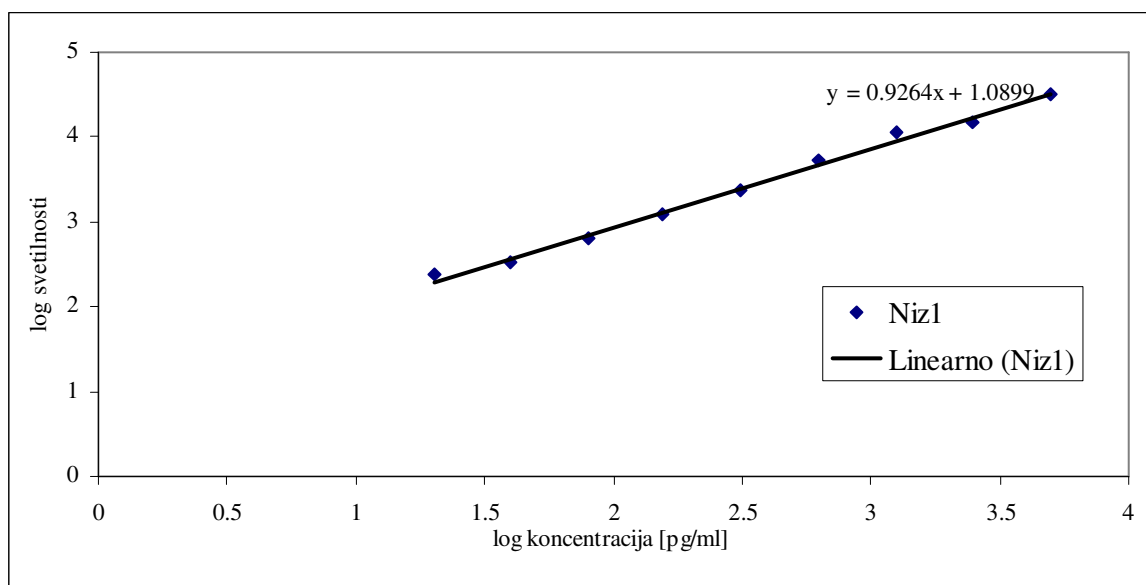
Slika 10: Shematični prikaz pretočnega citometra FACS (Ihan A., 1999)

Rezultati so prikazani na ekranu v obliki točkovnega diagrama. Vsaka točka na diagramu predstavlja dogodek, ki ga zaznajo fotodetektorji. Na osi X je nanešena vrednost intenzitete fluorescence celic (svetilnost celic), na osi Y pa so svetilnosti delcev ločene glede na vrsto fluorokroma, ki označuje posamezni citokin.



Slika 11: Točkasti diagram fluorescence posameznih citokinov.

S pomočjo izmerjenih svetilnosti smo določili umeritveno krivuljo za vsak citokin posebej in izračunali koncentracije posameznih citokinov za vse naše vzorce.



Slika 12: Primer umeritvene krivulje za TNF- $\alpha$ .

### 3.10 STATISTIČNA OBDELAVA

Iz rezultatov smo izračunali povprečne vrednosti in standardne odklone za posamezne vzorce. Podatke o učinkovitosti stimulacije *in vitro* različnih pripravkov ameriškega slamnika smo statistično ovrednotili z metodo analize varianc (ANOVA). Za preverjanje statističnih razlik med posameznimi vzorci smo uporabili metodo LSD («Least significant difference»). Izbrali smo stopnjo tveganja 0,05, kar pomeni, da je razlika med vzorcema statistično značilna, če je vrednost p manjša od 0,05, in ni značilna, če je vrednost p večja od 0,05. Pri statistični analizi podatkov smo uporabili programsko opremo za statistiko Statgraphics Plus 4.0 (Statistical Graphic Corp.).



## 4 REZULTATI

V raziskavi smo preverjali produkcijo citokinov *in vitro* s stimulacijo z različnimi pripravki škrlatnega ameriškega slamnika. Uporabili smo celično linijo akutne monocitne levkemije (THP-1) in jo izpostavili različnim standardnim pripravkom in ekstraktom škrlatnega ameriškega slamnika. Po 24 urah inkubacije smo izmerili koncentracijo vseh šestih citokinov naenkrat s pretočnim citometrom. Primerjati smo želeli ekstrakte poletne in jesenske žetve in dokazati, da je tvorba citokinov večja pri ekstraktih poletne žetve. Pričakovali smo, da bo tvorba citokinov manjša pri nižji koncentraciji dodanih pripravkov in povečana pri dodani višji koncentraciji. Rezultate smo primerjali z negativno kontrolo - medijem RPMI 1640 z dodanim 10 % FBS, 2 mM L-glutaminom ter 0,05 mM 2-merkaptotanolom. Pozitivna kontrola je bil LPS v koncentraciji 400 ng/ml. Prav tako nas je zanimalo, če cikorna kislina in ekstrakt (izbrali smo ekstrakt poletne žetve) znižajo učinek tvorbe vnetnih citokinov, ki ga povzroči LPS.

V raziskavi smo preverjali aktivacijo celic THP-1 s standardnimi pripravki in ekstrakti škrlatnega ameriškega slamnika za tvorbo citokinov IL-8, IL1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  in IL-12p70. Zbrali smo supernatante celične kulture, ki je bila predhodno stimulirana s standardnimi pripravki in ekstrakti pri različnih koncentracijah. S pomočjo pretočnega citometra smo določili koncentracije posameznih citokinov.

Za vsak vzorec smo naredili 3 ponovitve. Rezultate smo med seboj primerjali z LSD testom (anova analiza variance). Preverjali smo ničelno hipotezo, ki s 95 % verjetnostjo predpostavlja, da med vzorci ni statistično značilnih razlik. Razlike smo imeli za statistično značilne, če je bila vrednost p manjša od 0,05. Za rezultate smo izračunali tudi povprečne vrednosti in standardne odklone (SD).

#### 4.1 UČINKI PRIPRAVKOV NA PRODUKCIJO TNF- $\alpha$

Preglednica 3: Produkcija TNF- $\alpha$  (v pg/ml), ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A (glej metode). Prikazane so povprečne vrednosti produkcije TNF- $\alpha$  s standardnimi odkloni (n = 3).

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
<b>RPMI</b>	37,3 $\pm$ 8,2
<b>LPS</b>	<b>109,2 <math>\pm</math> 33,3 <math>\uparrow</math></b>
<b>CIK</b>	20,8 $\pm$ 7,9
<b>CIK + E</b>	16,8 $\pm$ 0,6
<b>CIK+E+K</b>	6,6 $\pm$ 2,5
<b>EKST 1</b>	59,7 $\pm$ 25,9
<b>EKST 2</b>	21,4 $\pm$ 3,4
<b>EKST 3</b>	5,4 $\pm$ 3,0
<b>CIK+LPS</b>	17,1 $\pm$ 5,7

Statistično značilne razlike (p < 0,05) v primerjavi z negativno kontrolo (RPMI) so napisane s poudarjenimi številkami.

- $\uparrow$  statistično značilno večja vrednost

Preglednica 3 nam prikazuje povprečne vrednosti produkcije citokina TNF- $\alpha$  pri dodanih različnih standardnih pripravkih in ekstraktih. Standardni pripravki so bili celicam dodani v koncentraciji 2  $\mu$ g/ml, ekstrakti v koncentraciji 20  $\mu$ g/ml. Povprečne vrednosti produkcije TNF- $\alpha$  se v preglednici 2 gibljejo od najnižje vrednosti 6,6 pg/ml pri vzorcu cikorna kislina z ehinakoamidom in kaftarno kislino do najvišje vrednosti pri pozitivni kontroli (LPS), 109,2 pg/ml. Iz rezultatov v preglednici 3 vidimo, da LPS, ki je pozitivna kontrola statistično značilno poveča produkcijo TNF- $\alpha$  v primerjavi z negativno kontrolo (RPMI). Pri ostalih standardnih pripravkih in ekstraktih pri koncentraciji A ne zasledimo statistično značilnega povečanja produkcije v primerjavi z RPMI.

