

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška KLADNIK

**UGOTAVLJANJE CITOTOKSIČNOSTI RDEČEGA
BARVILA BAKTERIJE *Vibrio* sp. ZA PRIMARNE
MIŠJE LIMFOCITE B**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urška KLADNIK

**UGOTAVLJANJE CITOTOKSIČNOSTI RDEČEGA BARVILA
BAKTERIJE *Vibrio* sp. ZA PRIMARNE MIŠJE LIMFOCITE B**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CYTOTOXICITY OF RED PIGMENT FROM BACTERIUM *Vibrio* sp.
FOR PRIMARY MOUSE B LYMPHOCYTES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Laboratorijski del naloge sem izvajala na Biotehniški fakulteti, na Oddelku za zootehniko, na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 8.6.2011 za mentorico imenovala prof. dr. Mojco Narat in somentorico dr. Ireno Oven.

Recenzent: prof. dr. David STOPAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Članica: asist. dr. Irena OVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Diplomsko delo 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.

Urška KLADNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579:616(043.2)=163.6
KG mikrobiologija/bakterije/rdeča barvila/prodigiozini/citotoksičnost/limfociti B/
miši/rak
AV KLADNIK, Urška
SA NARAT, Mojca (mentorica)/OVEN, Irena (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2011
IN UGOTAVLJANJE CITOTOKSIČNOSTI RDEČEGA BARVILA BAKTERIJE
Vibrio sp. ZA PRIMARNE MIŠJE LIMFOCITE B
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 47 str., 4 pregl., 11 sl., 39 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Prodigiozini so rdeča barvila, ki jih različne bakterije proizvajajo kot sekundarne učinkovine. Prodigiozini delujejo antibiotično, imunosupresivno in tudi protirakavo. Prodigiozini imajo veliko sorodnih molekul, tako imenovanih prodigiozinu podobnih barvil, z enako prodigininsko verigo in različnimi alkilnimi substituenti. V našem poskusu smo želeli preveriti, če prodigiozinu podobno barvilo, izolirano iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379, deluje citotoksično na primarne mišje limfocite B. Limfocite B smo izpostavili različnim koncentracijam barvila za različno dolga časovna obdobja. Njihovo preživetje smo spremljali z barvanjem celic s tripan modrim in s testom XTT. Ob tem smo preizkušali tudi aktivacijo kaspaze-3, ki je običajno udeležena pri celični apoptozi. Ugotovili smo, da barvilo deluje delno citotoksično na primarne, nerakave celice B, vendar samo v visokih koncentracijah barvila in ob daljšem času izpostavljenosti. Pri nobeni od testiranih koncentracij barvila in pri nobenem od testiranih časov izpostavljenosti niso odmrle vse celice, povsod je preživela vsaj približno tretjina celic. Aktiviranja kaspaze-3 nismo dokazali, ker je bilo aktivirane kaspaze-3 premalo, ali ker se je apoptoza pri celicah, ki so odmrle, aktivirala po drugi poti. Ob primerjavi rezultatov delovanja istega barvila na celično linijo NSO, ki je transformirana linija celic B in ima značilnosti rakastih celic, smo potrdili, da ima barvilo večji citotoksičen učinek na celice NSO. Iz tega bi lahko sklepali, da ima barvilo večji učinek na rakave celice celične linije NSO kot na primarne mišje limfocite B.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 579:616(043.2)=163.6
CX microbiology/bacteria/red pigments/prodigiosins/cytotoxicity/B lymphocytes/mice/
cancer
AU KLADNIK, Urška
AA NARAT, Mojca (supervisor)/OVEN, Irena (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme in
Biotechnology
PY 2011
TI CYTOTOXICITY OF RED PIGMENT FROM BACTERIUM *Vibrio* sp. FOR
PRIMARY MOUSE B LYMPHOCYTES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 47 p., 4 tab., 11 fig., 39 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Prodigiosins are red pigments produced by different bacteria as secondary metabolites. Prodigiosins have antibiotic, immunosuppressive and also anticancer properties. Prodigiosins have many related molecules named prodigiosin-like pigments with the same prodiginin chain, but different alkyl substituents. The aim of this experiment was to examine whether the prodigiosin-like pigment, isolated from the bacteria *Vibrio* sp. DSM 14379 has a cytotoxic effect on primary mouse B lymphocytes. The B lymphocytes were exposed to different concentrations of the pigment for different periods of time. The survival rate of the cells was monitored by staining them with trypan blue and by using the XTT test. At the same time the activation of caspase-3, which is usually present in cell apoptosis, was also tested. The research has shown that the pigment has partial cytotoxic effects on primary, non cancer B cells, but only if these are exposed to a higher concentration of the pigment and for a longer period of time. Neither the different concentrations nor the different time exposures caused cell death for all the cells, at least one third of the cells survived. The activation of caspase-3 could not be proven because there was either not enough caspase-3 activated or because the cell death was induced in a different way. When the results of the effects of the same pigment on the NSO cell line, which is a transformed line of B cells and has the characteristics of cancer cells, were compared, it has been confirmed that the pigment has a larger cytotoxic effect on the NSO cells. Due to this fact we concluded that the pigment has a larger effect on the cancer B cells than on the primary mouse B lymphocytes.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|---|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija (KDI) | III |
| Key word documentation (KWD) | III |
| Kazalo vsebine..... | V |
| Kazalo preglednic | VIII |
| Kazalo slik | IX |
| Okrajšave in simboli | X |
| 1 UVOD | 1 |
| 2 PREGLED OBJAV | 2 |
| 2.1 SPLOŠNO O PRODIGIOZINIH..... | 2 |
| 2.2 RDEČE BARVILO IZOLIRANO IZ <i>Vibrio</i> sp..... | 3 |
| 2.3 VPLIV PRODIGIOZINOV NA EVKARIONTSKE CELICE | 4 |
| 2.3.1 Imunosupresivno delovanje | 4 |
| 2.3.2 Antibiotično delovanje | 4 |
| 2.3.3 Protirakavo delovanje | 5 |
| 2.4 APOPTOZA | 8 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 10 |
| 3.1 BARVILO | 10 |
| 3.2 OPTIMIZACIJA POGOJEV ZA IZOLACIJO IN GOJENJE PRIMARNIH MIŠJIH LIMFOCITOV B | 10 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.2.1 | Priprava limfocitov iz vranice | 10 |
| 3.2.2 | Optimizacija gojišč | 11 |
| 3.2.3 | Štetje celic s tripan modrim..... | 11 |
| 3.2.4 | Določanje metabolne aktivnosti celic s testom XTT..... | 12 |
| 3.2.5 | Izolacija limfocitov B iz vranice | 13 |
| 3.2.6 | Optimiziranje števila celic..... | 14 |
| 3.2.7 | Stimulacija celičnega metabolizma | 15 |
| 3.3 | DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI BARVILA | 16 |
| 3.3.1 | Štetje celic obarvanih s tripan modrim | 16 |
| 3.3.2 | Test XTT..... | 17 |
| 3.3.3 | Merjenje aktivnosti kaspaze-3..... | 17 |
| 4 | REZULTATI..... | 19 |
| 4.1 | OPTIMALNI POGOJI ZA IZVEDBO TESTA | 19 |
| 4.1.1 | Zamrzovanje celic..... | 19 |
| 4.1.2 | Optimizacija gojišč | 19 |
| 4.1.3 | Optimizacija števila celic..... | 20 |
| 4.1.4 | Stimulacija celičnega metabolizma | 21 |
| 4.2 | VPLIV BARVILA NA PREŽIVETJE LIMFOCITOV B..... | 24 |
| 4.2.1 | Vpliv barvila, ocenjen s štetjem celic, obarvanih s tripan modrim | 24 |
| 4.2.2 | Test XTT..... | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3 | MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3 | 29 |
| 4.4 | PRIMERJAVA DELOVANJA BARVILA NA LIMFOCITE B IN CELIČNO LINIJO NSO..... | 31 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI..... | 35 |
| 5.1 | OPTIMALNI POGOJI ZA IZVEDBO TESTA | 35 |
| 5.2 | VPLIV BARVILA NA PREŽIVETJE LIMFOCITOV B..... | 36 |
| 5.3 | MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3 | 38 |
| 5.4 | PRIMERJAVA DELOVANJA BARVILA NA LIMFOCITE B IN CELIČNO LINIJO NSO..... | 39 |
| 5.5 | SKLEPI..... | 40 |
| 6 | POVZETEK..... | 41 |
| 7 | VIRI | 43 |
| | ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | str. |
|--|------|
| Preglednica 1: Število celic pred zamrzovanjem in število živih celic po odmrznitvi..... | 19 |
| Preglednica 2: Preživetje celic v različnih gojiščih..... | 20 |
| Preglednica 3: Ugotavljanje aktiviranja kaspaze-3 v vzorcih z merjenjem absorbance..... | 30 |
| Preglednica 4: Primerjava vpliva prodigiozinov na različne celice. | 34 |

KAZALO SLIK

| | str. |
|--|------|
| Slika 1: Prodigiozin in nekatere prodigiozinu podobne molekule. | 3 |
| Slika 2: Štiri poti sprožanja apoptoze s prodigiozini..... | 9 |
| Slika 3: Štetje z Bürker-Türkovo števno komoro..... | 12 |
| Slika 4: Označevanje celic pri ločevanju limfocitov B od ostale populacije celic..... | 13 |
| Slika 5: Test stimuliranja limfocitov B z LPS..... | 21 |
| Slika 6: Določanje optimalnega časa izpostavljenosti limfocitov B reagentu XTT..... | 23 |
| Slika 7: Določanje citotoksičnosti barvila s pomočjo štetja celic, obarvanih s tripan modrim. | 25 |
| Slika 8: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije živih primarnih limfocitov B s testom XTT..... | 27 |
| Slika 9: Koncentracija živih primarnih limfocitov B, določena s testom XTT..... | 28 |
| Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje aktivnosti kaspaze-3..... | 30 |
| Slika 11: Primerjava delovanja barvila na limfocite B in celično linijo NSO..... | 32 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|---------|---|
| ADP | adnenozin difosfat (<i>angl. adenosine diphosphate</i>) |
| AIF | faktor, ki sproži apoptozo (<i>angl. apoptosis inducing factor</i>) |
| BCR | B-celični receptor |
| BID | pro-apoptotični protein (<i>angl. BH3 interacting domain death agonist</i>) |
| CD | označevalec celične diferenciacije (<i>angl. Cluster of Differentiation</i>) |
| ConA | konkavalin A (<i>angl. concavalin A</i>) |
| DMEM | <i>angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | dimetil sulfoksid |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina (<i>angl. deoxyribonucleic acid</i>) |
| DTT | ditiotritol |
| FACS | ločevanje fluorescenčno označenih celic (<i>angl. Fluorescence Activated Cell Sorting</i>) |
| FBS | fetalni telečji serum (<i>angl. Fetal Bovine Serum</i>) |
| HEPES | <i>angl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> |
| HL-60 | humane promieloične leice levkemije (<i>angl. human promyelocytic leukemia cells</i>) |
| IL | interlevkin |
| IMDM | <i>angl. Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> |
| LPS | lipopolisaharid |
| MBL | <i>angl. Medical & Biological Laboratories</i> |
| MDCK | ledvične celice psa, ki sta jih izolirala Madin in Darby (<i>angl. Madin-Darby Canine Kidney cells</i>) |
| MR | rezistenca na mitoksantron |
| NIH-3T3 | celična linija mišjih fibroblastov nacionalnega inštituta za zdravje v ZDA (<i>angl. National Institute of Health - mouse fibroblast cell line</i>) |
| NSO | celična linija mišjega mieloma |
| PARP | poli-(ADP-riboza)-polimeraza (<i>angl. poly-(ADP-ribose)-polymerase</i>) |
| PI | fosfatidilinozitol (<i>angl. phosphatidylinositol</i>) |
| pNA | <i>angl. p-nitroanilide</i> |
| PWM | mitogen iz navadne barvilnice (<i>angl. pokeweed mitogen</i>) |

- RPMI gojišče za celice razvito na inštitutu Roswell Park Memorial (*angl. Roswell Park Memorial Institute*)
- XTT natrijev 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid
- Z.VAD.fmk benziloksikarbonil-valil-alanil-aspartil-(O-metil)-fluorometilketon (*angl. carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone*)

1 UVOD

Rak je eden najpogostejših vzrokov smrti v razvitem svetu ter skupno ime za več kot dvesto malignih bolezni. V svetu zboli za rakom letno več kot 12 milijonov ljudi, 7,6 milijona pa jih zaradi raka umre. V Sloveniji letno zboli več kot 10.000 prebivalcev, umre pa jih okrog 6.000 (Vertot, 2010). Dandanes se mrzlično iščejo zdravila proti tej bolezni. Če je v preteklosti veljalo, da so najbolj perspektivna zdravila, pridobljena s kemijsko sintezo, danes bolj stremijo k naravnim produktom iz še ne raziskanih virov narave. Eden izmed takih virov je tudi morje. Ideje o pridobivanju naravnih produktov za zdravila iz morskih organizmov segajo že v petdeseta leta prejšnjega stoletja, vendar pa so prvo zdravilo proti raku, pridobljeno iz morskih organizmov, v Evropski uniji odobrili šele leta 2007 (Molinski in sod., 2009).

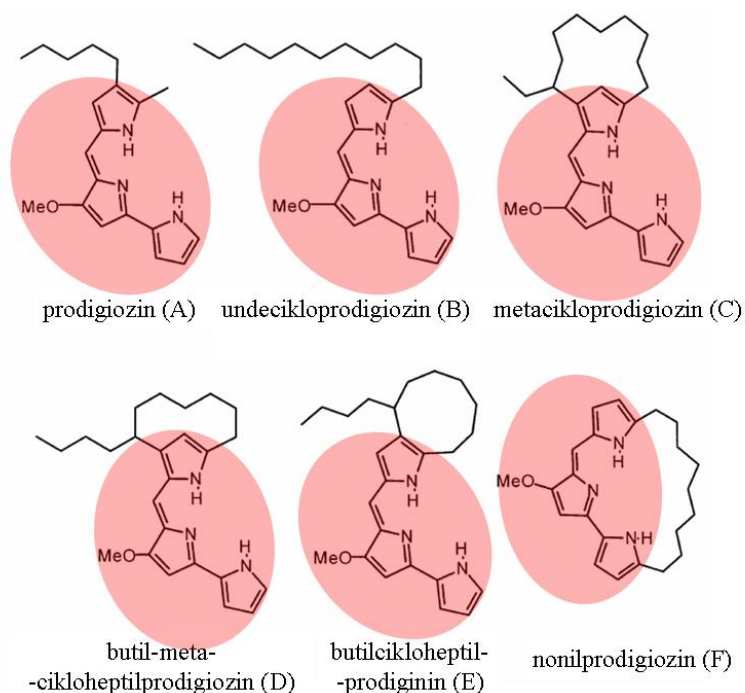
Raziskovalci na Oddelku za živilstvo (Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani) so izolirali rdeče barvilo iz morske bakterije *Vibrio* sp., za katerega predvidevajo, da spada med prodigiozinom podobna barvila (Starič in sod., 2010). Različne študije kažejo, da imajo prodigiozini in prodigiozinom podobna barvila protirakav učinek (Montaner in sod., 2000; Soto-Cerrato in sod., 2004; Campas in sod., 2003). Zanimalo jih je, ali ima tudi barvilo, izolirano iz bakterije *Vibrio* sp., protirakav učinek. Prejšnja študija, opravljena v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko, je pokazala, da ima barvilo citotoksičen učinek na celično linijo NSO, ki predstavlja rakave celice, po izvoru mišje limfocite B (Krošnjak, 2011).

