

Gimnazija Kranj

Gimnazija Kranj

Koroška cesta 13

4000 Kranj

Raziskovalna naloga na področju biologije:

Vpliv izvlečka mareličnih koščic (*Prunus armeniaca*) na rast in razvoj gliv kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) kot modelnega organizma in vpliv na celično linijo PC –
3. adenokarcinoma prostate

Avtorja: Julija Horvat in Kristjan Fortuna

Mentorji: Urša Petrič, prof. bio.

Prof. dr. Janko Kos, mag. farm.

Doc. dr. Urša Pečar Fonovič, univ. dipl. bio.

Kranj, 2017

Zahvala

Za pomoč pri delu se iskreno zahvaljujema najini mentorici in profesorici biologije Urši Petrič. Pomagala nama je izbrati temo, načrtovati izvajati poskuse ter delo. Omogočila nama je sodelovanje s Fakulteto za farmacijo v Ljubljani. Zahvaljujema se ji, ker je bila vedno pripravljena odgovarjati na vprašanja. Pomagala nama je pri pisanju in oblikovanju raziskovalne naloge in pri urejanju podatkov. V razpravah, ki smo jih imeli sva se naučila veliko novega.

Zahvaljujema se ji za potrpežljivost in za ves dragocen čas, ki ga je namenila za uresničitev te raziskovalne naloge.

Zahvaljujema se profesorju in doktorju Janku Kosu, ki nama je omogočil delo s celično linijo PC - 3. Vesela sva, da nama je omogočil sodelovanje in s tem pridobivanje novih in dragocenih izkušenj. Z naravoslovnim raziskovanjem sva se srečala prvič in ni dvoma, da se bova še kdaj.

Zahvaljujema se tudi profesorici in doktorici Urši Pečar Fonović, asistentki z doktoratom, ki poučuje na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani (Katedra za farmacevtsko biologijo). Pomagala nama je sestaviti navodila za delo s celično linijo PC – 3 in za izvedbo laboratorijskega dela. Zahvaljujema se ji za ves namenjen čas in literaturo.

Zahvaljujema se laborantki biologije Janji Turel in laborantki kemije Bibjani Pritekelj, ki sta nama pomagali pri izvajanju poskusov v šolskem laboratoriju.

Hvala tudi sošolki Iri Kopač, letošnji raziskovalki na področju angleščine, ki je prevedla povzetek v angleški jezik.

Povzetek

Amigdalín – bolje poznan tudi pod imenom vitamin B17- je cianogen glikozid, najden v koščicah marelic, breskev, mandljev in sliv, najdemo pa ga tudi v semenih jabolk. Njegovo delovanje naj bi, po prepričanjih zdravilcev iz pakistanskega ljudstva Hunza, ki živijo v regiji Gilgit-Baltistan na višinah nad 2500m v Himalaji, zaviralo razvoj večih vrst rakavih obolenj in degenerativnih bolezni ter tako podaljšalo življenjsko dobo teh ljudi. Laetril je modificirana oblika amigdalina, ta pa je ime dobil iz grške besede »amygdálē«, kar pomeni mandelj. Amigdalín je hidroliziran iz amigdalín-betaglukoze v saharozo in L-mandelonitril. Saharoza je nadaljno hidrolizirana v glukozo, medtem ko se L-mandelonitril hidrolizira v benzaldehid in hidrogen cianid. Hidrogen cianid v prekomernih količinah lahko povzroči zastrupitev s cianidom (0.6 mg – 1.5 mg). Koščice marelic, vrste *Prunus armeniaca*, katere sva preučevala, vsebujejo od 89 – 2170 mg hidrogen cianida na kilogram koščic. Pred samim vnosom izvlečka mareličnih koščic na celično linijo rakavih celic prostate, sva izvleček vnesla na glive kvasovke ter jih tako uporabila kot modelni organizem. Ugotavljala sva vpliv le-tega na rast in razvoj kvasovk, pozneje rakavih celic, kljub splošno potrjeni teoriji strokovne medicine, da je tak učinek amigdalina le placebo. S postopkom izolacije sva dobila ekstrakt amigdalina iz posušenih semen marelice (*Prunus armeniaca*), katerega sva potem v specifičnih koncentracijah dodajala h kvasovkam in pozneje k rakavim celicam. Pri tem sva opazovala intenziteto celičnih delitev, oz. število celic. Pod mentorstvom Urše Petrič, profesorice biologije in Petre Flajnik, profesorice kemije, ki poučujeta na Gimnaziji Kranj sva spisala raziskovalno nalogo o vplivu izvlečka mareličnih koščic na rast in razvoj gliv kvasovk in celične linije rakavih celic prostate.