Preglednica 4: Statistično značilne razlike produkcije TNF- $\alpha$  (pg/ml) med posameznimi vzorci, ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A.

Vzorci, ki jih primerjamo	CIK	CIK+E
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	20,8 $\pm$ 7,9	16,8 $\pm$ 0,6
Vzorci, ki jih primerjamo	CIK; CIK+E	CIK+E+K
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	<b>20,8 <math>\pm</math> 7,9; 16,8 <math>\pm</math> 0,6 <math>\uparrow</math></b>	6,6 $\pm$ 2,5
Vzorci, ki jih primerjamo	EKST 1	EKST 2
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	<b>59,7 <math>\pm</math> 25,9 <math>\uparrow</math></b>	21,4 $\pm$ 3,4
Vzorci, ki jih primerjamo	EKST 1; EKST 2	EKST 3
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	<b>59,7 <math>\pm</math> 25,9; 21,4 <math>\pm</math> 3,4 <math>\uparrow</math></b>	5,4 $\pm$ 3,0
Vzorci, ki jih primerjamo	LPS	CIK+LPS
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	<b>109,2 <math>\pm</math> 33,3 <math>\uparrow</math></b>	17,1 $\pm$ 5,7

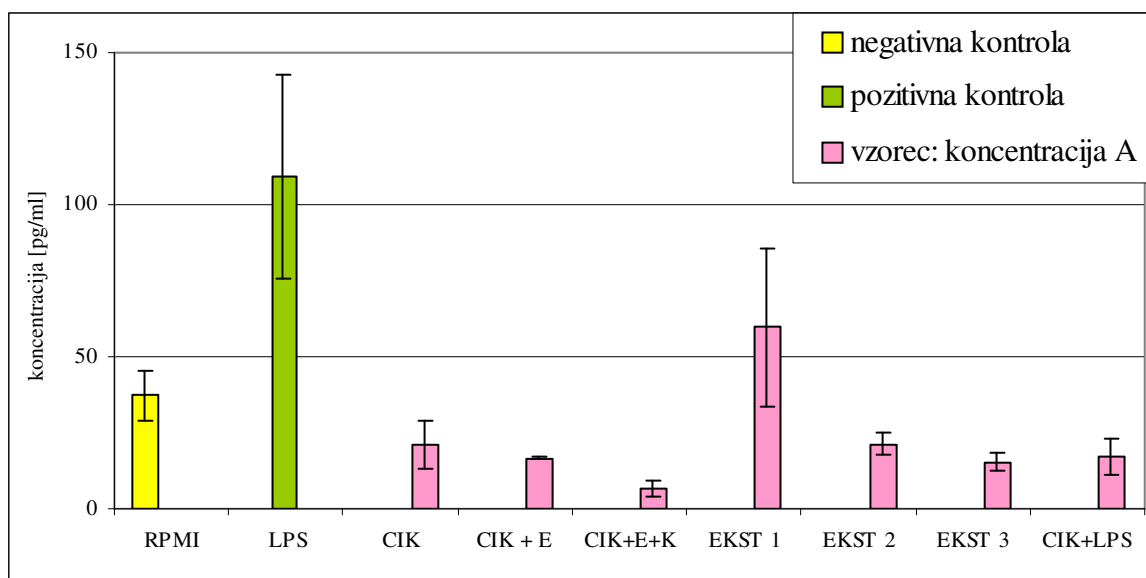
Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so napisane s poudarjenimi številkami

- $\uparrow$  statistično značilno večja vrednost

Pri primerjavi vzorca cikorna kislina in cikorna kislina z ehinakoizidom v preglednici 4 vidimo, da ni statistično značilnih razlik. Vzorec cikorna kislina z ehinakoizidom in kaftarno kislino kaže statistično značilno nižjo produkcijo TNF- $\alpha$  od vzorcev cikorna kislina in cikorna kislina z ehinakoizidom.

Iz preglednice 4 tudi vidimo, da je produkcija TNF- $\alpha$  pri ekstraktu 1 (poletna žetev) statistično značilno višja kot pri ekstraktu 2 (jesenska žetev).

Cikorna kislina pri koncentraciji 2,0  $\mu\text{g/ml}$  v kombinaciji z LPS statistično značilno znižuje učinek delovanja LPS.



Slika 13: Povprečna produkcija TNF- $\alpha$ , ki jo izzovejo različni pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A. Za vsako povprečno vrednost so prikazani standardni odkloni.

Preglednica 5: Produkcija TNF- $\alpha$  (v pg/ml), ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B (glej metode). Prikazane so povprečne vrednosti produkcije TNF- $\alpha$  s standardnimi odkloni (n = 3).

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
<b>RPMI</b>	37,3 $\pm$ 8,2
<b>LPS</b>	<b>109,2 <math>\pm</math> 33,3 <math>\uparrow</math></b>
<b>CIK</b>	22,0 $\pm$ 5,1
<b>CIK + E</b>	20,0 $\pm$ 3,0
<b>CIK+E+K</b>	20,7 $\pm$ 4,3
<b>EKST 1</b>	<b>51,5 <math>\pm</math> 1,0 <math>\uparrow</math></b>
<b>EKST 2</b>	25,6 $\pm$ 5,3
<b>EKST 3</b>	14,6 $\pm$ 1,7
<b>EKST 1+LPS</b>	21,9 $\pm$ 4,1

Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v primerjavi z RPMI so napisane s poudarjenimi številkami.

- $\uparrow$  statistično značilno večja vrednost

Preglednica 5 nam prikazuje tvorbo TNF- $\alpha$  pri višji koncentraciji (koncentraciji B). Standardni pripravki (cikorna kislina, ehinakoamid in kaftarna kislina) so bili v vzorcih dodani v koncentraciji 20  $\mu$ g/ml. Ekstrakte smo v vzorce dodali v koncentraciji 200  $\mu$ g/ml.

Iz preglednice 5 vidimo, da le stimulacija z LPS (pozitivna kontrola) in ekstraktom 1 kaže statistično značilno povečanje produkcije citokina.

Preglednica 6: Statistično značilne razlike produkcije TNF- $\alpha$  (pg/ml) med posameznimi vzorci, ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B.

Vzorci, ki jih primerjamo	CIK	CIK+E
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	20,8 $\pm$ 7,9	22,0 $\pm$ 3,0
Vzorci, ki jih primerjamo	CIK; CIK+E	CIK+E+K
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	20,8 $\pm$ 7,9; 22,0 $\pm$ 5,1	20,7 $\pm$ 4,3
Vzorci, ki jih primerjamo	EKST 1	EKST 2
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	<b>51,5 <math>\pm</math> 1,0 <math>\uparrow</math></b>	25,6 $\pm$ 5,3
Vzorci, ki jih primerjamo	EKST 1; EKST 2	EKST 3
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	<b>51,5 <math>\pm</math> 1,0; 25,6 <math>\pm</math> 5,3 <math>\uparrow</math></b>	14,6 $\pm$ 1,7
Vzorci, ki jih primerjamo	LPS	EKST 1+LPS
Koncentracija TNF- $\alpha$ [pg/ml]	<b>109,2 <math>\pm</math> 33,3 <math>\uparrow</math></b>	21,9 $\pm$ 4,1

Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so napisane s poudarjenimi številkami