V tej diplomski nalogi smo želeli preveriti hipotezo, da to barvilo deluje citotoksično le na rakave celice, medtem ko na ne-rakave ne vpliva. Zato smo iz vranic miši BALB/c izolirali limfocite B, pripravili primarno kulturo in preizkušali učinek barvila po enakem protokolu, kot je bil uporabljen v prejšnji študiji na celični liniji NSO.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O PRODIGIOZINIH

Prodigiozini so rdeča barvila, ki jih različne bakterije, kot na primer *Serratia marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra* in druge, producirajo v obliki kromoforov (Williams in Hearn, 1967). Prodigiozini so dobro poznana barvila, saj preučevanje teh barvil sega že daleč v zgodovino. Gaughran (1969) je raziskoval zanimive pojave v zgodovini, ki so verjetno posledica produkcije prodigiozinov. Ugotovil je, da je že grški zgodovinar v prvem stoletju pred našim štetjem opazil »krvav« izgled kruha, v dvanajstem stoletju našega štetja pa so poročali, kako »krvavijo« hostije. Šele Bartolemeo Bizio je leta 1819 odkril, da so to pojavi, ki nastajajo zaradi barvila, ki ga proizvaja mikroskopska »gliva«. Poimenoval jo je *Serratia* po italijanskem fiziku. Leta 1902 je Kraft barvilo poimenoval »prodigiozin«, prvič pa so ga uspeli izolirati leta 1929 (Gerber, 1975). Šele v 60-tih letih prejšnjega stoletja so s popolno sintezo določili pravo strukturo prodigiozina. Postalo je jasno, da ima prodigiozin veliko sorodnih molekul, tako imenovanih prodigizinu podobnih barvil, z enako prodigininsko verigo in različnimi alkilnimi substituenti (Furstner, 2003).



Slika 1: Prodigiozin (A) in nekatere prodigiozinu podobne molekule (B-F) (Furstner, 2003).
 Z rdečo barvo je označena osnovna prodigininska veriga.

2.2 RDEČE BARVILO IZOLIRANO IZ *Vibrio* sp.

Morje je največji življenjski habitat. Zaradi svoje velikosti je še pretežno neraziskano in ponuja izjemen potencial tudi za odkrivanje organizmov in njihovih produktov, ki bi lahko olajšali in izboljšali kvaliteto življenja ljudi. Taki so na primer novi antibiotiki iz morskih organizmov in mikroorganizmov. Potencialno protimikrobno delovanje morskih mikroorganizmov sta že leta 1947 ugotavljala William D. Rosenfeld in Claude E. ZoBell. Poleg odkrivanja novih antibiotikov strmo narašča tudi zanimanje za druga zdravila, predvsem za zdravljenje raka.

Rdeče barvilo, izolirano iz *Vibrio* sp. DSM 14379, spada v družino prodigininov. Je prodigiozinu podobno barvilo. *Vibrio* sp. so izolirali iz vzorca morske vode iz severnega dela Jadranskega morja. Ugotovili so, da ta bakterija proizvaja rdeče barvilo le v optimalnih pogojih, torej kot sekundarni metabolit. Za produkcijo je pomembna temperatura, ki ne sme biti nižja od 15° C, optimalna slanost, zadostna količina glukoze

in dostopnost ogljika. *Vibrio* sp. so gojili na gojišču s peptonskim kvasnim ekstraktom s 3 % NaCl in ugotovili, da se začne proizvodnja prodigiozina v pozni eksponencialni fazi in se nadaljuje tudi v stacionarni fazi. Barvilo, izolirano iz *Vibrio* sp. DSM 14379, deluje protibakterijsko proti *Bacillus* sp., ki so ga izolirali iz enakega vzorca, kot *Vibrio* sp. (Starič in sod., 2010).

2.3 VPLIV PRODIGIOZINOV NA EVKARIONTSKE CELICE

2.3.1 Imunosupresivno delovanje

Prodigiozini imajo širok spekter delovanja. Delujejo antibiotično, imunosupresivno in tudi protirakavo (Williams in Quadri, 1980; Demain, 1995).

Han in sodelavci (1998) so raziskovali imunosupresivno delovanje. Ugotovili so, da prodigiozin, izoliran iz *Serratia marcescens* B-1231, inhibira T-celični imunski odziv: inhibira proliferacijo, ki jo sproži konkavalin-A, mešan limfocitni odgovor, ki ga sproži mitogen iz navadne barvilnice (PWM) ter lokalno reakcijo presadka proti gostitelju in produkcijo protiteles. Ne inhibira pa B-celičnega imunskega odziva, kot je na primer proliferacija inducirana z lipopolisaharidi ali aktivacija produkcije poliklonskih protiteles *in vitro*.

2.3.2 Antibiotično delovanje

Antibiotično delovanje se nanaša predvsem na protiglivno, protibakterijsko in antimalarično (Starič in sod., 2010; Someya in sod., 2001; Patil in sod., 2011).

Prodigiozinu podobno barvilo, izolirano iz *Vibrio* sp. DSM 14379, deluje protibakterijsko na *Bacillus* sp. Obe bakteriji, *Vibrio* sp. in *Bacillus* sp. sta bili izolirani iz istega okolja, nato pa so ju gojili na mikrotitrskih ploščah. Tam kjer je bil *Bacillus* sp. skupaj z *Vibrio* sp., ki proizvaja prodigiozinu podobno barvilo, so zaznali inhibicijo rasti, medtem ko na ploščah, kjer sta rasla skupaj *Bacillus* sp. in *Vibrio* sp., ki ne

proizvaja prodigiozinu podobnega barvila, pa inhibicije rasti niso zaznali (Starič in sod., 2010).

Serratia marcescens B2 proizvaja prodigiozin, ki skupaj še z dvema hitinolitičnima encimoma, ki sta izpostavljena na njeni membrani, preprečuje razmnoževanje spor sive plesni *Botrytis cinerea* (Someya in sod., 2001).

Prodigiozin, ki ga proizvaja *Serratia marcescens* NMCC46, deluje kot insekticid na ličinke komarjev vrst *Aedes aegypti* in *Anopheles stephensi*. Nadomesti lahko umetne insekticide in pripomore v boju proti malariji (Patil in sod., 2011).

2.3.3 Protirakavo delovanje

Zelo obetajoče je protirakavo delovanje prodigiozinov. Kemoterapevtiki delujejo na več različnih načinov. Lahko vplivajo na DNA in preprečijo širjenje raka (Jordan in Wilson, 2004; Pantazis in sod., 1993; Pizao in sod., 1994) ali pa sprožijo apoptozo rakavih celic (Reed, 2002).

Pri odkrivanju in selekciji protirakavih učinkovin se običajno uporabljajo živalski modeli, ki imajo vsajen človeški tumor. Na tak način lahko testirajo le malo učinkovin, saj so takšni testi dolgi, testne živali drage, delo pa je zahtevno. Zato se vedno bolj poslužujejo alternativnih metod testiranja, in sicer *in vitro* testov, ki temeljijo na celičnih kulturah, genomiki in računalniški obdelavi podatkov (Li in sod., 2003; Meyer, 2003; Suggitt in Bibby, 2005; Ulrich in Friend, 2002). Celične linije humanih rakavih celic se uporabljajo kot orodja za presejalne teste za identifikacijo protirakavih učinkovin (Knausmuller in sod., 2004). Vseskozi so testi aktivnosti glavni pristopi pri odkrivanju protirakavih učinkovin. Pri tem je pomembno, da protirakava učinkovina nima toksičnih učinkov na ostale, nerakave celice. Vsekakor delo na celičnih kulturah omogoča razumevanje toksikoloških značilnosti v zgodnji fazi razvoja zdravil, odpravi ozka grla v nadaljnjem procesu in pospeši razvoj zdravila (Colombo in sod., 2001; Koppal, 2004).

Han in sodelavci (1998) so poleg imunosupresivnega delovanja prodigiozinov ugotovili, da prodigiozini ne izzovejo apoptoze v nerakavih celicah, kot so limfociti B. Celice iz mišje vranice so izpostavili različnim koncentracijam prodigiozina 25-C (od 0,3 do 30000 nM) za 1, 2 in 3 dni in ugotovili, da koncentracije prodigiozina nižje od 100 nM ne vplivajo na preživetje celic. Poleg tega so ugotovili, da koncentracija prodigiozina pod 100 nM ne vpliva na proliferacijo limfocitov B, ki so bili stimulirani z lipopolisaharidi (LPS), zavira pa proliferacijo limfocitov T, ki so bili stimulirani s konkavalinom-A (ConA), že pri 3 nM koncentraciji prodigiozina.

LPS inducira proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B. Stimulira tudi izločanje IL-6 pri zrelih in nezrelih limfocitih B. Pri tem ima pomembno vlogo fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI 3-kinaza), saj je aktiviranje te signalne poti nujno, tako za proliferacijo limfocitov B, kot tudi za izločanje IL-6. Za razliko od signaliziranja preko B-celičnega receptorja (BCR) pri stimulaciji z LPS ni potrebno fosforiliranje koreceptorja CD19 (Venkataraman in sod., 1999).

Campas in sodelavci (2003) so preučevali vpliv prodigiozina na periferne limfocite bolnikov, ki imajo kronično limfocitno levkemijo celic B. Celice so bile 48 ur izpostavljene prodigiozinu v koncentracijah od 40 nM do 190 nM. Ugotovili so, da s povečevanjem koncentracije prodigiozina odmirava vedno več celic B kot tudi celic T. Celično apoptozo so spremljali z metodo pretočne citometrije. Ugotovili so, da se velikost celic zmanjša, hkrati pa se poveča njihova kompleksnost, kar nakazuje na celično apoptozo. Ob tem so preverili tudi aktiviranje kaspaz. Z analizo prenosa western so dokazali, da se v apoptozi, ki jo sprožijo prodigiozini, aktivira kaspaza-9.

Soto-Cerrato in sodelavci (2004) so preučevali učinek prodigiozina iz *Serratia marcescens* 2170 na celične linije raka dojke. Preučevali so celično linijo, ki ima receptor za estrogen (MCF-7) in celično linijo, ki tega receptorja nima (MDA-MB-231). Rak dojke, katerega celice imajo receptor za estrogen, se namreč lahko zdravi s spremembami hormonskega ravnovesja ali z zaviralci teh celičnih receptorjev, rak dojke, katerega celice pa estrogenskega receptorja nimajo, pa ne more biti zdravljeno na tak način. Celice so izpostavili koncentracijam prodigiozina od 0 do 2,7 μ M za 4, 8, 16 in 24 ur in s

pomočjo tetrazolijeve soli ugotovili, da naraščajoče koncentracije prodigiozina izzovejo apoptozo obeh celičnih linij. V celičnih linijah MCF-7 in MCF-7 MR (MCF-7, ki je odporna proti mitoksantronu) so z analizo prenosa western določali količino proteinov p53, p21 in Bax, ki so neposredno povezani z apoptozo. Rezultati so pokazali različne količine teh proteinov v vsaki od celičnih linij, zaradi česar so sklepali, da s prodigiozini sprožena apoptoza poteka drugače pri vsaki vrsti rakavih celic. Poleg tega so s prenosom western v celičnih linijah MCF-7 in MCF-7 MR preverjali še sproščanje citokroma c, aktivacijo kaspaz-9, -8 in -7 in cepitev poli-(ADP-riboza)-polimeraze (PARP). Pri obeh celičnih linijah so zaznali povečevanje izločanja citokroma c iz mitohondrijev v citosol, dlje kot so bile celice izpostavljene prodigiozinu. Ob tem se je povečevala količina aktiviranih kaspaz-9, -8 in -7 ter vedno večja količina cepljene poli-(ADP-riboza)-polimeraze (PARP). Iz tega so sklepali, da prodigiozini v celičnih linijah raka dojk sprožijo apoptozo preko mitohondrijske poti. To so potrdili tako, da so celične linije, ki so bile predhodno izpostavljene prodigiozinu, tretirali tudi s kaspaznim inhibitorjem Z-VAD.fmk.

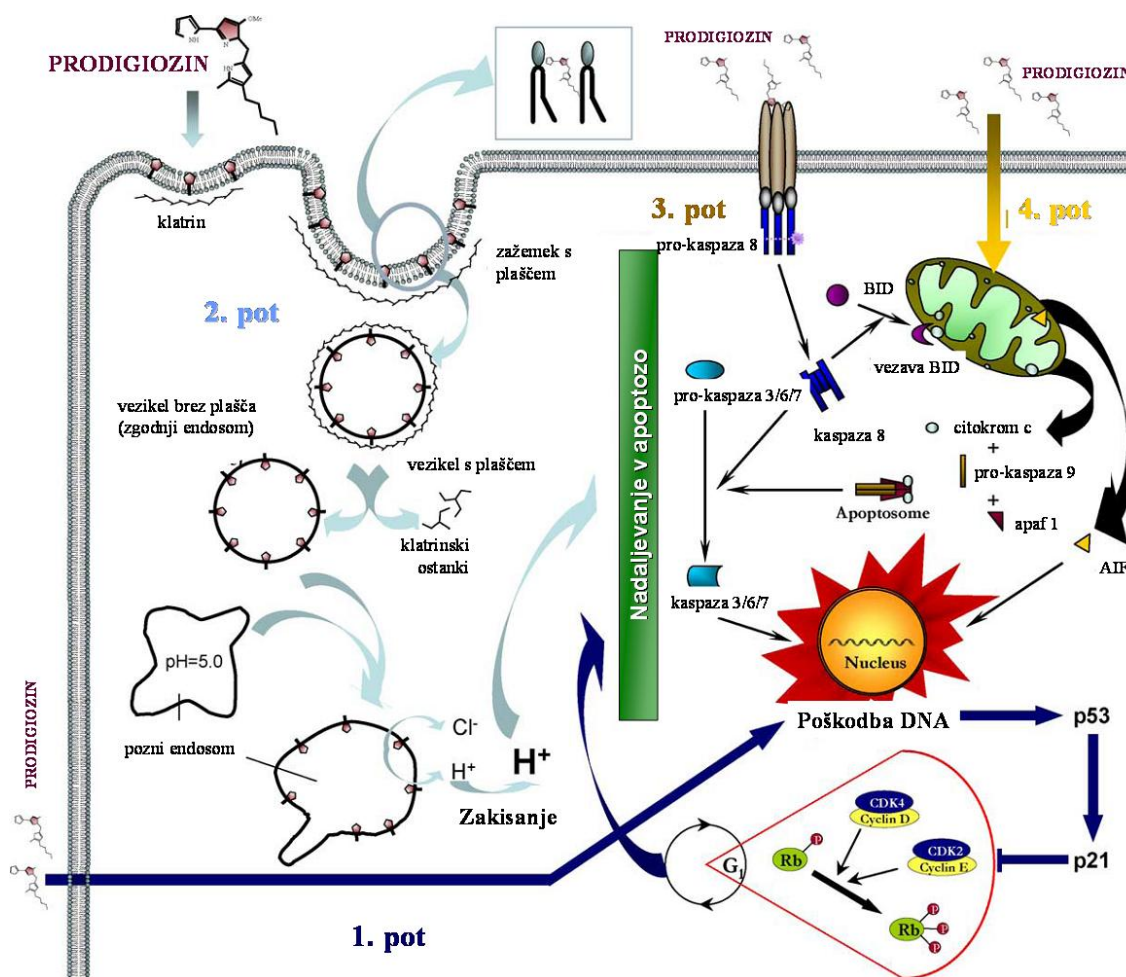
Montaner in sodelavci (2000) so ugotavljali vpliv prodigiozina iz supernatanta *Serratia marcescens* 2170 na rakave celične linije Jurkat, NSO, HL-60 in Ramos ter hkrati na nerakavi celični liniji NIH-3T3 in MDCK. Prišli so do sklepov, da na nerakave celične linije prodigiozin s koncentracijami od 1 µg/ml do 10 µg/ml nima vpliva na preživetje celic, medtem ko začnejo rakave celične linije Jurkat, HL-60 in Ramos odmirati že pri koncentraciji prodigiozina 1 µg/ml, NSO pa pri nekoliko višji koncentraciji. Celice so opazovali od 4 do 24 ur. Pri vseh časih so bili rezultati enaki. Dokazati so želeli, da je odmiranje celic posledica apoptoze, ki jo izzove prodigiozin iz supernatanta *Serratia marcescens* 2170 s tem, da poškoduje DNA. S pomočjo elektroforeze so ugotovili, da je pri rakavih celičnih linijah Jurkat, NSO, HL-60 in Ramos DNA fragmentirana, pri NIH-3T3 in MDCK pa je ostala nepoškodovana. Enako so ugotovili, ko so celice, ki so jih predhodno pobarvali z barvilom Hoechst 33342, pogledali pod fluorescenčnim mikroskopom. Aktivacijo kaspaz so dokazali z metodo pretočne citometrije (FACS), kjer so inhibirali kaspaze z inhibitorjem Z-VAD.fmk.