Summary

Amygdalin - better known under the name vitamin B17- found in peach, apricot, almond and plum kernels, as well as apple seeds. Its effects include, believed by healers of the Pakistani people who live in a region Gilgit-Baltistan at an altitude of a 2500m in the Himalaya Mountains, preventing the development of multiple cancerous illnesses and degenerative diseases, and as such lengthen the life span of these people. Laetril is a modified version of amygdalin, the latter got its name from a Greek word »amygdálē«, meaning almond. Amygdalin is hydrolysed from amygdalin-beta-glucose into sucrose and L-mandelonitrile. Sucrose is then further hydrolysed into glucose, and L-mandelonitrile is hydrolysed into benzaldehyde in hydrogen cyanide. The latter can cause cyanide poisoning, if used in copious amounts (0.6 mg-1.5 mg). Apricot kernels (*Prunus armeniaca*), which we have studied, contain from 89 to 2170 mg of hydrogen cyanide per kilogram of kernels. Before inputting the apricot kernel extract on the cell line PC - 3, we input the extract into yeast fungi and used that as a model organism. We followed the effects of it on the growth and development of yeast fungi - latter cancer cells - regardless of scientific medicine's generally confirmed theory, that the effect of amygdalin is just a placebo. With the process of isolation we acquired an extract of amygdalin from dried up apricot seeds (*Prunus armeniaca*), which we then - in specific concentrations - added to yeast fungi and furthermore to cancer cells. While doing so, we closely inspected the intensity of cellular division or the number of cells. Under the supervision of Urša Petrič, biology professor and Petra Flajnik, chemistry professor - both teaching at Gimnazija Kranj - we have written a research paper about the influence of apricot kernels extract on the growth and development of yeast fungi and cell line of PC -3 cells.