- $\uparrow$  statistično značilno večja vrednost

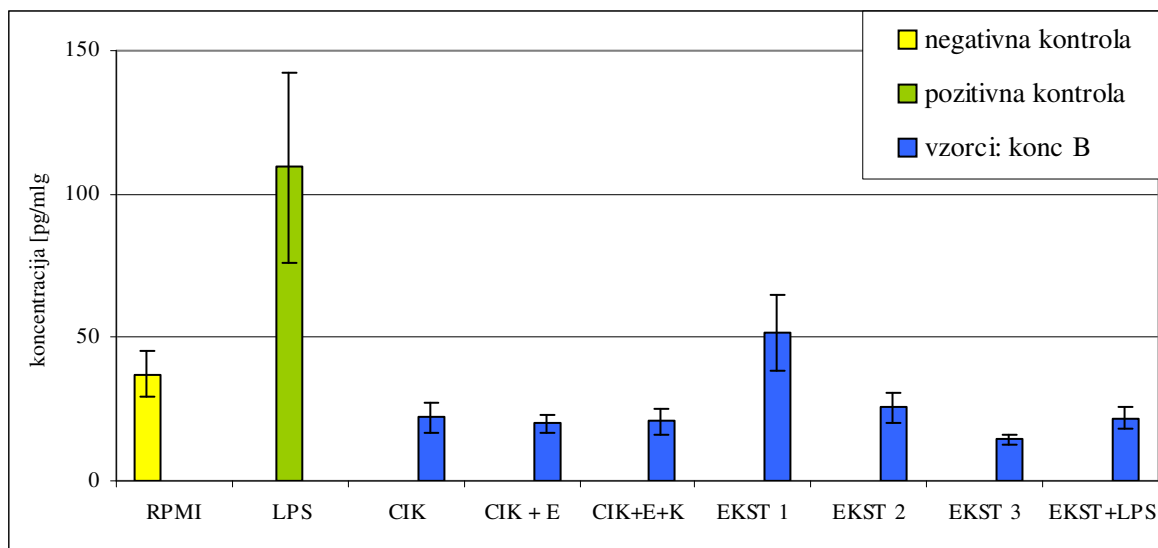
V preglednici 6 imamo prikazane statistično značilne razlike med posameznimi vzorci. Vidimo, da tudi pri koncentraciji B ni statistično značilnih razlik med cikorno kislino in cikorno kislino z ehinakoizidom.

Pri koncentraciji B (za razliko od koncentracije A) ne dobimo statistično značilne nižje produkcije TNF- $\alpha$  pri vzorcu cikorna kislina z ehinakoizidom in kaftarno kislino od cikorne kisline in cikorne kisline z ehinakoizidom.

Pri ekstraktu 1 vidimo že iz preglednice 5, da gre za statistično značilno povečanje produkcije TNF- $\alpha$ . Preglednica 6 nam prikazuje, da gre tudi (kot pri koncentraciji A) za statistično značilno povečanje produkcije TNF- $\alpha$  tudi v primerjavi z ekstraktom 2.

Ekstrakt 3 spet kaže nižjo stimulacijo tvorbe citokina od ostalih dveh ekstraktov.

Koncentracija TNF- $\alpha$  je statistično značilno nižja pri vzorcu LPS z ekstraktom 1 od samega LPS.



Slika 14: Povprečna produkcija TNF- $\alpha$ , ki jo izzovejo različni pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B. Za vsako povprečno vrednost produkcije so prikazani standardni odkloni.

#### 4.1.1 Primerjava tvorbe TNF- $\alpha$ med koncentracijama A in B

Preglednica 7: Statistično značilne razlike produkcije TNF- $\alpha$  (pg/ml) med koncentracijama A in B.

	KONC A	KONC B
CIK	20,8 $\pm$ 7,9	22,0 $\pm$ 5,1
CIK + E	16,8 $\pm$ 0,6	22,0 $\pm$ 3,0
CIK+E+K	6,6 $\pm$ 2,5	<b>20,7 <math>\pm</math> 4,3 <math>\uparrow</math></b>
EKST 1	59,7 $\pm$ 25,9	51,5 $\pm$ 1,0
EKST 2	21,4 $\pm$ 3,4	25,6 $\pm$ 5,3
EKST 3	5,4 $\pm$ 3,0	<b>14,6 <math>\pm</math> 1,7 <math>\uparrow</math></b>

Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v primerjavi z negativno kontrolo (RPMI) so napisane s poudarjenimi številkami.

- $\uparrow$  statistično značilno večja vrednost

Iz preglednice 7 vidimo, da so samo pri dveh učinkovinah statistično značilna povečanja tvorbe TNF- $\alpha$  pri višji koncentraciji.

## 4.2 UČINKI PRIPRAVKOV NA PRODUKCIJO IL-8

Preglednica 8: Produkcija IL-8 (v pg/ml), ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A (glej metode). Prikazane so povprečne vrednosti produkcije IL-8 s standardnimi odkloni (n = 3).

	<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>
<b>RPMI</b>	11932,8 $\pm$ 1179,6
<b>LPS</b>	<b>37348,4 <math>\pm</math> 2684,1 <math>\uparrow</math></b>
<b>CIK</b>	13814,5 $\pm$ 8,0
<b>CIK + E</b>	10711,3 $\pm$ 537,5
<b>CIK+E+K</b>	10459,84 $\pm$ 217,3
<b>EKST 1</b>	14875,6 $\pm$ 2598,3
<b>EKST 2</b>	12768,7 $\pm$ 1213,5
<b>EKST 3</b>	12829,0 $\pm$ 1623,3
<b>CIK+LPS</b>	8514,8 $\pm$ 5,7

Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) v primerjavi z negativno kontrolo (RPMI) so napisane s poudarjenimi številkami.

- $\uparrow$  statistično značilno večja vrednost

Preglednica 8 nam prikazuje povprečne vrednosti produkcije citokina IL-8 pri dodanih pripravkih škrlatnega ameriškega slamnika. Pripravki so bili celicam dodani v koncentraciji A, kar pomeni standardni pripravki v koncentraciji 2  $\mu$ g/ml, ekstrakti pa v koncentraciji 20  $\mu$ g/ml. Povprečne vrednosti produkcije IL-8 se v preglednici 8 gibljejo od najnižje vrednosti 8514 pg/ml pri vzorcu cikorna kislina z LPS-om do najvišje vrednosti pri pozitivni kontroli (LPS) 37348 pg/ml. Preglednica 8 kaže, da le LPS statistično značilno poveča produkcijo IL-8 v primerjavi z RPMI. Pri ostalih standardni pripravkih in ekstraktih pri koncentraciji A ne zasledimo statistično značilnega povečanja produkcije v primerjavi z RPMI.

Preglednica 9: Statistično značilne razlike tvorbe IL-8 (pg/ml) med posameznimi vzorci, ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A.

Vzorci, ki jih primerjamo	CIK	CIK+E
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	<b>13814,5 ± 8,0 ↑</b>	10711,3 ± 537,5
Vzorci, ki jih primerjamo	CIK; CIK+E	CIK+E+K
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	<b>13814,5 ± 8,0 ↑</b> ; 10711,3 ± 537,5	10459,84 ± 217,3
Vzorci, ki jih primerjamo	EKST 1	EKST 2
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	14875,6 ± 2598,3	12768,7 ± 1213,5
Vzorci, ki jih primerjamo	EKST 1; EKST 2	EKST 3
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	14875,6 ± 2598,3; 12768,7 ± 1213,5	12829,0 ± 1623,3
Vzorci, ki jih primerjamo	LPS	CIK+LPS
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	<b>37348,4 ± 2684,1 ↑</b>	8514,8 ± 5,7

Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so napisane s poudarjenimi številkami