Prodigiozini citotoksično vplivajo na celice po različnih poteh. Poleg tega, da aktivirajo kaspaze ipd., so Montaner in sodelavci (2005) potrdili svoje predhodne ugotovitve, da se prodigiozini med drugim vežejo tudi direktno na DNA. Zavirajo tako topoizomerozo I, kot tudi topoizomerozo II in s tem povzročijo lomljenje DNA ter apoptozo. To so preučevali na rakavih celicah *in vivo* ter na Jurkat celični liniji in pri obeh potrdili enako. Zaradi različnih načinov delovanja prodigiozinov na rakave celice, je to zelo obetajoče zdravilo za zdravljenje raka.

2.4 APOPTOZA

Apoptoza je oblika programirane celične smrti za katero je značilna kondenzacija jedrnega kromatina, skrčenje celic, nagubanje membrane in fragmentacija DNA (Arends in Wyllie, 1991; Bryson in sod., 1994; Telford in sod., 1994).

Prodigiozini izzovejo apoptozo rakavih celic (Montaner in sod., 2000; Campas in sod., 2003; Soto-Cerrato in sod., 2004). Do sedaj so ugotovili, da obstajajo štiri možni mehanizmi, kako prodigiozini sprožijo apoptozo celic. Prodigiozini lahko znižajo pH znotraj celice in tako sprožijo apoptozo. To je še posebej pomembno pri rakavih celicah, saj so ugotovili, da je pri teh celicah notranjost bolj alkalna kot pri zdravih celicah in zato zakisanje citoplazme še bolj vpliva na preživetje celic (Shrode in sod., 1997; Martinez-Zagulian in sod., 1993). Prodigiozin lahko deluje tudi kot inhibitor celičnega cikla, povzroči razgrajevanje DNA ali pa vpliva na kaskado MAP kinaze (Perez-Tomas in sod., 2003). Vse štiri poti so shematsko prikazane na sliki 2.



Slika 2: Štiri poti sprožanja apoptoze s prodigiozini (Perez-Tomas in sod., 2003)

Pot 1: Poškodba DNA, vpliv na celični cikel, nadaljevanje v apoptozo. Pot 2: Tvorjenje veziklov in nato zakisanje citoplazme, nadaljevanje v apoptozo. Pot 3: Aktiviranje kaspaze-6, nadaljevanje v apoptozo. Pot 4: Vstop prodigiozina v mitohondrij, sproščanje AIF, nadaljevanje v apoptozo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BARVILO

Barvilo so pridobili Starič in sod. (2010). Barvilo je bilo raztopljeno v 96 % etanolu z začetno koncentracijo 1,6 mg/ml. Pri poskusu smo uporabljali končne koncentracije barvila 16 µg/ml, 1,6 µg/ml in 0,16 µg/ml. S predhodnimi poskusi (Krošnjak, 2011) je bilo dokazano, da etanol pri tako nizkih koncentracijah ne vpliva na celice in zato ne moti našega poskusa. Barvilo smo redčili s sterilno destilirano vodo.

3.2 OPTIMIZACIJA POGOJEV ZA IZOLACIJO IN GOJENJE PRIMARNIH MIŠJIH LIMFOCITOV B

3.2.1 Priprava limfocitov iz vranice

Primarno celično linijo limfocitov B smo pripravili iz vranic miši BALB/c. Miške so bile iz Vzrejnega centra za laboratorijske miške (Odločba VURS št. 323-02-122/2005/23 izdana za: Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta). Živali v tem poskusu so bile izbrane iz populacije odvečnih živali vzrejnega programa in evtanazirane s CO₂. Vsi ostali postopki so potekali na tkivih po žrtvovanju. Vranico smo z gumijastim batom nežno zmacerirali in celice presejali skozi mrežico. Mononuklearne celice smo s centrifugiranjem na fikolu Histopaque 1077 (Sigma, 10771) ločili od eritrocitov ter jih razdelili na dva dela. En del celic smo zamrznili, drug del pa smo porabili za optimizacijo pogojev gojenja celic.

Celice, ki smo jih namenili za zamrzovanje, smo resuspendirali v fetalnem telečjem serumu (FBS) tako, da smo dobili koncentracijo $7,2 \times 10^7$ celic/ml. Celice smo zamrznili v gojišču DMEM z 10 % FBS ter v dveh različnih koncentracijah DMSO: 10 % in 20 %. Zamrznili smo 2 viali po 2 ml celic v 10 % DMSO in 2 viali po 2 ml celic v 20 % DMSO. Za preizkus preživetja smo odmrznili vialo s celicami v 20 % DMSO ter jih prešteli.

3.2.2 Optimizacija gojišč

Drugo polovico celic s koncentracijo 3×10^6 celic/ml smo dali v gojišče DMEM (z dodanim FBS in gentamicinom) in jih gojili v inkubatorju pri 37°C in 5 % CO_2 . Celice smo po dveh dneh prestavili v gojišče IMDM (z dodanim FBS in gentamicinom) in jim dva dni za tem zamenjali gojišče s svežim IMDM (z dodanim FBS in gentamicinom) ter jih po sedmih dneh gojenja zavrgli.

Celice, ki smo jih zamrznili v 20 % DMSO, smo odmrznili in jih razdelili na dve gojišči: IMDM (z dodanim FBS in gentamicinom) ali RPMI z 10 % FBS, glutaminom in HEPES. Obema gojiščema smo dodali tudi β -merkaptotanol. Celice smo gojili v inkubatorju pri 37°C in 5 % CO_2 . Celicam smo po dveh, štirih in osmih dneh (kjer so bile celice še žive) zamenjali gojišče. Preživetje celic smo spremljali s štejetjem celic obarvanih s tripan modrim.

3.2.3 Štetje celic s tripan modrim

Po barvanju celic s tripan modrim lahko ločimo mrtve in žive celice. Barvilo tripan modro obarva mrtve celice, ki imajo poškodovano celično membrano. Celice z nepoškodovano membrano vzdržujejo mehanizme, ki zadržujejo barvilo izven celice in se zato ne obarvajo.

Celicam iz gojišča smo dodali barvilo tripan modro (1:1, v/v). Suspenzijo celic in barvila smo dobro premešali in nanесли na Bürker-Türkovo števno komoro, ki smo jo pokrili s krovnim steklom. Celice smo nato pogledali pod mikroskopom ter prešteli žive in mrtve celice v štirih kvadrantih (slika 3).

Koncentracijo živih celic smo izračunali po naslednji formuli (1):

$$N = \frac{n}{4} \times R \times V \times 10^4 \quad \dots(1)$$

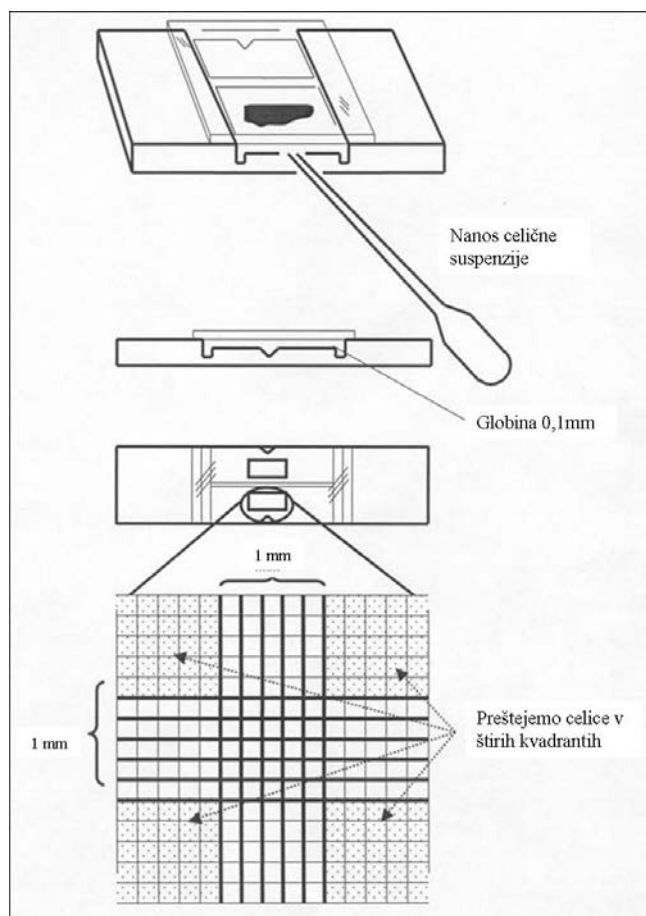
N – število živih celic

n – število živih celic v štirih kvadratih hemocitometra

R – faktor redčenja zaradi dodanega barvila (2)

V – volumen od katerega smo celice odvzeli (ml)

10^4 – volumen celične suspenzije nad kvadratom (1/ml)



Slika 3: Štetje z Bürker-Türkovo števno komoro (Focosi, 2011)

3.2.4 Določanje metabolne aktivnosti celic s testom XTT

Reagent XTT je natrijev 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-karboksanilid. Je tetrazolijeva sol, ki jo mitohondrijske dehidrogenaze s pomočjo fenazin metosulfata reducirajo do formazana. Pri tem se barva spremeni iz rumene v oranžno. Tega so sposobne samo žive celice, zato količina formazana, ki nastane,

neposredno kaže na količino živih celic. Formazan določamo spektrofotometrično z merjenjem absorbanca pri valovni dolžini 450 nm. Natančno koncentracijo celic v vzorcu določimo s pomočjo umeritvene krivulje.

Test smo izvedli s komercialnim kompletom reagentov In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based, TOX2 (Sigma-Aldrich).

3.2.5 Izolacija limfocitov B iz vranice

Za ločevanje limfocitov B od ostale populacije celic iz vranice obstaja več različnih metod in komercialnih kompletov. Eden izmed teh je ločevanje na podlagi specifičnih protiteles, označenih z magnetnim označevalcem. Označijo se vse celice, ki niso limfociti B. V mešanici so protitelesa proti receptorjem CD43, CD4 in Ter-119 in so označena z biotinom. Nanje se nato vežejo protitelesa proti biotinu, ki pa imajo vezan magnetni označevalec. Ko se celice spustijo skozi kolono, ki je nameščena v magnetnem polju (magnetni celični separator Mini MACS), se v koloni zadržijo označene celice, limfociti B pa se sperejo skozi kolono. To frakcijo potem ulovimo (B Cell Isolation Kit, 2010).



Slika 4: Označevanje celic pri ločevanju limfocitov B od ostale populacije celic.

Celice, ki niso limfociti B, se označijo najprej z protitelesom, ki ima vezan biotin, na to protitelo pa se veže sekundarno protitelo, ki ima vezano magnetni označevalec (B Cell Isolation Kit, 2010).

3.2.6 Optimiziranje števila celic

Celice, zamrznjene v 20 % DMSO, smo suspendirali v RPMI z 10 % FBS, glutaminom in HEPES, da je bila končna koncentracija 5×10^5 celic/ml.

Celice smo nanesti na mikrotitrsko ploščo. V vsako luknjico smo dali 200 μ l celic in 22 μ l rdečega barvila iz bakterije *Vibrio* sp. tako, da so bile končne koncentracije v luknjicah 16 μ g/ml, 1,6 μ g/ml in 0,16 μ g/ml. Za vsako razredčino barvila smo naredili šest ponovitev. Celice smo inkubirali na 37° C in 5 % CO₂. Po štirih urah smo v prvi dve ponovitvi dodali 44 μ l reagenta XTT nato po treh urah inkubacije izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm. Po 24 urah smo dodali 44 μ l reagenta XTT še v drugi dve ponovitvi, po 48 urah pa še v tretji dve ponovitvi. Tudi pri teh ponovitvah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm po treh urah delovanja reagenta XTT.

Barvilo je bilo raztopljeno v etanolu, zato smo za kontrolo 200 μ l celicam namesto barvila dodali 22 μ l etanola v takih redčitvah, da je bil končni delež etanola v luknjicah enak deležu etanola v poskusnih vzorcih (0,96 %, 0,096 % in 0,0096 %). Tudi tu smo izvajali test z XTT reagentom enako kot v luknjicah z barvilom.

Za ozadje pri merjenju absorbance po delovanju reagenta XTT smo uporabili enake razredčine barvila in ustrezno enake deleže etanola, le da smo namesto celic dodali v luknjice gojišče, enako tistemu, v katerem so bile celice suspendirane.

Pripravili smo tudi umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami celic za test XTT. Z gojiščem RPMI z 10 % FBS, glutaminom in HEPES smo pripravili redčitve celic z naslednjimi koncentracijami: 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$, $1,25 \times 10^5$, $6,25 \times 10^4$, $3,13 \times 10^4$, $1,56 \times 10^4$, $7,81 \times 10^3$, $3,91 \times 10^3$ celic/ml. Dodali smo reagent XTT tako, da je predstavljal 20 % volumna suspenzije celic. Po treh urah inkubacije smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

3.2.7 Stimulacija celičnega metabolizma

Limfociti B, ki smo jih izolirali iz mišje vranice so počivajoče celice. Za merjenje preživetja s testom XTT pa potrebujemo celice z aktivnim metabolizmom, zato smo celice stimulirali z LPS.

Sveže limfocite B smo resuspendirali v gojišču RPMI z 10 % FBS, glutaminom, HEPES, gentamicinom in 0,1 % β -merkaptetanola.

Iz dela celic smo si pripravili naslednje razredčine: $1,70 \times 10^7$, $8,50 \times 10^6$, $4,25 \times 10^6$, $2,13 \times 10^6$, $1,06 \times 10^6$, $5,31 \times 10^5$ in $2,66 \times 10^5$ celic/ml. V luknjice na mikrotitrski plošči smo dali 100 μ l vsake razredčine v štirih ponovitvah. V dve ponovitvi vsake razredčine smo dali še LPS tako, da je bila končna koncentracija 10 μ g/ml. Celice smo inkubirali na 37° C in 5 % CO₂. Po 24 urah smo v vsako luknjico dodali reagent XTT in merili absorbance pri valovni dolžini 450 nm po 3 urah, 4 urah in 24 urah inkubacije z reagentom. S tem smo želeli ugotoviti, ali LPS izboljša metabolno aktivnost celic, hkrati pa smo določali optimalno število celic za poskus ter optimalen čas delovanja reagenta XTT. Za ozadje pri merjenju absorbance smo uporabili le 100 μ l gojišča RPMI z 10 % FBS, glutaminom, HEPES, gentamicinom in 0,1 % β -merkaptetanola, brez celic.

Drug del celic smo nasadili v gojitveno posodo (7×10^5 celic/ml) in dodali LPS do končne koncentracije 10 μ g/ml ter inkubirali 24 ur pri 37° C in 5 % CO₂. Nato smo celice prestavili na mikrotitrsko ploščo – 100 μ l celic s koncentracijo 3×10^6 na luknjo ter inkubirali še 24 ur pri 37° C in 5 % CO₂. Po 24 urah smo dodali 11 μ l barvila tako, da so bile končne koncentracije v luknjicah 160 μ g/ml, 16 μ g/ml, 1,6 μ g/ml in 0,16 μ g/ml. Po 4 in 24 urah inkubacije smo dodali še 22 μ l reagenta XTT nato pa izmerili absorbance pri valovni dolžini 450 nm po 3 urah, 4,25 urah in 7,5 oz. 20 urah izpostavljenosti reagentu.

Barvilo je raztopljeno v etanolu, zato smo za kontrolo 100 μ l celicam namesto barvila dodali 11 μ l etanola tako, da so bile končni deleži etanola v luknjicah 9,6 %, 0,96 %, 0,096 % in 0,0096 %. Tudi tu smo izvajali test z XTT reagentom enako, kot v luknjicah z barvilom.

Za ozadje pri merjenju absorbance po delovanju reagenta XTT smo uporabili enake razredčine barvila in ustrezno enake deleže etanola, le da smo namesto celic dodali v luknjice gojišče, enako tistemu, v katerem so bile celice suspendirane.

3.3 DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI BARVILA

Na mikrotitrsko ploščo smo v vsako luknjico nanesti 100 μ l celic s koncentracijo 1×10^6 ali 4×10^6 celic/ml. Celice smo inkubirali na 37° C in 5 % CO₂. Po 24 urah smo celicam dodali 11 μ l barvila tako, da so bile končne koncentracije barvila 16 μ g/ml, 1,6 μ g/ml in 0,16 μ g/ml. Za kontrolo smo celicam namesto barvila dodali ustrezno enake deleže etanola, brez barvila. Pri vsaki koncentraciji celic smo za vsako razredčino barvila in etanola pripravili šest ponovitev. Po 4, 24 in 48 urah inkubacije z barvilom smo merili preživetje celic na dva načina:

- s štetjem celic, obarvanih s tripan modrim (koncentracija celic 1×10^6 celic/ml)
- s testom XTT (koncentracija celic 4×10^6 celic/ml)

3.3.1 Štetje celic obarvanih s tripan modrim

Po 4 urah inkubacije smo celice iz dveh ponovitev dobro resuspendirali in odpipetirali 30 μ l celic. Te celice smo zmešali s 30 μ l barvila tripan modro ter nanesti na hemocitometer. Na svetlobnem mikroskopu smo nato prešteli žive in mrtve celice ter izračunali njihovo koncentracijo.

Na enak način smo prešteli celice še po 24 urah in po 48 urah delovanja barvila v ostalih ponovitvah. Za vsak čas smo imeli dve ponovitvi.

3.3.2 Test XTT

Po 4 urah inkubacije smo v tri ponovitve dodali 22 μ l reagenta XTT nato pa po treh urah delovanja reagenta izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm. Enako smo za naslednje tri ponovitve naredili po 24 urah in še za tri ponovitve po 48 urah.

Za ozadje pri merjenju absorbance po delovanju reagenta XTT smo uporabili razredčine barvila in ustrezno enake deleže etanola, le da smo namesto celic dodali v luknjice gojišče, enako tistemu, v katerem so bile celice suspendirane.

Za umeritveno krivuljo za določanje koncentracij celic iz izmerjene absorbance smo vzeli podatke, ki smo jih pridobili pri testu stimuliranja limfocitov B z LPS (slika 5). Uporabili smo podatke celic, ki jim je bil dodan LPS in so bile nato reagentu XTT izpostavljene 3 ure.

3.3.3 Merjenje aktivnosti kaspaze-3

Aktivnost kaspaze-3 smo merili s pomočjo komercialnega kompleta reagentov podjetja MBL (APOPCYTO Caspase-3 Colorimetric Assay, 2004).

Sveže mišje limfocite B smo nanесли na ploščo s šestimi luknjami tako, da je bilo v vsaki luknji 2 ml celic s koncentracijo $2,5 \times 10^6$ celic/ml. Celice smo inkubirali na 37° C in 5 % CO₂ čez noč. Naslednji dan smo celicam dodali barvilo tako, da smo dobili po eno luknjo s koncentracijo barvila 16 μ g/ml, 1,6 μ g/ml in 0,16 μ g/ml. Za kontrolo smo celicam namesto barvila dodali enake deleže etanola, brez barvila. Pripravili smo tudi umeritveno krivuljo natančno po navodilih proizvajalca (APOPCYTO Caspase-3 Colorimetric Assay, 2004). Celice in reagente za umeritveno krivuljo smo nato 24 ur inkubirali na 37° C in 5 % CO₂.

Iz vsake luknje smo pobrali vsebino (celice z gojiščem) ter jo prenesli v falkonko in jo nato centrifugirali 10 minut na 1000 obratih na minuto. Supernatant smo zavrgli. Vse nadaljnje korake smo izvajali na ledu. Usedlino smo raztopili v 120 μ l Cell Lysis pufra

in prenesli v epice ter jih zamrznili. Po 30 minutah smo epice odmrznili in jih centrifugirali na centrifugi, ohlajeni na 4° C pri 10000 g 5 minut. Na mikrotitrsko ploščo smo nanесли po 50 µl mešanice DTT in 2x reakcijskega pufra, ki smo jo naredili po navodilih proizvajalca (APOPCYTO Caspase-3 Colorimetric Assay, 2004) ter dodali 50 µl supernatanta iz centrifugiranih epic. Za kontrolo smo namesto celičnega lizata dodali 50 µl Cell Lysis pufra. V vse luknjice smo dodali še 5 µl Caspase Substrata ter inkubirali na 37° C 2 uri. Nato smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 405 nm.

Aktivnost kaspaze-3 je izražena v koncentraciji prostega pNA v vzorcu. Iz umeritvene krivulje smo izračunali (2) količino prostega pNA v naših vzorcih in posledično aktivnost kaspaze-3:

$$\text{Aktivnost kaspaze-3} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{h}} \right] = \frac{\text{koncentracija sproš. pNA} * 0,1\text{mL cel. lizata}}{\text{čas inkubacije (h)}} \dots(2)$$

4 REZULTATI

4.1 OPTIMALNI POGOJI ZA IZVEDBO TESTA

4.1.1 Zamrzovanje celic

V prvem delu diplomskega projekta smo morali najprej ugotoviti, kakšni so optimalni pogoji za izvedbo testov. Ker smo delali s primarno celično kulturo, kjer smo celice B izolirali iz več poskusnih živali, smo želeli čim bolj zmanjšati biološko variabilnost. Vse preizkuse smo želeli opravljati na istih celicah. Zato bi morali naenkrat izolirati vse celice, jih združiti in zamrzniti, da bi jih lahko odmrznili, ko bi jih potrebovali za določen del poskusa. Pred tem smo morali preveriti preživetje celic po zamrzovanju.

Preglednica 1: Število celic pred zamrzovanjem in število živih celic po odmrznitvi

| | | |
|---------------|--|--|
| Ob zamrznitvi | $6,99 \times 10^7 (1 \pm 5,9 \times 10^6)$ | |
| Ob odmrznitvi | žive | mrtve |
| | $1,46 \times 10^7 (1 \pm 2,7 \times 10^6)$ | $6,9 \times 10^6 (1 \pm 1,41 \times 10^6)$ |

Ugotovili smo, da se živost celic z zamrzovanjem petkrat zmanjša. To pomeni, da je preživetje celic premajhno, da bi jih lahko uspešno uporabili za naš poskus. Za vsak poskus s primarnimi limfociti B smo si zato morali pripraviti sveže izolirane celice.

4.1.2 Optimizacija gojišč

Različne celice za svojo rast in razmnoževanje potrebujejo različne pogoje. Še posebej občutljive so primarne celice. Ker smo v našem poskusu pripravili primarno kulturo mišjih limfocitov B, smo s preizkušanjem različnih gojišč preverili, kje najbolj uspevajo.

Preglednica 2: Preživetje celic v različnih gojiščih

Koncentracija živih in mrtvih celic po dnevih od odmrznitve in nasaditve v gojitveno posodo v različnih gojiščih

| | žive v IMDM* | mrtve v IMDM* | žive v RPMI* | mrtve v RPMI* |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Ob odmrznitvi | $1,4 \times 10^6$ | $6,9 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^6$ | $6,9 \times 10^5$ |
| 2. dan | $2,3 \times 10^5$ | $3,2 \times 10^5$ | $2,8 \times 10^5$ | $2,3 \times 10^5$ |
| 4. dan | 0 | $8,1 \times 10^5$ | 3×10^5 | 7×10^5 |
| 7. dan | 0 | $1,9 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^5$ | 7×10^4 |

*to so osnovna gojišča, katerim je dodano samo 10% FBS

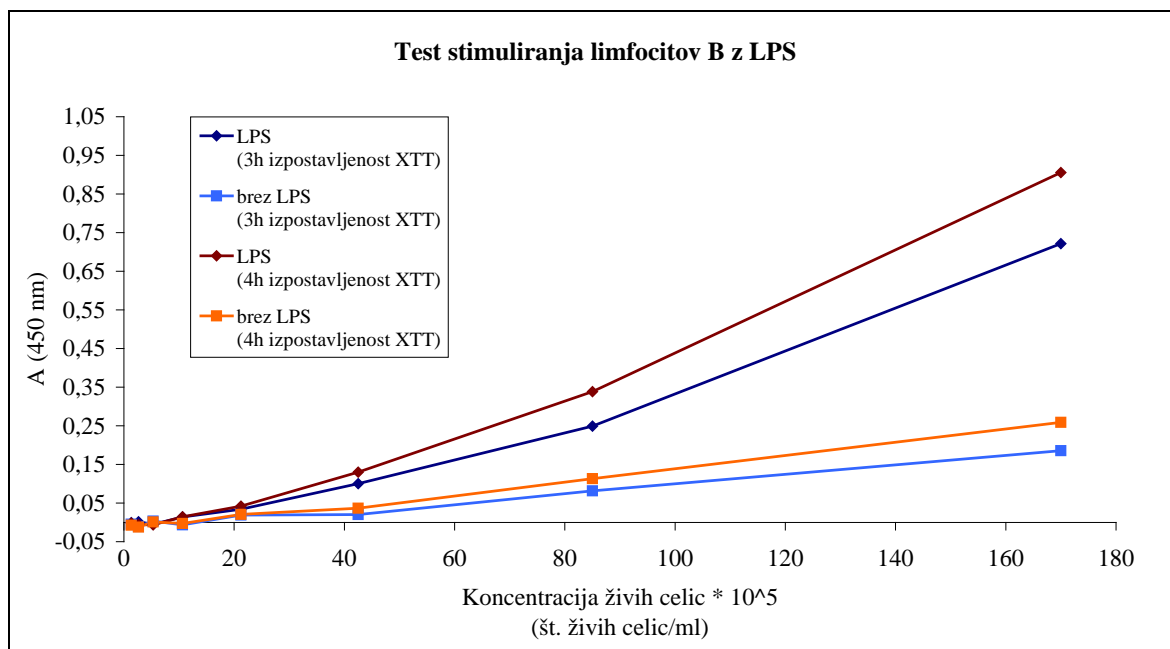
Pripravili smo dve različni gojišči: IMDM + 10 % FBS in RPMI + 10 % FBS. Gojišči se razlikujeta v vsebnosti L-glutamina. IMDM vsebuje L glutamin, medtem, ko ga RPMI ne. Ugotovili smo, da celice v RPMI veliko bolje uspevajo, kot v IMDM. Celice v IMDM so odmrle že po štirih dneh gojenja, medtem ko se je preživetje v RPMI zmanjšalo za 90 %, kar je, v primerjavi z zmanjšanjem preživetja v gojišču IMDM, dobro. Da bi preprečili potencialne okužbe z bakterijami, smo gojišču dodali tudi antibiotik gentamicin.

4.1.3 Optimizacija števila celic

Viabilnost celic smo merili s testom XTT. S testom merimo celično aktivnost in posredno lahko podamo informacijo o živosti celic. Po prvem izvedenem testu XTT smo dobili zelo nizke, oziroma negativne absorbance (rezultati niso prikazani). To pomeni, da so bile celice v času poskusa premalo metabolno aktivne, da bi lahko v določenem času pretvorile zadostno količino XTT reagenta v formazan, ki bi ga lahko zaznali. Ker časa inkubacije zaradi hitrega odmiranja primarnih limfocitov B nismo mogli podaljšati, smo se odločili, da povečamo količino celic v poskusu.