-↑ statistično značilno večja vrednost

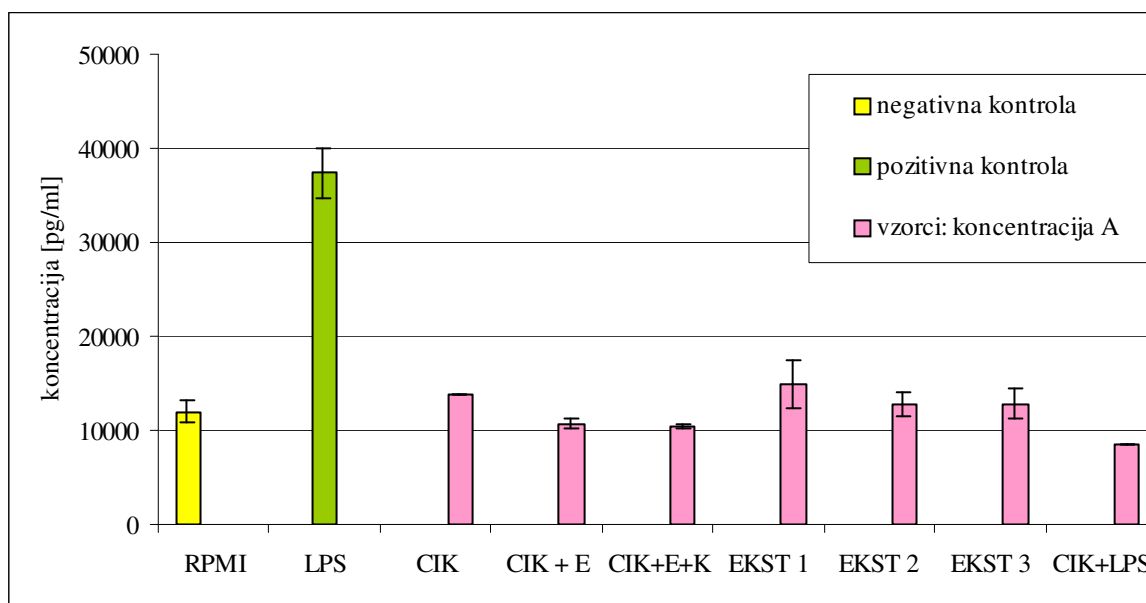
Pri primerjavi vzorcev cikorne kisline in cikorne kisline z ehinakoizidom v preglednici 9 vidimo, da je tvorba IL-8 pri stimulaciji s cikorno kislino statistično značilno večja od vzorca cikorna kislina z ehinakoizidom.

Prav tako kaže stimulacija s cikorno kislino statistično značilno povečanje produkcije citokina v primerjavi s stimulacijo cikorna kislina z ehinakoizidom in kaftarno kislino.

V preglednici 9 ni statistično značilnega povečanja produkcije IL-8 pri ekstraktu 1 v primerjavi z ekstraktom 2.

Cikorna kislina pri koncentraciji 2 µg/ml v kombinaciji z LPS statistično značilno zniža učinek delovanja LPS.





Slika 15: Povprečna produkcija IL-8, ki jo izzovejo različni pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A. Za vsako povprečno vrednost produkcije so prikazani standardni odkloni.

Preglednica 10: Produkcija IL-8 (v pg/ml), ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B (glej metode). Prikazane so povprečne vrednosti IL-8 (pg/ml) s standardnimi odkloni (n = 3).

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
<b>RPMI</b>	11932,8 $\pm$ 1179,6
<b>LPS</b>	<b>37348,4 <math>\pm</math> 2684,1 <math>\uparrow</math></b>
<b>CIK</b>	12269,8 $\pm$ 5,1
<b>CIK + E</b>	9124,1 $\pm$ 355,0
<b>CIK+E+K</b>	13878,6 $\pm$ 219,9
<b>EKST 1</b>	<b>16952,8 <math>\pm</math> 918,4 <math>\uparrow</math></b>
<b>EKST 2</b>	12723,2 $\pm$ 940,9
<b>EKST 3</b>	11869,3 $\pm$ 1423,7
<b>EKST 1+LPS</b>	9205,9 $\pm$ 1002,2

Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so v preglednici napisane kot poudarjene številke.

- $\uparrow$  statistično značilno večja vrednost

V preglednici 10 imamo povprečne vrednosti produkcije IL-8 pri dodanih različnih standardnih pripravkih in ekstraktih. Standardni pripravki so bili celicam dodani v koncentraciji 20  $\mu$ g/ml, ekstrakti v koncentraciji 200  $\mu$ g/ml. Povprečne vrednosti produkcije IL-8 se v preglednici 10 gibljejo od najnižje vrednosti 9205 pg/ml pri vzorcu

ekstrakt 1 z LPS, do najvišje vrednosti pri pozitivni kontroli (LPS) 37348 pg/ml. Iz rezultatov v preglednici 10 vidimo, da LPS, ki je pozitivna kontrola statistično značilno poveča tvorbo IL-8 v primerjavi z negativno kontrolo (RPMI). Prav tako pa statistično značilno poveča produkcijo ekstrakt 1, kar smo ugotovili tudi pri tvorbi TNF- $\alpha$  pri obeh koncentracijah. Pri ostalih standardnih pripravkih in ekstraktih pri koncentraciji B ni statistično značilnega zvišanja produkcije v primerjavi z RPMI.

Preglednica 11: Statistično značilne razlike tvorbe IL-8 (pg/ml) med posameznimi vzorci, ki jo izzovejo pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji B.

Vzorci, ki jih primerjamo	CIK	CIK+E
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	<b>12269,8 ± 5,1 ↑</b>	9124,1 ± 355,0
Vzorci, ki jih primerjamo	CIK; CIK+E	CIK+E+K
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	12269,8 ± 5,1; 9124,1 ± 355,0	<b>13878,6 ± 219,9 ↑</b>
Vzorci, ki jih primerjamo	EKST 1	EKST 2
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	<b>16952,8 ± 918,4 ↑</b>	12723,2 ± 940,9
Vzorci, ki jih primerjamo	EKST 1; EKST 2	EKST 3
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	<b>16952,8 ± 918,4</b> ; 12723,2 ± 940,9	11869,3 ± 1423,7
Vzorci, ki jih primerjamo	LPS	EKST 1+LPS
Koncentracija IL-8 [pg/ml]	<b>37348,4 ± 2684,1 ↑</b>	9205,9 ± 1002,2

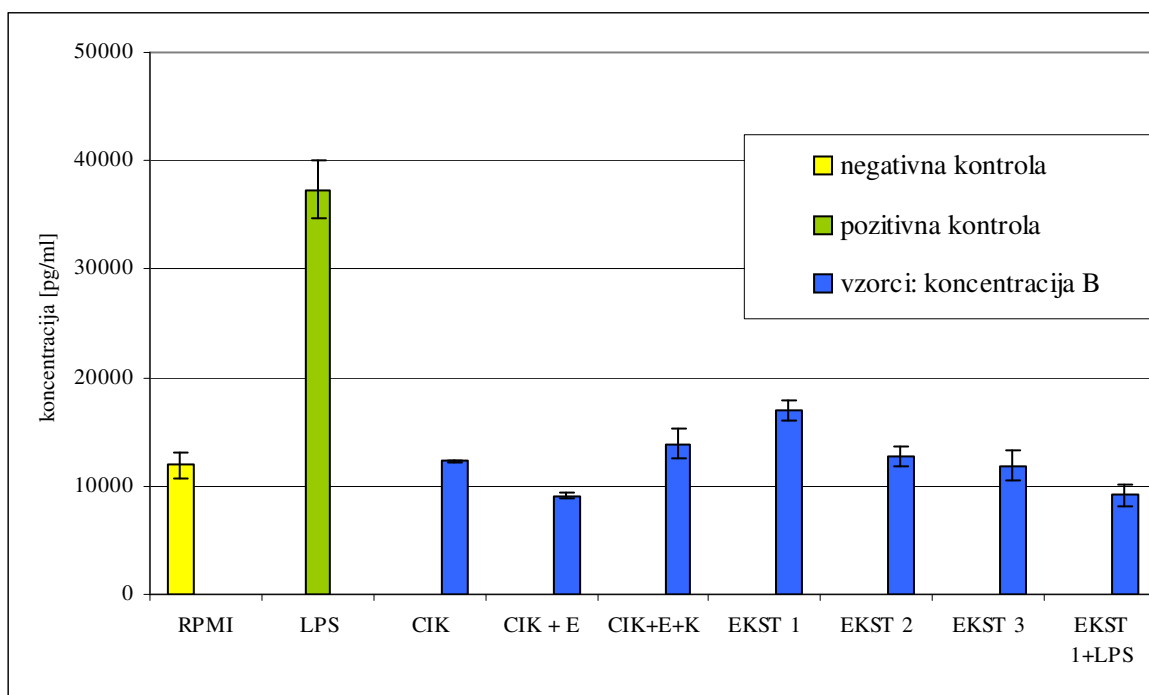
Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so napisane s poudarjenimi številkami

-↑ statistično značilno večja vrednost

Pri primerjavi vzorcev cikorne kisline in cikorne kisline z ehinakoizidom v preglednici 11 vidimo, da je produkcija IL-8 pri stimulaciji s cikorno kislino statistično značilno višja od vzorca cikorna kislina z ehinakoizidom.