4.1.4 Stimulacija celičnega metabolizma

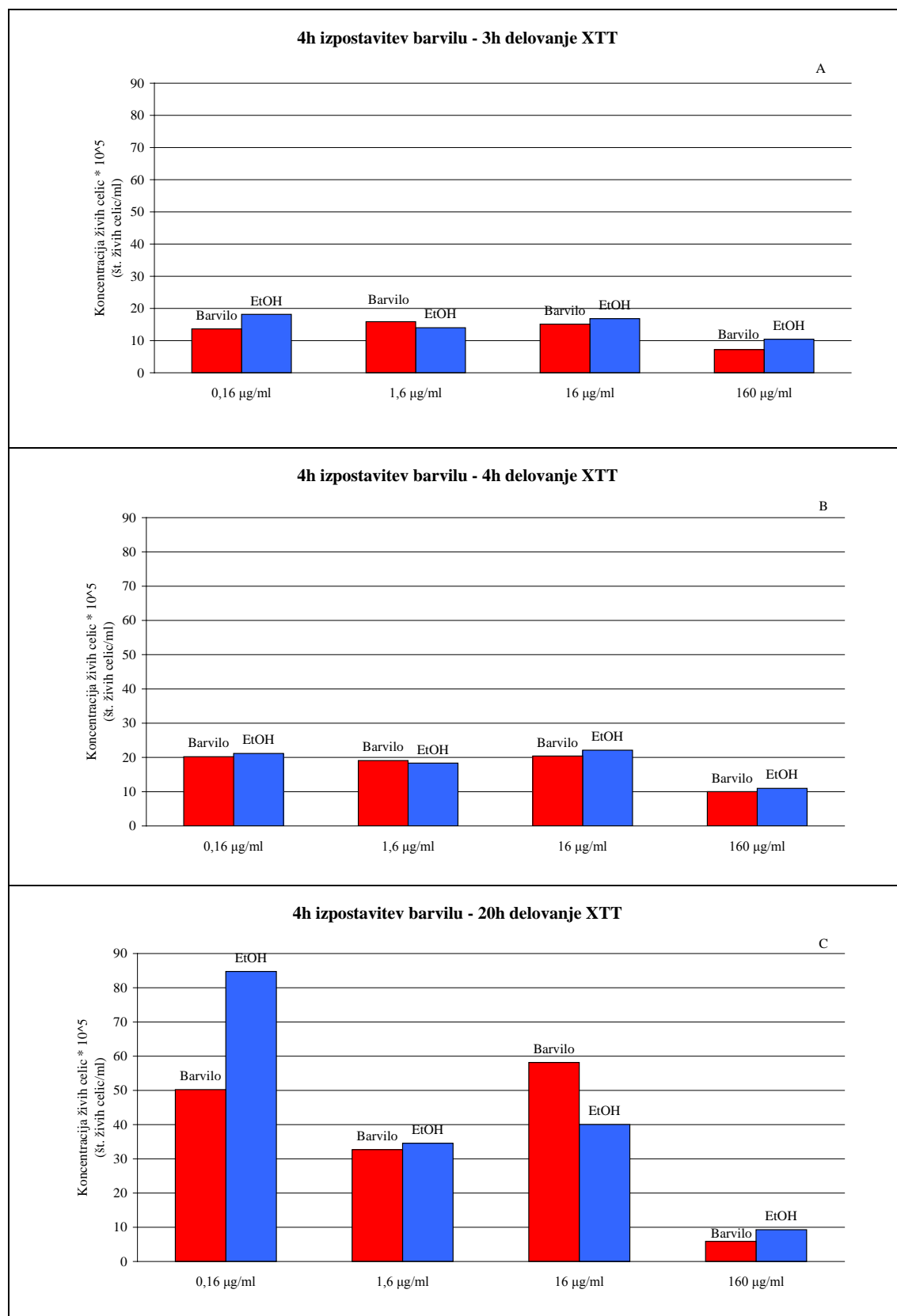
Celicam smo želeli zvečati metabolno aktivnost, da bi lahko merili živost celic s testom XTT. Celice smo stimulirali z lipopolisaharidom (LPS), ki inducira proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B.



Slika 5: Test stimuliranja limfocitov B z LPS.

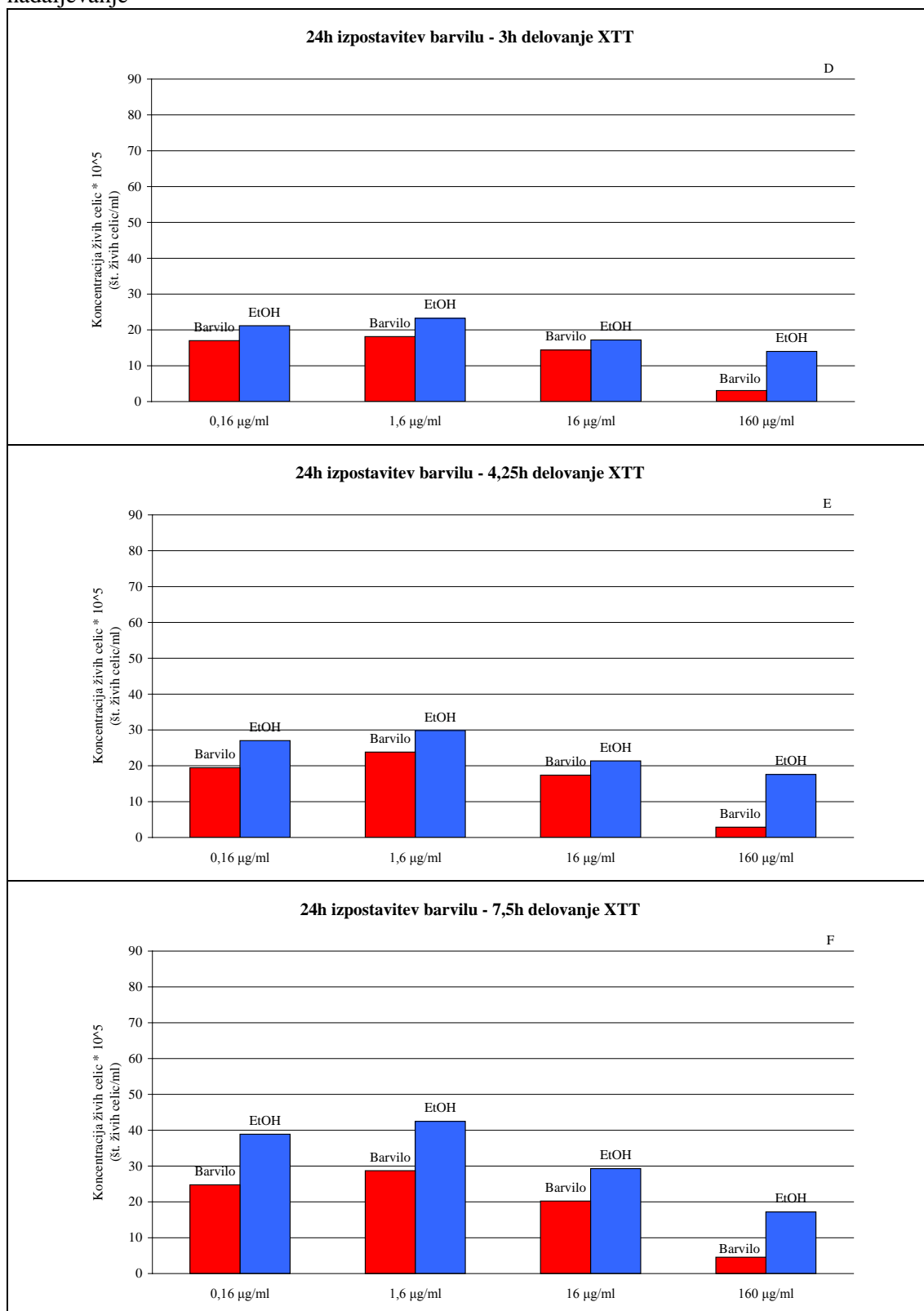
Določanje živosti celic z testom XTT, ob dodatku stimulusa z LPS in brez njega. Merjenje po 3h in 4h izpostavljenosti celic reagentu XTT.

Opazili smo, da so absorbance izmerjene pri višjih koncentracijah limfocitov B in z dodanim LPS, višje. To pomeni, da je rezultate lažje odčitavati in zaradi tega prihaja do manj napak. Opazili smo, da do opaznih razlik med stimuliranimi in nestimuliranimi celicami pride pri koncentracijah celic $3-4 \times 10^6$ celic/ml. Odločili smo se, da bomo na podlagi teh ugotovitev izvedli še test, kjer bomo ugotavljali, če tudi daljša izpostavljenost reagentu XTT, pri stimuliranih celicah s koncentracijo 3×10^6 celic/ml, privede do bolj zanesljivih rezultatov.



se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 6: Določanje optimalnega časa izpostavljenosti limfocitov B reagentu XTT.

Primarni limfociti B, ki smo jim dodali stimulus v obliki LPS, so bili izpostavljeni barvilu 4 ure (A,B,C) ali 24 ur (D,E,F). Po dodatku reagenta XTT smo celice še nadalje inkubirali 3, 4 ali 20 ur oziroma 3, 4,25 ali 7,5 ur. Deleži etanola so enaki tistim pri barvilu (0,0096 %, 0,096%, 0,96 % in 9,6 %)

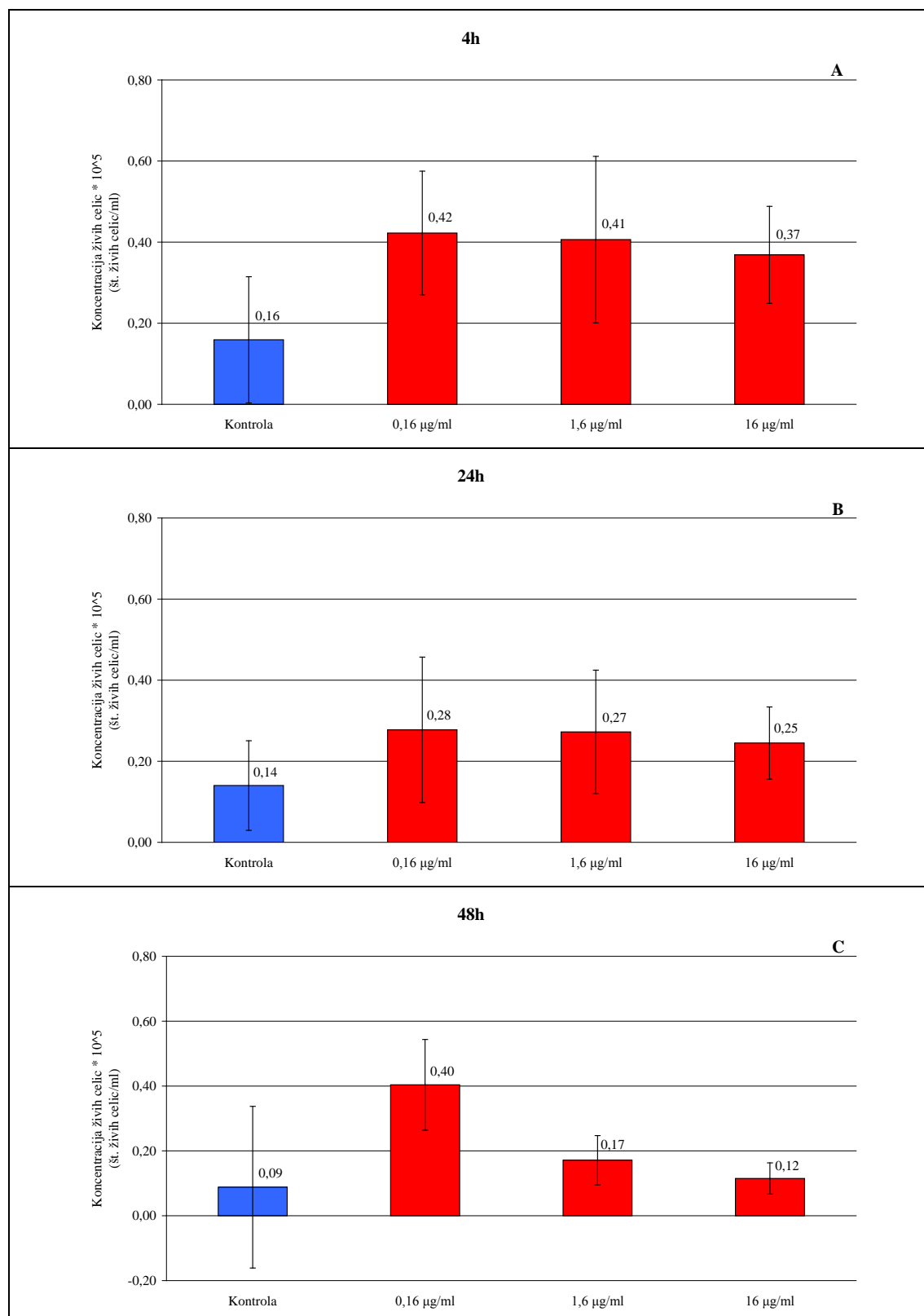
Pri optimizaciji pogojev za izvedbo testa XTT smo ugotovili, da je za pridobitev ustreznih podatkov dovolj 3 urna izpostavljenost reagentu XTT. Pri izpostavljenosti celic reagentu XTT za 4 ure in več, se bistveno podaljša tudi izpostavljenost barvilu, izoliranemu iz *Vibrio* sp., kar bi lahko vplivalo na naše rezultate. Odločili smo se, da nadaljujemo s testom tako, da bodo celice 3 ure izpostavljene reagentu XTT, hkrati pa smo povečali začetno število celic na 4×10^6 celic/ml in s tem povečali tudi presnovo reagenta za čim bolj jasne ter zanesljive rezultate.

Pri optimizaciji pogojev poskusa smo opazili tudi, da 9,6 % delež etanola v raztopini (takšen je tudi pri koncentraciji barvila 160 $\mu\text{g/ml}$) bistveno vpliva na preživetje celic, predvsem po 24 urni izpostavljenosti. Zato smo se odločili, da bomo v našem testu v nadaljevanju uporabljali le raztopine, kjer je delež etanola manjši od 9,6 %.

4.2 VPLIV BARVILA NA PREŽIVETJE LIMFOCITOV B

4.2.1 Vpliv barvila, ocenjen s štetjem celic, obarvanih s tripan modrim

Da bi ocenili, kakšni so učinki barvila na limfocite B, smo v prvih poskusih te učinke preverjali z enostavnejšo metodo, to je s štetjem celic, obarvanih s tripan modrim. Šteli smo celice, ki so bile izolirane iz istih živali, in izpostavljene enakim pogojem kot tiste, na katerih smo v naslednjem poskusu za oceno viabilnosti izvajali test XTT. Tehnika določanja živosti celic z barvanjem s tripan modrim temelji na oceni števila celic, kjer pa lahko prihaja do večjih napak in odstopanj, je pa ustrezna za kontrolo drugih testov za določanje živosti.



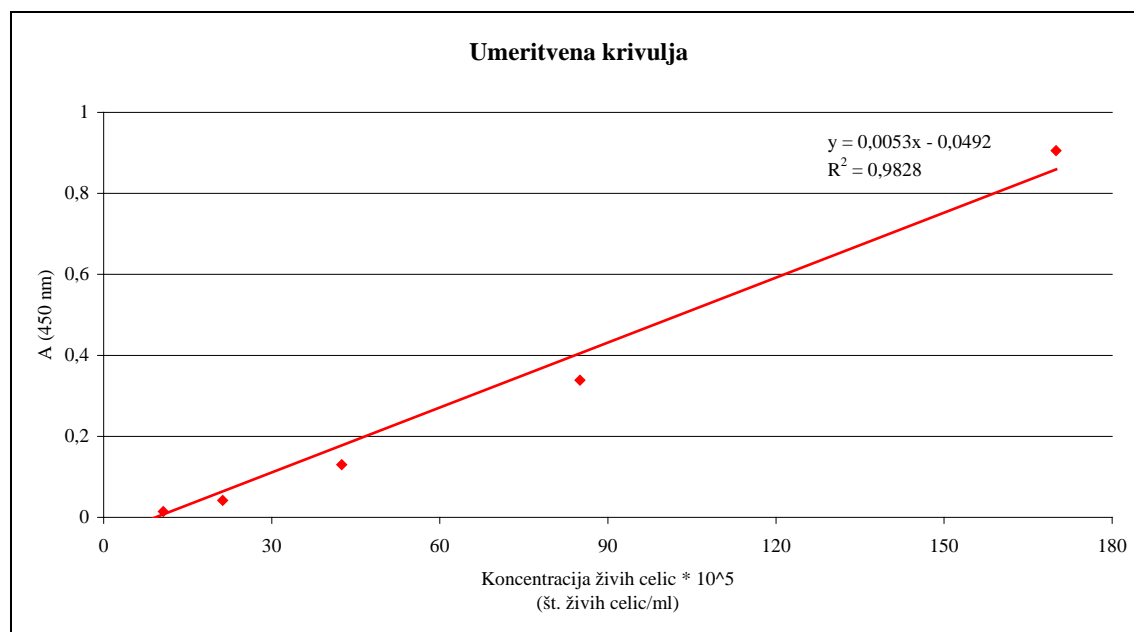
Slika 7: Določanje citotoksičnosti barvila s pomočjo štetja celic, obarvanih s tripan modrim.

Koncentracije živih primarnih limfocitov B, določene s štetjem celic po barvanju s tripan modrim barvilom, po 4-urni (A), 24-urni (B) in 48-urni (C) izpostavljenosti barvilu, izoliranem iz *Vibrio* sp., v različnih končnih koncentracijah. Začetna konc. celic je bila 1×10^6 celic/ml.

Iz slike 7-A vidimo, da je po štirih urah delovanja preživetje celic med različnimi koncentracijami pigmenta podobno. Po 24 urah (slika 7-B) število celic nekoliko upade, tudi pri kontroli, kar pomeni naravno odmiranje celic. Tudi po 24 urah nismo opazili, da bi imele različne koncentracije barvila različne učinke na celice. Po 48 urah izpostavljenosti barvilu (slika 7-C) smo opazili še nadaljnje zmanjšanje števila živih celic pri kontroli. Pri najmanjši koncentraciji barvila (0,16 $\mu\text{g/ml}$) izgleda, kot da je barvilo stimuliralo rast oziroma razmnoževanje celic, medtem ko se celice pri višjih koncentracijah barvila (1,6 in 16 $\mu\text{g/ml}$) niso razmnoževale, ampak so še naprej odmirale. Ne moremo zagotovo trditi, da je to posledica toksičnosti barvila, ampak je to verjetno trend naravnega odmiranja celic. Opazne so velike razlike med posameznimi ponovitvami poskusa, zato smo zaključili, da štetje celic, obarvanih s tripan modrim ni zanesljiva metoda. Opazili smo trend delovanja barvila, vendar zaradi razmeroma velikih napak nismo mogli podati zanesljivih zaključkov samo na podlagi tega testa.

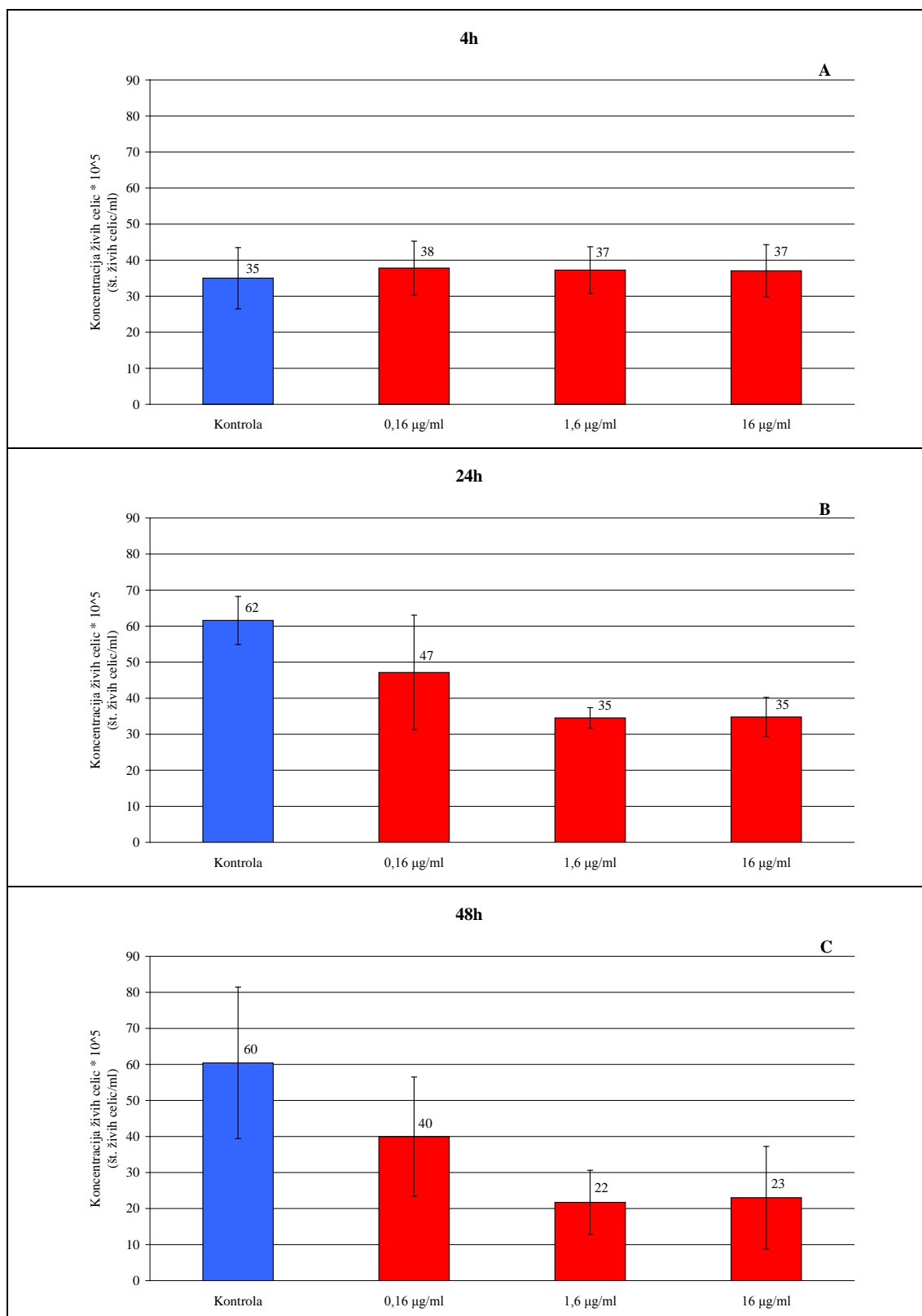
4.2.2 Test XTT

Test XTT deluje na podlagi pretvorbe tetrazolijeve soli v formazan, pri čemer pride do spremembe obarvanja, ki jo zaznamo z merjenjem absorbance pri 450 nm. Zanimala nas je koncentracija živih celic po izpostavitvi barvilu iz *Vibrio* sp., zato smo pripravili znane koncentracije celic (limfocitov B), ki smo jim živost določali s pomočjo testa XTT. Na podlagi pridobljenih podatkov smo narisali umeritveno krivuljo (slika 8), po kateri smo nato iz enačbe premice izračunali koncentracije preživelih celic.



Slika 8: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije živih primarnih limfocitov B s testom XTT.

S testom XTT smo želeli ugotoviti, koliko primarnih limfocitov B preživi izpostavljenost različnim koncentracijam barvila, izoliranega iz *Vibrio* sp., v različnih časih.

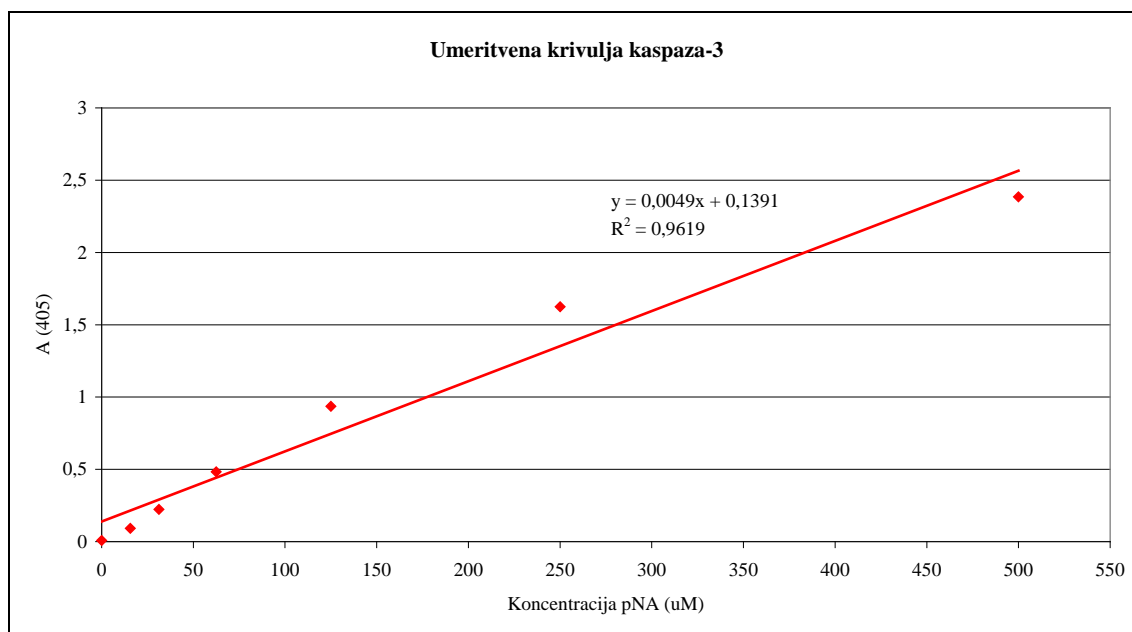


Slika 9: Koncentracija živih primarnih limfocitov B, določena s testom XTT, po 4-urni (A), 24-urni (B) in 48-urni (C) izpostavljenosti barvilu (in 3 urnem delovanju reagenta XTT) v različnih končnih koncentracijah. Začetna koncentracija celic je bila 4×10^6 celic/ml.

Po 4 urah izpostavljenosti barvilu (slika 9-A) smo ugotovili, da barvilo nima vpliva na rast ali odmiranje celic. Po 24 urni izpostavljenosti barvilu (slika 9-B) smo opazili povečanje števila celic pri kontroli in najmanjši koncentraciji barvila (0,16 $\mu\text{g/ml}$). Rast in razmnoževanje celic je verjetno posledica stimulacije z LPS. Pri višjih koncentracijah (1,6 in 16 $\mu\text{g/ml}$) ne pride do povečanja koncentracije celic. Lahko, da so se celice razmnoževale, vendar je nato nanje negativno vplivalo barvilo in so odmrle, lahko pa je barvilo, ki je bilo v malo višji koncentraciji, reagiralo z LPS in zato celice sploh niso bile stimulirane. Pri tem času izpostavljenosti in pri teh najvišjih koncentracijah barvila bi lahko to delovalo tudi citostatično, kar pomeni, da so se celice prenehale razmnoževati, niso pa odmrle. Po 48 urni izpostavljenosti barvilu (slika 9-C) smo opazili, da celice v kontroli niso odmirale, vendar se njihova koncentracija ni več povečala. To pomeni, da so se prenehale razmnoževati. Kjer pa je bilo dodano barvilo, se je koncentracija celic zmanjšala. Pri najnižji koncentraciji barvila (1,6 $\mu\text{g/ml}$) le do začetne koncentracije celic, pri večjih koncentracijah barvila (1,6 in 16 $\mu\text{g/ml}$) pa se je koncentracija celic še nekoliko zmanjšala, kar je verjetna posledica odmiranja celic zaradi vpliva barvila.

4.3 MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3

Merjenje kaspaze-3 je zelo razširjena metoda za dokazovanje celične apoptoze, vendar pa ni edina. Celice lahko izvršujejo apoptozo tudi preko drugih poti in molekul. Aktivnost kaspaze-3 je izražena v količini pNA v vzorcu, ki jo merimo z absorbanco pri valovni dolžini 405 nm. Za določanje razmerja med absorbanco in količino pNA smo si pripravili umeritveno krivuljo natančno po navodilih proizvajalca.



Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje aktivnosti kaspaze-3

Celice smo izpostavili barvilu, izoliranem iz *Vibrio* sp., v koncentracijah 16 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$ in 0,16 $\mu\text{g/ml}$ za 24 ur. Nato smo izmerili aktivnost kaspaze-3 v posameznih vzorcih.

Preglednica 3: Ugotavljanje aktiviranja kaspaze-3 v vzorcih z merjenjem absorbance pri 405 nm

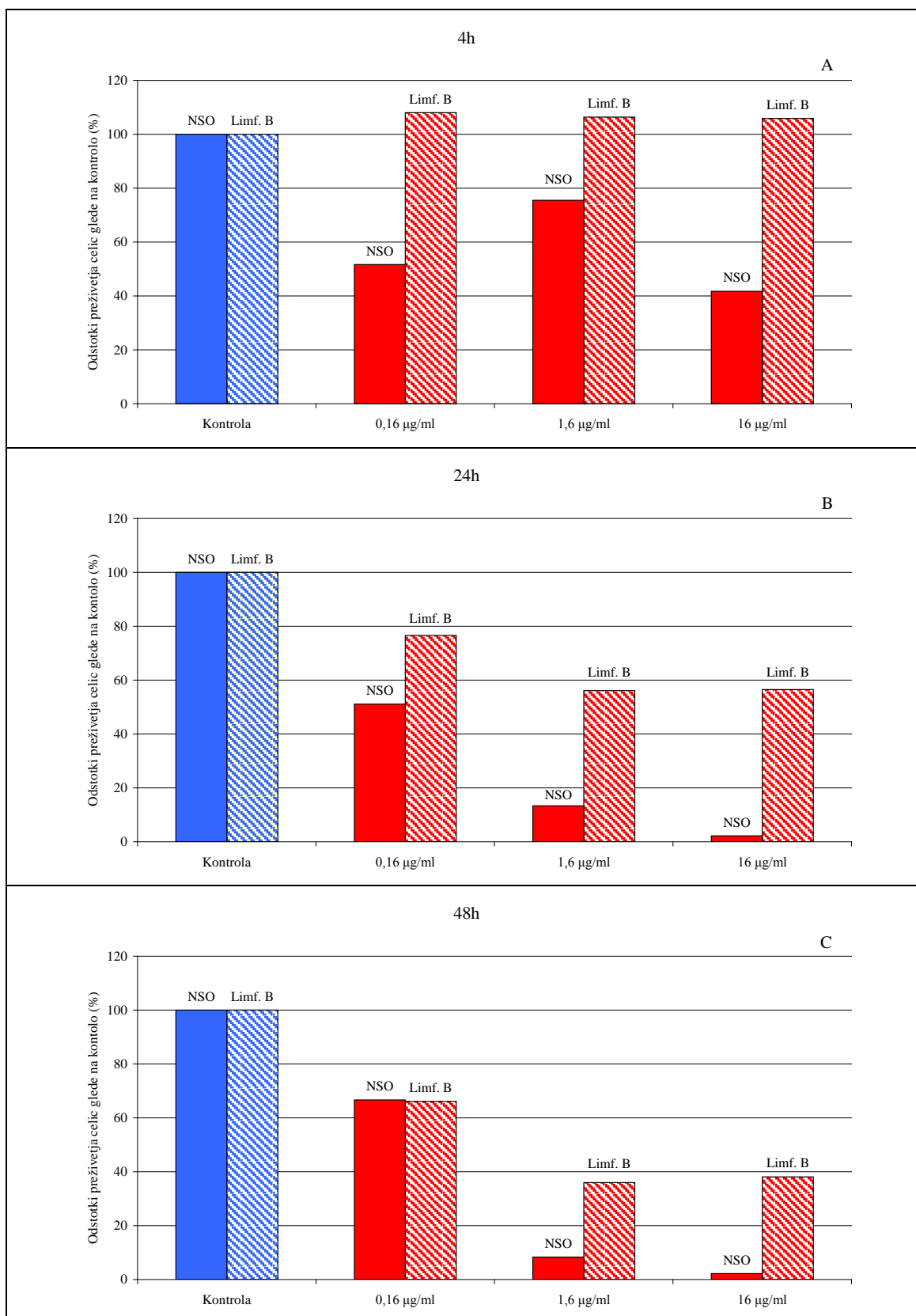
| Koncentracija barvila | Izmerjena absorbanca A_{405} | Izračunana aktivnost kaspaze-3 |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 16 $\mu\text{g/ml}$ | 0,0165 | -1,67 |
| 1,6 $\mu\text{g/ml}$ | 0,0225 | -1,59 |
| 0,16 $\mu\text{g/ml}$ | 0,0215 | -1,60 |
| Kontrola | 0,0208 | -1,61 |

Izmerjena absorbanca v vzorcu in kontroli je bila tako nizka, da predpostavljamo, da v izmerjenih vzorcih ni bilo pNA, kar pomeni, da tudi ni bilo aktivacije kaspaze-3.