Produkcija pri stimulaciji s cikorno kislino je statistično značilno nižja od stimulacije s cikorno kislino z ehinakoizidom in kaftarno kislino. V preglednici 10 je statistično značilno povečanje produkcije IL-8 pri ekstraktu 1 v primerjavi z ekstraktom 2.

Ekstrakt 1 pri koncentraciji 200 µg/ml v kombinaciji z LPS statistično značilno zniža učinek delovanja LPS.



Slika 16: Povprečna produkcija IL-8 (pg/ml), ki jo izzovejo različni pripravki škrlatnega ameriškega slamnika pri koncentraciji A. Za vsako povprečno vrednost produkcije so prikazani standardni odkloni.

#### 4.2.1 Primerjava produkcije IL-8 med koncentracijama A in B

Preglednica 12: Statistično značilne razlike produkcije IL-8 (pg/ml) med koncentracijama A in B.

	KONC A	KONC B
<b>CIK</b>	13814,5 ± 8,0	12269,8 ± 5,1
<b>CIK + E</b>	10711,3 ± 537,5	9124,1 ± 355,0
<b>CIK+E+K</b>	10459,84 ± 217,3	13878,6 ± 219,9
<b>EKST 1</b>	14875,6 ± 2598,3	16952,8 ± 918,4
<b>EKST 2</b>	12768,7 ± 1213,5	12723,2 ± 940,9
<b>EKST 3</b>	12829,0 ± 1623,3	11869,3 ± 1423,7

Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so napisane s poudarjenimi številkami

Iz preglednice 12 vidimo, da med koncentracijama A in B pri produkciji IL-8 pri nobenem vzorcu, ni statistično značilnih razlik.

#### 4.3 UČINKI PRIPRAVKOV NA PRODUKCIJO IL-1, IL-6, IL-10 IN IL-12P70

Svetilnosti vseh teh citokinov so bile pri vseh vzorcih pod vrednostmi umeritvene krivulje.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Uvod

Raziskave *in vivo* in *in vitro* so pokazale, da ameriški slamnik in iz njega izolirane posamezne komponente vplivajo na mnoge fiziološke procese preko spodbujanja nespecifičnega imunskega odziva. Vplivajo na fagocitno aktivnost makrofagov in njihovo produkcijo IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 in IL-10. Spodbujajo tudi delovanje celic NK in humanih mononuklearnih celic (Randolph R.K. in sod., 2003; Goel V. in sod., 2002). V raziskavi smo ugotavljali kako vplivajo različni pripravki na produkcijo citokinov *in vitro* in kako je njihova produkcija odvisna od koncentracije pripravkov škrlatnega ameriškega slamnika.

#### 5.1.2 Analiza spodbujanja IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6 in IL-12

V naših vzorcih nismo zaznali prisotnosti IL-1 $\beta$ . Prav tako nismo zaznali prisotnosti nobenega od protivnetnih citokinov (IL-12, IL-6 in IL-10). Hwang S-A. in sodelavci so leta 2004 raziskovali produkcijo citokinov na splenocitih. Pri tem so uporabili tiste mišje splenocite, ki so se pritrčili na polistirenske plošče, to so bili večinoma makrofagi. Celice so stimulirali z ekstrakti (tekoči, vodni in alkoholni) v koncentraciji 1 mg/ml, čas inkubacije je bil 48 ur. Niso opazili produkcije IL-1 $\beta$  in IL-12. Tudi Rininger in sodelavci so leta 2000 ugotovili, da je bila produkcija IL-1 $\beta$  zelo nizka in največja po 48 urah (14 pg/ml). Prav tako je bilo najmočnejše sproščanje IL-6 (234 pg/ml) po 48 urah.

Rezultati iz drugih raziskav kažejo, da se velika produkcija IL- $\beta$  zgodi prej in sicer po 18 urah (Burger R.A. in sod., 1997). To pomeni, da je bil naš čas inkubacije 24 ur za IL-1 $\beta$  dokaj ustrezen, vendar rezultati ne kažejo produkcije tega citokina. Razlaga za to je lahko, da je šlo za zelo nizko produkcijo, za katero naša metoda merjenja ni dovolj občutljiva. Proizvajalec BD CBA sistema reagentov navaja, da je metoda za merjenje IL-1 $\beta$  manj občutljiva kot za ostale citokine in da gre za napako 20 pg/ml. Vsekakor bi na podlagi drugih študij lahko rekli, da če produkcija IL-1 $\beta$  po 24 urah sploh je, je zelo nizka.

Svetilnost za IL-10 v naših vzorcih ni bila v razponu umeritvene krivulje, kar pomeni, da je bila koncentracija IL-10 pod 20 µg/ml. Rininger in sodelavci so leta 2000 ugotavljali produkcijo IL-10 *in vitro*. Ugotovili so, da je bila najmočnejša produkcija IL-10 po 24 urah (80 pg/ml), pozneje je upadla. Rezultatov ne moremo primerjati z našimi, čeprav je šlo za enak čas inkubacije. Ekstrakti, ki so jih uporabili Rininger in sodelavci so bili pripravljene z drugačnim postopkom (s pomočjo simulirane prebave), merjenje pa so izvedli z metodo ELISA. Burger R.A. in sodelavci so leta 1997 celice za produkcijo IL-10 stimulirali 36 ur in ugotovili, da je produkcija IL-10 pri ekstraktih pripravljenih iz svežih rastlin nižja od tistih pripravljenih iz suhih. Razlog, da mi v naši raziskavi nismo izmerili produkcije IL-10 je verjetno prekratek čas inkubacije, morda pa tudi uporaba svežih ekstraktov, ki manj stimulirajo produkcijo citokinov.

Produkcija IL-6 je bila največja pri dodani najvišji koncentraciji ekstraktov škrlatnega ameriškega slamnika po 36 urah (Burger R.A. in sod., 1997). Naš čas inkubacije je bil le 24 ur, kar je lahko razlog, da nismo zaznali IL-6 v supernatantih. Tudi produkcije IL-12p70 pri naših meritvah ni bilo, prav tako je niso izmerili v nobeni od objavljenih raziskav.

### **5.1.3 Analiza spodbujanja TNF- $\alpha$**

Burger R.A. in sodelavci so leta 1997 preizkušali produkcijo citokinov *in vitro* na perifernih humanih makrofagih. Citokine so merili z metodo ELISA. Vzeli so ekstrakte škrlatnega ameriškega slamnika v koncentracijah od 0,05 µg/ml do 10 µg/ml iz svežih in suhih rastlin v času cvetenja. Produkcija TNF- $\alpha$ , ki so jo merili po 36 urah, je bila pri humanih makrofagih *in vitro* v vseh koncentracijah razen pri 10 µg/ml dodanega ekstrakta višja od negativne kontrole (CM: RPMI-1640 z dodanim 10 % FBS in 0,1 % gentamicinom). Naraščala je s koncentracijo dodanega ekstrakta. Koncentracije izmerjenih citokinov so bile nenavadno visoke, saj so v rangu µg/ml in ne v pg/ml kot v drugih objavah.

Rininger J.A. in sodelavci so leta 2000 raziskovali produkcijo TNF- $\alpha$  s stimulacijo makrofagne celične linije RAW 264.7 z ekstrakti škrlatnega ameriškega slamnika

pripravljenimi s postopkom simulirane prebave. Merjenje citokinov so izvedli z ELISA metodo. Ugotovili so, da se je zaradi vpliva ekstraktov produkcija citokinov v primerjavi z negativno kontrolo povečala. Produkcija je bila odvisna od doze, kar pomeni da je bila najmanjša pri dodanih ekstraktih v koncentraciji 20 µg/ml, največja pri 320 µg/ml. Najmočnejše sproščanje TNF-α je bilo po 30 urah in sicer več kot 4000 pg /ml, pri 48 urah je produkcija TNF-α močno upadla.