4.4 PRIMERJAVA DELOVANJA BARVILA NA LIMFOCITE B IN CELIČNO LINIJO NSO

V svoji diplomski nalogi je Krošnjak (2011) dokazala, da barvilo, izolirano iz *Vibrio* sp. DSM 14379, citotoksično vpliva na preživetje celične linije NSO. Celice iz celične linije NSO so po izvoru celice mišjega mieloma, torej so izvorno limfociti B in izvirajo iz enakega seva miši (BALB/c), kot smo jih mi uporabljali v našem poskusu. Torej gre za celice enakega izvora, kot smo jih uporabljali pri našem poskusu, le da so celice NSO rakavo transformirane. Naš namen je bil pokazati, da to barvilo nima citotoksičnega učinka na primarne limfocite B.

Naredili smo še primerjavo rezultatov citotoksičnega delovanja barvila na primarne limfocite B in celice mišjega mieloma (NSO).



Slika 11: Primerjava delovanja barvila na limfocite B in celično linijo NSO.

Odstotki živih celic po 4-urni (A), 24-urni (B) in 48-urni (C) izpostavljenosti barvilu v različnih končnih koncentracijah.

Že po štirih urah delovanja barvila na celice smo opazili, da se zmanjša preživetje celic mišjega mieloma, medtem ko preživetje primarnih limfocitov B ostaja približno enako kot pri kontroli.

Po 24 urah pa smo opazili bistveno zmanjšanje preživetja celic NSO. Predvsem pri največji koncentraciji barvila (16 $\mu\text{g/ml}$), kjer preživelih celic praktično ni več. Tudi na primarne limfocite barvilo po 24 urah že vpliva, vendar kljub temu ostaja živih več kot polovica celic. Po 48 urah se preživetje tako primarnih limfocitov B kot tudi celične linije NSO še za nekoliko zmanjša.

Ugotovili smo, da citotoksičnost barvila pri nobenem od izmerjenih časov in nobeni od izmerjenih koncentracij ni tako velika, da bi propadli vsi primarni limfociti B, je pa barvilo že po 24 urah, pa tudi po 48 urah, in pri koncentracijah 1,6 in 16 $\mu\text{g/ml}$ zelo močno citotoksično za celice mišjega mieloma (NSO), kjer pri koncentraciji 16 $\mu\text{g/ml}$ odmrejo praktično vse celice.

Dobljene rezultate smo primerjali še z rezultati iz drugih raziskav (preglednica 4) in ugotovili, da se naši rezultati ujemajo z njihovimi rezultati. Prodigiozini na rakave celice in celične linije delujejo bolj citotoksično, pri nižjih koncentracijah in ob krajših časih izpostavljenosti, kot na nerakave celice in celične linije.

Preglednica 4: Primerjava vpliva prodigiozinov na različne celice

V prvem delu so podatki za nerakave celice in celične linije, v drugem delu pa za rakave celice in celične linije. S senčenjem so označeni rezultati našega poskusa na primarnih mišjih limfocitih B in rezultati na enakih transformiranih celicah celične linije NSO (Krošnjak, 2011).

| | celice/ celična linija | vir barvila | metoda | konc. barvila | čas inkubacije | učinek | vir |
|------------------------------------|---|---|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Nerakave celice oz. celične linije | vranične celice | <i>Serratia marcescens</i> B- 1231 | monoklon. protitelesa in FACS | 0,3 – 100 nM | 1, 2, 3 dni | ni vpliva | Han in sod., 1998 |
| | | | | 100 - 30000 nM | 1, 2, 3 dni | upad celične viabilnosti | |
| | NIH-3T3 | <i>Serratia marcescens</i> 2170 | MTT | 1 – 10 µg/ml | 4 h | ni vpliva | Montaner in sod., 2000 |
| | MDCK | <i>Serratia marcescens</i> 2170 | MTT | 1 – 10 µg/ml | 4 h | ni vpliva | Montaner in sod., 2000 |
| | primarni mišji limfociti B | <i>Vibrio</i> sp. | XTT | 0,16 µg/ml | 4, 24 ur | ni vpliva | naša študija |
| 1,6 – 16 µg/ml | | | | 24, 48 ur | upad celične viabilnosti | | |
| Rakave celice oz. celične linije | Jurkat | <i>Serratia marcescens</i> 2170 | MTT | 1 – 10 µg/ml | 4 h | upad celične viabilnosti | Montaner in sod., 2000 |
| | NSO | <i>Serratia marcescens</i> 2170 | MTT | 5 – 10 µg/ml | 4 h | upad celične viabilnosti | Montaner in sod., 2000 |
| | HL-60 | <i>Serratia marcescens</i> 2170 | MTT | 1 – 10 µg/ml | 4 h | upad celične viabilnosti | Montaner in sod., 2000 |
| | Ramos | <i>Serratia marcescens</i> 2170 | MTT | 1 – 10 µg/ml | 4 h | upad celične viabilnosti | Montaner in sod., 2000 |
| | celice B kronične limfocitne levkemije | <i>Serratia marcescens</i> | MTT | 40 – 190 nM | 48 ur | upad celične viabilnosti | Campas in sod., 2003 |
| | rak dojka | <i>Serratia marcescens</i> 2170 | MTT | 0 – 2,7 µM | 4, 8, 16, 24 ur | upad celične viabilnosti | Soto- Cerrato in sod., 2004 |
| | NSO | <i>Vibrio</i> sp. | XTT | 0,16 – 160 µg/ml | 4, 24, 48 ur | upad celične viabilnosti | Krošnjak, 2011 |

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Prodigiozini so zelo obetajoče protirakave snovi. Bistvo le teh pa je, da selektivno delujejo na rakave celice. Predhodni rezultati (Krošnjak, 2011), so potrdili citotoksično delovanje barvila na celično linijo NSO, ki ima značaj rakastih celic. Namen naše naloge je bil, da preizkusimo hipotezo o selektivnem delovanju barvila, izoliranega iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379 in sicer tako, da preverimo morebiten citotoksičen vpliv, tudi na nerakave celice, v tem primeru primarne mišje limfocite B, izolirane iz miši BALB/c.

5.1 OPTIMALNI POGOJI ZA IZVEDBO TESTA

Pred začetkom poskusa z barvilom smo morali zagotoviti primerne pogoje za izvedbo poskusa: izolirati ustrezne celice, zagotoviti primerno rastno gojišče ter določiti optimalno število celic za izvedbo poskusa. Celice smo izolirali iz vranic mišk BALB/c ter limfocite B ločili od ostalih celic s pomočjo komercialnega kompleta reagentov za ločevanje mišjih limfocitov B na magnetnem celičnem separatorju. Nato smo celice nasadili v več različnih gojišč, da bi ugotovili v katerem bodo celice najbolj uspevale. Po preizkušanju različnih gojišč smo se na koncu odločili za gojišče RPMI z dodatkom 10 % FBS, glutamina, β -merkaptetanola in HEPES-a. Da bi preprečili potencialne okužbe z bakterijami, smo gojišču vedno dodajali tudi antibiotik gentamicin.

Zaradi racionalizacije poskusa smo želeli celice po izolaciji zamrzniti, da bi jih lahko za vsak poskus sproti odmrznili. To bi bilo dobro, ker bi imeli vedno opraviti s povsem istimi celicami. Zamrzovanje primarnih limfocitov se je izkazalo za neučinkovito, saj se je pri zamrzovanju in odmrzovanju preživetje celic za petkrat zmanjšalo. Zato smo si za vsak poskus pripravili sveže primarne limfocite B po čim bolj standardizirani metodi.

Limfociti B, ki smo jih izolirali iz mišjih vranic, so mirujoči in imajo posledično nizko metabolno aktivnost. Za izvedbo testa XTT pa potrebujemo celice, ki tetrazolijevo sol učinkovito pretvorijo v formazan, da bi dobili ustrezne rezultate. Zato smo celicam vedno dodajali še stimulans lipopolisaharid (LPS). LPS inducira proliferacijo in diferenciacijo limfocitov B (Venkataraman in sod., 1999), hkrati pa ne moti poskusa s prodigiozinom (Han in sod., 1998). S poskusi smo ugotovili, da mora biti koncentracija limfocitov B čim višja. V poskusih smo zato uporabljali koncentracijo limfocitov B 4×10^6 celic/ml. To je najnižja koncentracija, pri kateri so limfociti še zadostno reagirali z reagentom XTT, da smo lahko dobili jasne rezultate.

5.2 VPLIV BARVILA NA PREŽIVETJE LIMFOCITOV B

Uspeli smo potrditi hipotezo, da barvilo, izolirano iz *Vibrio* sp. DSM 14379, deluje selektivno vsaj v nekaterih koncentracijah in časih. Ugotovili smo, da na primarne limfocite B deluje citotoksično v mnogo manjšem obsegu kot na celice NSO. Dokazali smo, da v visokih koncentracijah sicer deluje citotoksično tudi na primarne mišje limfocite B, ki so bili predhodno stimulirani z lipopolisaharidom, kljub temu pa niti pri najvišjih koncentracijah barvila ne odmrejo vse celice. Vsaj 30 % celic preživi tudi pri najvišji koncentraciji barvila (16 $\mu\text{g/ml}$) in po najdaljšem času (48 ur).

Preživetje celic smo določali z dvema metodama, in sicer s štetjem celic, obarvanih s tripan modrim in s testom XTT, kjer smo merili metabolno aktivnost živih celic. Tako s štetjem, kot s testom XTT, smo ugotovili, da se začne citotoksičen vpliv rdečega barvila izoliranega iz *Vibrio* sp. šele po daljši izpostavljenosti le-temu (24-48 ur) in pri višji koncentraciji (16 $\mu\text{g/ml}$ ter 1,6 $\mu\text{g/ml}$).

Določanje števila živih celic z barvanjem s tripan modrim in štetjem ni povsem zanesljiva metoda, saj pri tem pogosto pride do večjih napak. V našem primeru so se napake pokazale že pri štetju celic iz kontrole. Največja koncentracija živih celic bi morala biti pri kontroli, pri nas pa smo opazili, da naj bi bilo tam manj celic. Tega ne moremo zagotovo trditi, kajti napake so prevelike. Zato smo to metodo uporabili le kot

preliminaren test za oceno vseh parametrov, smo pa z njo tudi preverili ali test z XTT deluje pravilno. Testiranje z XTT je bolj dovršena metoda za ugotavljanje celične aktivnosti (živosti). Izkazalo se je, da lahko ne glede na uporabljeno metodo za oceno viabilnosti, podamo enake sklepe o citotoksičnosti barvila izoliranega iz *Vibrio* sp.

Delovanje barvila na celice smo preizkušali v treh različnih časih (4 ure, 24 ur in 48 ur) in pri treh redčenjih barvila (0,16, 1,6 in 16 $\mu\text{g/ml}$). Za kontrolo smo uporabili različna redčenja etanola. V teh redčitvah so bili deleži etanola enaki tistim pri posameznih redčitvah raztopine barvila.

Po 4 urah delovanja nismo opazili citotoksičnega vpliva na celice. Koncentracija celic je bila enaka tako pri vseh razredčinah barvila, kot tudi pri kontroli. To pomeni, da barvilo po kratkem času izpostavljenosti ni toksično za primarne limfocite B.

Po 24 urah inkubacije z barvilom smo pri kontroli opazili podvojeno koncentracijo celic, ki je zelo verjetno posledica stimulacije z LPS. Povečana koncentracija celic je bila tudi pri najnižji razredčini barvila, medtem ko pri višjih koncentracijah barvila ne opazimo povečanja koncentracije celic, temveč zmanjšanje. Predvidevamo, da so se celice tudi pri višjih koncentracijah barvila razmnoževale, vendar je nanje že citotoksično vplivalo barvilo. Koncentracija celic je bila pri nižjih razredčinah barvila (1,6 in 16 $\mu\text{g/ml}$) manjša kot pri kontroli in manjša kot pri testu po štirih urah. Vseeno pa je bilo pri obeh najvišjih koncentracijah barvila živih še več kot polovica celic, glede na kontrolo.

Po 48 urah smo opazili še malenkostno znižanje koncentracije celic pri višjih koncentracijah barvila, vendar vse celice še vedno niso mrtve. Pravzaprav je živih še več kot 30 % celic, glede na kontrolo. Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvami Hana in sodelavcev (1998), ki so ugotovili, da se preživetje limfocitov ob izpostavljenosti koncentracijam prodigiozina višjim od 100 nM in po izpostavljenosti 2 ali 3 dni, zmanjša, vendar niti pri koncentracijah do 1000 nM ne odmrejo vse celice. Pri koncentracijah prodigiozina nižjih od 100 nM pa preživetje celic sploh ne zmanjša. Prav tako so Montaner in sodelavci (2000) ugotavljali, da na nerakave celične linije

prodigiozin s koncentracijami od 1 µg/ml do 10 µg/ml, v času od 4 do 24 ur izpostavljenosti, nima vpliva na preživetje celic, medtem ko začnejo rakave celične linije Jurkat, HL-60 in Ramos odmirati že pri koncentraciji prodigiozina 1 µg/ml, NSO pa pri le nekoliko višji koncentraciji.