Haza A.I. in sodelavci so leta 2003 ugotavljali vpliv *Lactobacillus plantarum* na produkcijo citokinov (IL-1β, IL-8 in TNF-α) pri celicah THP-1. Kot pozitivno kontrolo so uporabili LPS v enaki koncentraciji kot mi, 400 ng/ml. Povprečna produkcija TNF-α je bila zaradi učinka LPS v njihovi raziskavi 400 pg/ml TNF-α. V naši raziskavi je bila produkcija le 109 pg/ml. Nižjo produkcijo pri nas bi lahko spet pripisali krajši inkubaciji, saj so Haza A.I. in sodelavci stimulirali celice 48 ur. Tudi primerjava stimulacije z *Lactobacillus plantarum* je vodila v veliko večjo produkcijo TNF-α kot pri nas s pripravki škrlatnega ameriškega slamnika.

Iz naših rezultatov vidimo, da je povprečna produkcija TNF-α pri vseh vzorcih razen pri ekstraktu 1 (pri koncentraciji B) nižja od negativne kontrole. Nekateri večjo produkcijo pri kontroli pripisujejo serumu (10 % FBS), ki smo ga dodali mediju za gojenje celic. Produkcija pri ekstraktu 1 je pri obeh koncentracijah statistično značilno višja od ekstrakta 2 iz česar lahko sklepamo, da ekstrakt poletne žetve bolj stimulira celice za produkcijo TNF-α kot ekstrakt jesenske žetve. Kim H-O. in sodelavci so leta 2000 ugotovili, da vsebujejo ekstrakti poletne žetve več cikorne kisline kot jesenske.

Cikorna kislina v naših vzorcih ne deluje imunostimulatorno v primerjavi z RPMI, kar je v nasprotju z drugimi objavami. Možna razlaga za to je, da je bila vsebnost cikorne kisline v dodanih raztopinah zmanjšana, saj je cikorna kislina zelo občutljiva na razpad v postopkih shranjevanja. Med vzorcem s cikorno kislino in cikorno kislino z ehinakoizidom pri nobeni koncentraciji ni bilo statistično značilnih razlik, zato izključimo možnost, da ehinakoizid zmanjša produkcijo TNF-α oziroma deluje protivnetno. Kaftarna kislina ne spodbuja produkcije TNF-α, lahko bi rekli, da je njen učinek obraten. Vzorec cikorna kislina z

ehinakozyd in kaftarno kislino kaže pri koncentraciji A statistično značilno nižjo produkcijo TNF- $\alpha$  od vzorcev cikorne kisline in cikorne kisline z ehinakozyd, kar kaže na inhibitoren učinek kaftarne kisline.

Tudi rezultati pri ekstraktu 3 (Immunal) nimajo stimulatornega učinka na produkcijo TNF- $\alpha$ , saj imajo celo pri obeh koncentracijah (200  $\mu\text{g/ml}$  in 20  $\mu\text{g/ml}$ ) statistično značilno nižjo produkcijo od ekstrakta 1 in 2.

Raziskave *in vivo*, ki so jih naredili Goel V. in sodelavci leta 2002 na alveolarnih makrofagih pri podganah kažejo, da ekstrakti ameriškega slamnika z naraščajočimi koncentracijami vodijo v večjo produkcijo TNF- $\alpha$ . Vendar pa so ugotovili tudi, da je pri najvišji koncentraciji prišlo do nekoliko nižje produkcije TNF- $\alpha$ . Sklepajo, da je produkcijo verjetno inhibiral NO (dušikov oksid), ki je pri tej koncentraciji ekstraktov močno narasel.

Hwang S-A. in sodelavci so leta 2004 makrofage stimulirali z ekstrakti (tekoči, vodni in alkoholni) v koncentraciji 1 mg/ml, čas inkubacije je bil 48 ur. Opazili so zelo veliko produkcijo TNF- $\alpha$  (1272 pg/ml) pri vodnih ekstraktih, produkcija alkoholnih ekstraktov je bila nižja. Tudi mi smo uporabili alkoholne ekstrakte, kar je lahko eden od vzrokov za nižjo produkcijo TNF- $\alpha$ .

Stevenson in sodelavci so leta 2005 med drugim ugotavljali kakšna je produkcija TNF- $\alpha$ , če celični liniji RAW 264.7 *in vitro* dodamo pripravke (etanolne ekstrakcije) ameriškega slamnika, ki so bili predhodno stimulirani z LPS. Za pozitivno kontrolo so izbrali LPS v koncentraciji 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , ki je statistično značilno spodbudil produkcijo TNF- $\alpha$  (150 pg/ml) v primerjavi z negativno kontrolo (30 pg/ml). Ugotovili so, da je cikorna kislina v koncentraciji 0,2  $\mu\text{g/ml}$  statistično značilno znižala produkcijo vnetnega citokina TNF- $\alpha$  v primerjavi z LPS samim. Pri 2,0  $\mu\text{g/ml}$  dodane cikorne kisline razlika produkcije TNF- $\alpha$  ni bila statistično značilna. Etanolni ekstrakti škrlatnega ameriškega slamnika so pri obeh koncentracijah (0,2  $\mu\text{g/ml}$  in 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ) statistično značilno znižali učinek LPS za produkcijo TNF- $\alpha$ . Tudi mi smo dokazali, da cikorna kislina in ekstrakt škrlatnega



ameriškega slamnika delujeta protivnetno. Cikorna kislina pri koncentraciji 2 µg/ml in ekstrakt poletne žetve pri koncentraciji 200 µg/ml statistično značilno znižata produkcijo TNF-α.

Pri primerjavi produkcije TNF-α pri nižji in višji koncentraciji smo ugotovili, da gre za statistično značilne večje vrednosti pri višji koncentraciji, le pri dveh vzorcih. To sta cikorna kislina z ehinakoamidom in kaftarno kislino ter ekstrakt 3. Vendar pa so vrednosti statistično značilno nižje od kontrole, zato jim ne pripisujemo posebne veljave.

#### **5.1.4 Analiza spodbujanja IL-8**

V literaturi ne zasledimo veliko podatkov o produkciji IL-8 s stimulacijo s pripravki ameriškega slamnika. Randolph R.K. in sodelavci so leta 2003 preučevali ekspresijo genov za posamezne citokine na celicah THP-1 pod vplivom različnih ekstraktov ameriškega slamnika. Ekspresijo genov so izmerili po šestih urah stimulacije. Ugotovili so, da je največja ekspresija pri IL-1α, nato IL-1β, sledi pa IL-8. Mi smo v naši raziskavi dobili zelo veliko produkcijo IL-8, IL-1β kot že rečeno sploh nismo zaznali. Vzrok takih rezultatov je najverjetneje že večkrat omenjeni čas stimulacije. Očitno je 24 urna stimulacija za produkcijo IL-8 optimalna. Iz naših rezultatov vidimo, da so produkcije IL-8 v primerjavi s produkcijami TNF-α zelo visoke. Statistično značilno večjo vrednost IL-8 od negativne kontrole imamo samo pri ekstraktu 1, pri višji koncentraciji. Enako smo ugotovili pri produkciji TNF-α iz česar lahko sklepamo, da bi celice morale stimulirati z višjimi koncentracijami pripravkov. Pri koncentraciji B tudi opazimo statistično značilne višje vrednosti kot pri ekstraktu 2, kar dokazuje, da ekstrakti poletne žetve bolj stimulirajo produkcijo vnetnih citokinov. Ekstrakt 3 pa pri višji koncentraciji kaže statistično nižjo stimulacijo od ostalih dveh ekstraktov.

Pri primerjavi cikorne kisline in cikorne kisline z ehinakoamidom vidimo, da pri obeh koncentracijah cikorna kislina statistično značilno zviša produkcijo IL-8 v primerjavi z ehinakoamidom, kar nakazuje na protivnetno aktivnost ehinakoamida. Kaftarna kislina nima stimulatorne vloge na produkcijo IL-8.

Ekstrakt 1 v koncentraciji 200 µg/ml in cikorna kislina v koncentraciji 2,0 µg/ml statistično značilno znižata produkcijo IL-8 zaradi učinka LPS.

### 5.1.5 Zaključek

Neposredna primerjava naših rezultatov s podatki iz literature je težavna, ker so razlike v gojenju celic (različni pogoji kultur, različni mediji gojenja celic), uporabljene so različne celične kulture in različni postopki priprave ekstraktov. Časi stimulacije s pripravki ameriškega slamnika se tudi zelo razlikujejo. Zaradi racionalne uporabe reagentov Human Inflammation Kit smo izvedli merjenje vseh šestih citokinov naenkrat, kar pomeni, da smo imeli za vse citokine enotni čas stimulacije, 24 ur. V literaturi pa se časi inkubacije za različne citokine zelo razlikujejo in so večinoma 48 ur, segajo pa do 72 ur. Citokine smo merili s pretočnim citometrom, v literaturi pa smo ponavadi zasledili merjenje z ELISA. Proizvajalec BD CBA navaja, da lahko pride pri merjenju istega vzorca s pretočno citometrijo ali z ELISA do precejšnjih razlik. Naše učinkovine so bile ekstrahirane s 70 % etanolom, kar pomeni, da smo imeli verjetno nekoliko manjšo vsebnost polisaharidov, ki so eden glavnih imunostimulatorjev v ameriškem slamniku. Za ekstrakcijo polisaharidov bi bil bolj ustrezen 50 % etanol (Goel V. in sod., 2002). Tudi ekstrakcija fenolov (cikorna kislina) je boljše pri ekstrakciji voda-metanol kot voda-etanol (Pellati F. in sod., 2003).

## 5.2 SKLEPI

- V supernatantih celične linije THP-1 nismo izmerili produkcije IL-1 $\beta$ , IL-6 in IL-10, za kar je najverjetneje kriv prekratek čas stimulacije.
- Samo ekstrakt 1 (poletne žetve) pri koncentraciji 200 µg/ml statistično značilno poveča produkcijo TNF- $\alpha$  in IL-8 v primerjavi z negativno kontrolo.
- Vsi ostali pripravki razen ekstrakta 1 ne stimulirajo produkcije citokinov IL-8 in TNF- $\alpha$  v primerjavi z negativno kontrolo (RPMI).
- Ekstrakti poletne žetve bolj stimulirajo produkcijo citokinov TNF- $\alpha$  in IL-8 kot ekstrakti jesenske žetve.

- Ekstrakt 3 (Immunal) statistično značilno zniža produkcijo TNF- $\alpha$  in IL-8.
- Ehinakozid nima imunostimulatorne vloge, vendar statistično značilno zniža produkcijo vnetnega citokina IL-8, kar nakazuje na njegovo protivnetno aktivnost.
- Cikorna kislina in ekstrakt poletne žetve sta znižala produkcijo vnetnih citokinov TNF- $\alpha$  in IL-8 zaradi učinka LPS.

## 6 POVZETEK

Ameriški slamnik (*Echinacea*) predstavlja eno najbolj splošnih tradicionalnih ameriških rastlinskih zdravil, ki deluje kot imunostimulant pri prehladu in gripi. V mnogih *in vitro* študijah je bilo ugotovljeno, da učinkovine ameriškega slamnika spodbujajo fagocitno aktivnost makrofagov, porast izločanja različnih citokinov iz njih in pospešujejo delovanje celic NK. Najpomembnejša izmed vrst ameriških slamnikov v medicini je škrlatni ameriški slamnik (*Echinacea purpurea*).

Namen naše je raziskave je bil pokazati, da pripravki ameriškega slamnika vplivajo na porast produkcije citokinov *in vitro* in da je produkcija odvisna od doze.

Za raziskave smo uporabili celično linijo humane akutne monocitne levkemije (THP-1), merjenje citokinov smo izvedli s pretočno citometrijo.

Preizkušali smo vpliv različnih standardov (kaftarne kisline, ehinakozida, cikorne kisline) in njihovih kombinacij ter ekstraktov škrlatnega ameriškega slamnika, ki so bili plod jesenske ali poletne žetve.

V supernatantih celične linije THP-1 smo zasledili samo produkcijo IL-8 in TNF- $\alpha$ , ni pa bilo produkcije IL-1 $\beta$ , IL-6 in IL-10, za kar je najverjetneje kriv prekratek čas stimulacije. Ekstrakt 1 (poletne žetve) pri koncentraciji 200  $\mu\text{g/ml}$  statistično značilno zviša produkcijo TNF- $\alpha$  in IL-8 v primerjavi z negativno kontrolo (RPMI). Vsi ostali pripravki ne stimulirajo produkcije citokinov IL-8 in TNF- $\alpha$  v primerjavi z negativno kontrolo.

Ekstrakti poletne žetve bi naj vsebovali večje koncentracije imunostimulatornih učinkovin. Uspeli smo dokazati, da posledično tudi ekstrakti poletne žetve bolj stimulirajo produkcijo citokinov TNF- $\alpha$  in IL-8.

Kaftarna kislina pri dodanih koncentracijah nima vloge stimulacije produkcije citokinov. Ehinakozid zmanjša produkcijo IL-8, nima pa vpliva na produkcijo TNF- $\alpha$ .

Cikorna kislina in ekstrakt poletne žetve sta znižala produkcijo vnetnih citokinov (TNF- $\alpha$  in IL-8) zaradi učinka LPS.

## 7 VIRI

- Barrett B. 2003. Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review. *Phytomedicine*, 10: 66-86.
- Bauer R., Wagner H. 1988. *Echinacea* – Nachweiss einer Verfälschung. *Deutsche Apothker Zeitung*, 127: 1325-1330
- Bauer R., Remiger P., Jurcic K., Wagner H. 1989. Beeinflussung der Phagozytose – Aktivität durch *Echinacea* – Extrakte. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 10: 43-48
- Briskin D.P. 2000. Medicinal plant and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology*, 124: 507-514
- Brovelli E.A., Rua D., Roh-Schmidt H., Chandra A., Lamont E., Noratto D.G. 2005. Human gene expression as a toll to determine horticultural maturity in a bioactive plant (*Echinacea purpurea* L. Moench). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 8156-8161
- Burger R.A., Torres A.R., Warren R.P., Caldwell V.D., Hughes B.G. 1997. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. *International Journal Immunopharmac.* Vol.19, 7: 371-379
- Chicca A., Adinolfi B., Martinotti E., Fogli S., Breschi M.C., Pellati F., Benvenuti S., Nieri P. 2001. Cytotoxic effects of Echinacea root hexanic extracts on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 148-153
- Cook. E.B, Stahl. J.L., Lowe. L., Chen R., Morgan E., Wilson J., Varro R., Chan A., Graziano F.M., Barney N.P. 2001. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *Journal of immunological methods*, 254: 109-118
- Dalby-Brown L., Barsett H., Landbo A.N.R., Meyer A.S., Molgard P. Synergistic antioxidative effects of alkilamides, caffeic acid, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on in vitro oxidation of human low density lipoproteins. 2005. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 9431-9432
- Dalton pharma services. 2008. [http://www.dalton.com/caftaric\\_acid.htm](http://www.dalton.com/caftaric_acid.htm) (22. jan.2008)