5.3 MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3

Apoptoze pri primarnih limfocitih B z merjenjem aktivnosti kaspaze-3 nismo dokazali. Aktivnost kaspaze-3 smo merili po 24 urah delovanja pri koncentracijah barvila 16 µg/ml, 1,6 µg/ml in 0,16 µg/ml. Kot smo ugotovili pri poskusu z XTT, po 24 urah tudi pri najvišji koncentraciji barvila odmrle manj kot polovica celic. Premajhna količina odmrlih celic in posledično premajhna koncentracija aktiviranih kaspaz-3 bi lahko bila vzrok temu, da nismo zaznali aktiviranja kaspaze-3 in s tem apoptoze. Kaspazo-3 smo si za testiranje izbrali zato, ker je Krošnjak (2011) v svojem poskusu ugotavljala, da se pri celicah NSO, ki so bile izpostavljene istemu barvilu, kot naši limfociti B, aktivira kaspaza-3. Celice NSO so po izvoru enake našim celicam, le da so transformirana celična linija, ki predstavlja rakave celice.

Montaner in sodelavci (2000), Campas in sodelavci (2003) ter Soto-Cerrato in sodelavci (2004) pa so dokazovali apoptozo preko aktiviranja kaspaze-9 (pa tudi drugih). Potrdili so, da je apoptoza, ki so jo sprožili preučevani prodigiozini, potekala preko mitohondrijske poti (pot 4 na sliki 2). Montaner in sodelavci (2005) so potrdili tudi, da prodigiozini neposredno poškodujejo DNA in tako sprožijo apoptozo celice. To pomeni, da bi lahko bil vzrok, da nismo dokazali aktiviranja kaspaze-3 pri celicah, ki so odmrle, da apoptoza ni bila sprožena po poti, ki bi vključevala aktiviranje kaspaze-3. Možno je, da barvilo po 24 urah deluje citostatično, kar pomeni, da so se celice nehale deliti, niso pa še bile na poti v apoptozo. Zanimivo bi bilo preveriti, ali pride do aktivacije kaspaze-3 po 48 urah delovanja barvila, vendar tega zaradi velikega števila primarnih celic, potrebnih za izvedbo poskusa, nismo naredili. Prav tako bi lahko preverili, ali se morda odmiranje celic sproži po poti apoptoze, ki vključuje druge kaspaze in ali inkubacija celic z barvilom povzroči razgradnjo DNA.

5.4 PRIMERJAVA DELOVANJA BARVILA NA LIMFOCITE B IN CELIČNO LINIJO NSO

Naredili smo še primerjavo vpliva barvila na primarne limfocite B in celice iz celične linije NSO, ki predstavljajo rakave celice. Raziskavo vpliva na celično linijo NSO je opravila Krošnjak (2011). Ugotovili smo lahko, da barvilo, izolirano iz *Vibrio* sp., deluje mnogo bolj citotoksično na rakave celice (NSO), kot na primarne limfocite B. Že po štirih urah delovanja barvila celice NSO pričnejo odmirati, medtem ko se preživetje primarnih limfocitov ne zmanjša. Po 24 in 48 urah barvilo še bolj citotoksično deluje na rakave celice (NSO). Že po 24 urah pri najvišji koncentraciji barvila preživelih celic NSO praktično ni več, medtem ko še po 48 urah pri najvišji koncentraciji barvila preživi vsaj 30 % primarnih limfocitov B. Iz tega lahko sklepamo, da to prodigiozinu podobno barvilo deluje selektivno citotoksično na rakave celice, na nerakave, primarne limfocite B, pa ne oziroma ima bistveno manjši citotoksičen vpliv.

V čem je razlika med primarnimi limfociti B in celicami NSO, da na prve deluje barvilo manj citotoksično, kot na druge, nismo posebej ugotavljali. Edina razlika, ki smo jo dokazali z našimi poskusi in poskusi, ki jih je izvedla Krošnjak (2011) je, da se pri celicah NSO ob izpostavljenosti barvilu izoliranemu iz *Vibrio* sp. aktivira kaspaza-3, pri primarnih limfocitih B pa ne.

Naredili smo primerjavo rezultatov dosedanjih raziskav z našimi rezultati (preglednica 4) in ugotovili, da so vsi dobili zelo podobne rezultate. Prodigiozini na rakave celice in celične linije delujejo bolj citotoksično, pri nižjih koncentracijah ter ob krajših časih izpostavljenosti, kot na nerakave celice in celične linije. To pomeni, da bi lahko bilo to barvilo potencialna protirakava učinkovina.

5.5 SKLEPI

- Barvilo, izolirano iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379, po 4 urah delovanja ni imelo nobenega vpliva na celično viabilnost ne glede na koncentracijo barvila.
- Barvilo pri višjih koncentracijah (1,6 in 16 $\mu\text{g/ml}$) po 24 urah delovanja povzroča upad celične viabilnosti za približno 5 %.
- Barvilo pri višjih koncentracijah (1,6 in 16 $\mu\text{g/ml}$) po 48 urah delovanja povzroči nadaljnje upadanje celične viabilnosti, vendar ne odmrejo vse celice.
- Več kot 30 % primarnih limfocitov B preživi tudi ob dolgi izpostavljenosti in visoki koncentraciji barvila, izoliranega iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379.
- Rezultati, dobljeni z dvema metodama za oceno viabilnosti so nas pripeljali do enakih zaključkov, vendar je pri štetju celic s tripan modrim prišlo do večjih odstopanj, zato sklepamo, da je test XTT bolj primeren za kvantitativno določanje odstotka preživelosti celic.
- Aktivnosti kaspaze-3 kljub odmiranju manjšega števila limfocitov B, nismo dokazali.
- Barvilo, izolirano iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379, je bolj citotoksično za celice celične linije NSO, kot pa za primarne mišje limfocite B.

6 POVZETEK

Prodigiozini so rdeča barvila, ki jih različne bakterije proizvajajo kot sekundarne učinkovine v obliki kromoforov. Prodigiozini imajo širok spekter delovanja. Delujejo antibiotsko, imunosupresivno in tudi protirakavo. Imajo tudi veliko sorodnih molekul, tako imenovanih prodigizinu podobnih barvil, z enako prodigininsko verigo in različnimi alkilnimi substituenti.

V diplomski nalogi smo ugotavljali, ali prodigiozinu podobno barvilo, izolirano iz bakterije *Vibrio* sp. DSM 14379, deluje citotoksično na primarne mišje limfocite B, tako da smo limfocite B za 4, 24 in 48 ur izpostavili različnim koncentracijam barvila. Preživetje celic smo spremljali z metodo barvanja celic s tripan modrim in štetjem pod mikroskopom ter z merjenjem metabolne aktivnosti celic s testom XTT.

Pri metodi določevanja preživetja limfocitov B z barvanjem s tripan modrim in štetjem so se pojavila večja odstopanja med posameznimi ponovitvami poskusa. Napake pri štetju so bile prevelike, da bi iz njih lahko zagotovo sklepali o citotoksičnosti prodigiozinu podobnega barvila iz *Vibrio* sp. na limfocite B. Kljub temu smo iz rezultatov lahko razbrali tendenco delovanja barvila na celice B, ki smo ga nato potrdili tudi s testom XTT.

Preživetje limfocitov B smo spremljali tudi s testom XTT, ki deluje na podlagi metabolne aktivnosti celic. Ugotovili smo, da se število preživelih limfocitov B zmanjša tam, kjer so bile celice dalj časa izpostavljene višjim koncentracijam barvila. Pri nobeni koncentraciji barvila (0,16 µg/ml, 1,6 µg/ml in 16 µg/ml) ali času izpostavljenosti pa niso odmrle vse celice, povsod je preživela vsaj približno tretjina celic.

Ker so prejšnje študije pokazale, da prodigiozinu podobna barvila delujejo citotoksično predvsem na rakave celice, smo želeli naše rezultate primerjati z rezultati delovanja barvila na rakavo mišjo celično linijo limfocitov B – celično linijo NSO. Gre torej za celično linijo enakega izvora, kot celice, ki smo jih uporabili v našem poskusu, le da so celice NSO rakavo transformirane. Primerjava delovanja istega barvila na obe celični

liniji je pokazala, da ob enakih časih izpostavljenosti barvilu pri enakih koncentracijah, odmre bistveno več celic celične linije NSO, kot primarnih limfocitov. Pri pogojih, kjer je živih vsaj še tretjina limfocitov B, odmrejo že vse celice celične linije B. Iz teh podatkov bi lahko sklepali, da je to barvilo, izolirano iz *Vibrio* sp., potencialna protirakava učinkovina.

Na primarnih mišjih limfocitih B, ki so bili izpostavljeni barvilu, smo preizkušali tudi aktivnost kaspaze-3, ki je običajno udeležena pri sprožitvi apoptoze celic. Aktivnosti kaspaze-3 nismo dokazali, ker je bilo aktivirane kaspaze-3 premalo, da bi jo lahko izmerili, ali ker se je apoptoza pri celicah, ki so odmrele, aktivirala po drugi poti.

V nadaljevanju bi bilo zanimivo preveriti delovanje tega barvila še na drugih primarnih in ustreznih rakavih celicah in še natančneje določiti koncentracije pri katerih barvilo deluje. Ob tem pa na limfocitih B in celični liniji NSO določiti natančno pot apoptoze, ki jo to barvilo sproži.

7 VIRI

APOPCYTO™ Caspase-3 Colorimetric Assay Kit. 2004. Japonska, MBL: 5 str.

Arends M. J., Wyllie A. H. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology.
International Review of Experimental Pathology, 32: 223-256

B Cell Isolation Kit, mouse. Miltenyi Biotec.

http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/196/DS130_090_862.pdf
(8. nov. 2010)

Bryson G. J., Harmon B. V., Collins R. J. 1994. A flow cytometric study of cell death:
failure of some models to correlate with morphological assessment. Immunology
and Cell Biology, 72: 35-41

Campas C., Dalmau M., Montaner B., Barragan M., Bellosillo B., Colomer D., Pons G.,
Perez-Tomas R., Gil J. 2003. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from
B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 17: 746-750

Colombo P., Gunnarsson K., Iatropoulos M., Brughera M. 2001. Toxicological testing
of cytotoxic drugs. International Journal of Oncology, 19: 1021–1028

Demain A. L. 1995. Why do microorganisms produce antimicrobials? In Fifty Years of
Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends (Society for General
Microbiology Symposium no. 53). Cambridge, Cambridge University Press: 205–
228

Focosi D. Cell culture.

http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology/cellculture.html (5.
apr. 2011)

- Furstner A. 2003. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: A survey of the last 2500 years. *Angewandte Chemie International Edition*, 42: 3582-3603
- Gaughran E. R. L. 1969. From superstition to science: the history of a bacterium. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 31: 3-24
- Gerber N.N. 1975. Prodigiosin-like pigments. *Critical Reviews in Microbiology*, 3: 469-485
- Han S. B., Kim H. M., Kim Y. H., Lee C. W., Jang E. S., Son K. H., Kim S. U., Kim Y. K. 1998. T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *International Journal of Immunopharmacology*, 20: 1-13
- Jordan M. A., Wilson L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews, Cancer*, 4: 253–265
- Knasmuller S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W.W., Hoelzl C., et al. 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198: 315–328
- Koppal T. 2004. Advancing in vitro ADME/Tox. *Drug Discovery and Development*, 5: 47–50
- Krošnjak A. 2011. Ugotavljanje citotoksičnosti rdečega pigmenta bakterije *Vibrio* sp. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 66 str.
- Li W., Choy D., Lam M., Morgan T., Sullivan M. E., Post J. M. 2003. Use cultured cells of kidney origin to assess specific cytotoxic effects of nephrotoxins. *Toxicology In Vitro*, 17: 107–113

- Martinez-Zaguilan R., Lynch R. M., Martinez G. M., Gillies R. J. 1993. Vacuolar-type H-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *American Journal of Physiology*, 265: 1015-1029
- Meyer O. 2003. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, 140: 21-30
- Molinski T. F., Dalisay D. S., Lievens S. L., Saludes J. P. 2009. Drug development from marine natural products. *Nature*, 8: 69-85
- Montaner B. et al. 2000. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology*, 131, 3: 585-593
- Montaner B. et al. 2005. DNA Interaction and Dual Topoisomerase I and II Inhibition Properties of the Anti-Tumor Drug Prodigiosin. *Toxicological Science*, 85, 2: 870-879
- Pantazis P., Early J. A., Kozielski A. J., Mendoza J. T., Hinz H. R., Giovanella B. C. 1993. Regression of human breast carcinoma tumors in immunodeficient mice treated with 9-nitrocamptothecin: Differential response of nontumorigenic and tumorigenic human breast cells in vitro. *Cancer Research*, 53: 1577–1582
- Patil C. D., Patil S. V., Salunke B. K., Salunkhe R. B. 2011. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*. <http://www.springerlink.com/content/dj034505855t0146/> (4. maj 2011)
- Perez-Tomas R , Montaner B., Llagostera E., Soto-Cerrato V. 2003. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1447-1452

- Pizao P. E., Smitskamp-Wilms E., Van Ark-Otte J., Beijnen J. H., Peters G. J., Pinedo H. M., et al. 1994. Antiproliferative activity of the topoisomerase I inhibitors topotecan and camptothecin, on sub-and postconfluent tumor cell cultures. *Biochemical Pharmacology*, 48: 1145-1154
- Reed J. C. 2002. Apoptosis-based therapies. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 1: 111-121
- Rosenfeld W. D., ZoBell C. E. 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 54, 3: 393-398
- Shrode L. D., Tapper H., Grinstein S. 1997. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29: 393-399
- Someya N., Nakajima M., Hirayae K., Hibi T., Akutsu K. 2001. Synergistic Antifungal Activity of Chitinolytic Enzymes and Prodigiosin Produced by Biocontrol Bacterium, *Serratia marcescens* Strain B2 against Gray Mold Patogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 67, 4: 312-317
- Soto-Cerrato V., Llagostera E., Montaner B., Scheffer L. G., Perez-Tomas R. 2004. Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. *Biochemical Pharmacology*, 68, 7: 1345-1352
- Starič N., Danevčič T., Stopar D. 2010. *Vibrio* sp. DSM 14379 Pigment Production - A Competitive Advantage in the Environment? *Microbial Ecology*, 60, 3: 592-598
- Suggitt M., Bibby M. C. 2005. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clinical Cancer Research*, 11: 971-981

Telford W. G., King L. E., Fraker P. J. 1994. Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogenous cell populations using flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 172: 1-16

Ulrich R., Friend S. H. 2002. Toxicogenomics and drug discovery: Will new technologies help us produce better drugs? *Nature Reviews, Drug Discovery*, 1: 84–88

Venkataraman C., Shankar G., Sen G., Bondada S. 1999. Bacterial lipopolysaccharide induced B cell activation is mediated via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent signaling pathway. *Immunology Letters*, 69: 233–238

Vertot N. 2010. Teden boja proti raku 2010. Statistični urad Republike Slovenije. (1. mar. 2010)
http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=2982 (30. maj. 2010)

Williams R. P., Hearn W. R. 1967. Prodigiosin. V: *Antibiotics*. Gottlieb D., Shaw P. D. (ur.). New York, Springer-Verlag: 410-432

Williams R. P., Quadri S. M. 1980. The pigments of *Serratia*. V: *The Genus Serratia*. Von Graevenitz A., Rubin S. J. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 31-75

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat in somentorici asist. dr. Ireni Oven za vodenje, pomoč in svetovanje pri pripravi diplomskega dela.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Davidu Stoparju za pregled in konstruktivne komentarje mojega diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi mojim najbližjim za podporo pri doseganju zastavljenih ciljev.