- Goel V., Chang C., Slama J.V., Barton R., Bauer R., Gahler R., Basu T.K. 2002. Echinacea stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 487-492
- Gosar B. Gospodarnost tehnik pridelovanja ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* Moench). Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 46 str.
- Gubina M., Ihan A. 2002. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana, Medicinski razgledi: 542 str.
- Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. 2000. *Kuby immunology*. Fourth edition. Library of Congress, 670 str.
- Harrison L.M., Van Haaften W.C.E., Tesh V.L. 2004. Regulation of proinflammatory cytokine expression by shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in the human monocytic cell line THP-1. *Infection and immunity*, Vol 72, No 5: 2618:2627
- Haza I.A., Zabala A., Morales P. 2003. Protective effect and cytokine production of a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from ewe milk cheese. *International Dairy Journal*, 14: 29-38
- Hwang S-A, Desgupta A., Actor J.K. 2004. Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to Echinacea extracts. *Clinica Chimica Acta*, 343: 1616-166
- BD™ Cytometric Bead Array, Human inflammation kit. Instruction Manual. 2006. San Diego, BD Biosciens: 30 str.
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Ljubljana, Kemomed: 64 str.
- Jager B. 2004. Določanje vsebnosti rastlinskih sekundarnih metabolitov pri zdravilnih in aromatičnih rastlinah – primer škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* L. Moench). Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 41 str.
- Kim H-O. 2000. Retention of caffeic acid derivates in dried *Echinacea purpurea*. *Journal of agriculture, food and Chemistry*, 48: 4182-4186

- Kopitar A.N. 2004. Vpliv bakterijskih antigenskih pripravkov na aktivacijo limfocitov s pomočjo gojenih dendritičnih celic. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 53 str.
- Letchamo W., Livesey J., Arnason T.J., Bergeron C., Krutilina V.S. 1999. Cichoric acid and isobutylamid content in *Echinacea purpurea* as influenced by flower developmental stages. ASHA Press, Alexandria, VA, 494-498
- Livk J. 2007. Razmerje med efektorskimi in regulatornimi odzivi limfocitov T v kulturah mononuklearnih celic zdravih ljudi. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 78 str.
- Luettig B., Steinmüller C., Gifford G.E., Wagner H., Lohman-Matthes M.-L. 1989. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. Journal of National Cancer Institute, Vol. 81, 9: 669-675
- Matthias A., Banbury L., Bone K., Leach D.N., Lehmann. 2007. Fitoterapia. Macrophages. 2008. Dalhousie University. <http://pim.medicine.dal.ca/macrom.htm> (3. sept. 2007)
- Miller S.C. Echinacea: a miracle herb against aging and cancer? Evidence *in vivo* in mice. Oxford University press, 2(3): 309-314
- Mpiga P., Mansour S., Morisset R., Beaulieu R., Ravaoarino M. 2005. Sustained Interleukin-6 and interleukin 8 expression following infection with *Chlamydia trachomatis* serovar L2 in a HeLa/THP-1 cell co-culture model. Scandinavian Journal of Immunology, 63: 199-207
- Natural resources conservation service. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=ECPU> (9. sept. 2007)
- Osawa Y., Nagaki M., Banno Y., Brenner D.A., Asano T., Nozawa Y., Moriwaki H., Nakashima S. 2002. Tumor necrosis factor alpha – induced interleukin-8 production via NF- $\kappa$ B and phosphatidylinositol 3-kinase / akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes



- Pellati F., Benvenuti S., Margo L., Melegari M., Soragni F. 2003. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 289-301
- Percival S.S. 2000. Use of *Echinacea* in medicine. *Biochemical Pharmacology*, Vol 60: 155-158
- Perry N.B., Burgess E.J., Glennie V.I.A. 2001. *Echinacea* standardization: Analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. *Journal of agriculture, food and Chemistry*.
- Pick N., Cameron S., Arad D., Av-Gay Y. 2004. Screening of compounds toxicity against human monocytic cell line-THP-1 by flow cytometry. *Biological Procedures Online*, 6 (1): 220-225
- Randolph R.K., Gellenbeck K., Stonebrook K., Brovelli E., Qian Y., Bankaitis-Davis D., Cheronis J. 2003. Regulation of Human Immune Gene Expression as Influenced by a Commercial Blended *Echinacea* Product: Preliminary Studies. *Experimental Biology and Medicine*, 228:1051-1056
- Remškar M. 2003. Vpliv nekaterih tehnoloških dejavnikov (število spravil, čas žetve, gnojenje z dušikom) na pridelek in kakovost škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 49 str.
- Rininger J.A., Kickner S., Chigurupati P., McLean A., Franck Z. 2000. Immunopharmacological activity of *Echinacea* preparation following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of leukocyte Biology*, 68: 503-510
- Roblek E., 1995. Vpliv števila žetev in gnojenja ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* L. Moench) na količino pridelka in učinkovin na laboratorijskem polju biotehniške fakultete. *Diplomska naloga*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. 50 str.
- Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Journal of leukocyte Biology*, 59: 555-561

- Speroni E., Govoni P., Guizzardi S., Renzulli C., Guerra M.C. 2002. Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. root extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 265-272
- Stevenson L.M., Matthias A., Banbury L., Penman K.G., Bone K.M. Leach D., Lehmann R.P. 2005. Modulation of macrophage immune response by *Echinacea*. *Molecules*, 10: 1279-1285.
- Stimpel M., Proksch A., Wagner H., Lohman-Matthes M.-L. 1984. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infectoin and immunity*, Vol.46, No 3: 845-849
- Stuart D.L., Willis R. B. H., 2003. Effect of drying temeperature on Alkylamide and cichoric acid concetrtrions of *Echinacea purpurea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51: 1608-1610
- Takemura H., Yamamoto H., Kunishima H., Ikejima H., Hara T, Kanemitsu K., Terakubo S., Shoji Y., Kaku M., Shimada J., 2000. Evaluation of a human monocytic cell line THP-1 model for assay of the intracellular activities of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 589-594
- Tominaga T., Suzuki M., Saeki H., Matsuno S., Tachibana T., Kudo T. 1998. Establishment of an activated macrophages cell line A-THP-1, and its properties. *Tohoku J. Exp. Med.* 186: 99-119
- Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. 1980. Establishment and characterization of a humane acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of cancer*, 26: 171-176
- Vozelj M. 2000. *Temelji Imunologije*. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 552 str.
- Wagner H., Jurcic K. 2002. Immunological studies of Revitonil a phytopharmaceutical containing *Echinacea purpurea* and *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Phytomedicine*, 9: 390-397

## ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mojemu mentorju prof. dr. Alojzu Ihanu za njegova vedno odprta vrata in spoznanje, da se kljub vsem zapletom v raziskovalnem delu ne izplača biti pesimist.

Hvala tudi prof. dr. Vladimirju Kotniku, ki mi je s svojimi predavanji vzbudil zanimanje za imunologijo in za pregled diplomskega dela.

Posebna zahvala Andreji Nataši Kopitar. Ne samo zato, ker nikoli ni rekla ne, ampak tudi za »večno dobro voljo«. Hvala za budno spremljanje dela, vse nasvete, spodbude in prijaznost tudi ob manj primernih urah.

Hvala mladi raziskovalki Biljani Hacin za najbolj prijazno in potrpežljivo uvajanje v laboratorijsko delo, koristne nasvete in spodbude.

Prof. dr. Dei Baričevič in Borutu Gosarju se zahvaljujem za pomoč pri pripravi ekstraktov in koristne nasvete.

Vsem ostalim zaposlenim v petem nadstropju Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo za pomoč, prijaznost in potrpljenje.

Prof. dr. Andreju Blejcu hvala za vse odgovore na vprašanja o statistični obdelavi podatkov.

Mojim najbližjim »sotrpinom« iz biologije (Tatjani, Maji, Danilu, Andreji in Janji) ter drugim prijateljem (Ireni, Valeriji, Tomažu, Nadii, Marku, Deji, Barbari) se zahvaljujem, da so mi v vseh teh letih polepšali marsikateri siv dan.

Hvala dragim staršem, sestri in bratu za podporo in razumevanje med študijem in nastajanjem diplomskega dela.

Hvala tudi mojemu Gregorju, ker nenehno stoji ob meni in verjame v moj uspeh.