Vsebinsko kazalo

1. UVOD	8
1.1 NAMEN NALOGE	8
1.2 TEORETIČNE OSNOVE	8
1.2.1 PREDSTAVITEV VRSTE – MARELICA <i>Prunus armeniaca</i>	8
1.2.1.1. SPLOŠNO O MARELICI	8
1.2.1.2. UPORABA	9
1.2.2 PREDSTAVITEV UČINKOVINE – IZOLAT MARELIČNIH JEDRC Z VSEBUJOČIM AMIGDALINOM TER SPLOŠNO O CIANOGENIH GLIKOZIDIH	10
1.2.2.1 FIZIKALNE IN KEMIJSKE LASTNOSTI AMIGDALINA	10
1.2.2.2. CIANOGENI GLIKOZIDI	10
1.2.2.2.1 CIANOGENI GLIKOZIDI V RASTLINAH	12
1.2.2.2.2 BIOAKTIVNOST CIANOGENIH GLIKOZIDOV	12
1.2.2.2.3. NEGATIVNI UČINKI DELOVANJA CIANOGENIH GLIKOZIDOV NA ČLOVEŠKI ORGANIZEM	12
1.2.3. KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM ZA PREUČEVANJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN	14
1.2.4. CELIČNA LINIJA ADENOKARCINOMA PROSTATE PC -3	16
1.2.4.1. KARIOTIP PC – 3	16
1.2.4.2. LABORATORIJ	16
1.2.4.3. MIKROBIOLOŠKO VARNE POVRŠINE	16
1.2.4.4. CENTRIFUGE	16
1.2.4.5. INKUBATORJI	16
1.2.4.6. POSODE ZA GOJENJE IN OSTALI POTROŠNI MATERIAL	17
1.2.4.7. GOJIŠČA	17
1.3. RAZISKOVALNO VPRAŠANJE: ALI IZVLEČEK MARELIČNIH JEDRC VPLIVA NA RAST IN RAZVOJ KVASOVK <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM IN CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PROSTATE PC – 3?	18
2. RAZISKAVA	19
2.1 METODA DELA	19
2.1.1. PRIPOMOČKI, KI SVA JIH UPORABILA ZA IZOLACIJO IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC	19
2.1.2. PRIPRAVA IZVLEČKA MARELIC <i>Prunus armeniaca</i>	20
2.1.2.1 TRI EKSTRAKCIJSKE METODE ZA PRIPRAVO IZVLEČKA MARELIC	20
2.1.2.2. ULTRASONIČNA EKSTRAKCIJA	20
2.1.2.3. EKSTRAKCIJA Z SOXHLETOM	20
2.1.2.4. EKSTRAKCIJA Z REFLUKSOM	20
2.1.3 KVASOVKE	21
2.1.3.1 PRIPOMOČKI	21

2.1.3.2. OPIS DELA – PRIPRAVA GOJIŠČA KVASOVK	21
2.1.4. CELICE PC – 3	22
2.1.4.1. PRIPOMOČKI.....	22
2.1.4.2. OPIS DELA – PRIPRAVA GOJIŠČA CELIC PC - 3	23
2.1.4.3. NEUSPEH TESTA MTS.....	25
2.2. MERITVE	27
2.2.1. UGOTAVLJANJE VPLIVA IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC NA ŠTEVILO KVASOVK <i>Saccharomyces cerevisiae</i> GLEDE NA NJIHOVO ŠTEVILO V ODVISNOSTI OD ČASA	27
2.2.2. UGOTAVLJANJE VPLIVA IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC NA AKTIVNOST KVASOVK <i>Saccharomyces cerevisiae</i> V ODVISNOSTI OD ČASA	27
2.2.3. SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU.....	28
3. RAZPRAVA.....	31
3.1. RAZPRAVA O VPLIVU IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC NA ŠTEVILO KVASOVK.....	31
3.2. RAZPRAVA O VPLIVU IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC NA AKTIVNOST KVASOVK	31
3.3. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU	32
3.3.1. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU BREZ DODANE UČINKOVINE.....	32
3.3.2. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANO CITRONSKO KISLINO	32
3.3.3. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANIM IZVLEČKOM PETIH MARELIČNIH JEDRC S KONCENTRACIJO 100%	33
3.3.4. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANIM IZVLEČKOM PETIH MARELIČNIH JEDRC S KONCENTRACIJO 12,5%	33
3.3.5. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANIM IZVLEČKOM DVAJSETIH MARELIČNIH JEDRC S KONCENTRACIJO 100%	34
3.3.6. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANIM IZVLEČKOM DVAJSETIH MARELIČNIH JEDRC S KONCENTRACIJO 12,5%	34
4. ZAKLJUČEK	34
5. VIRI	35

Kazalo slik

Slika 1: Sambunigrin	11
Slika 2: Lotavstralin	11
Slika 3: Prunazin	11
Slika 4: Amigdalín.....	11

Slika 5: Cianogeneza amigdalina.....	11
Slika 6: Centrifugirke	17
Slika 7: Steklenička za gojenje celičnih kultur.....	17
Slika 8: Pripravljeno gojišče PC – 3	18
Slika 9: Aparat za refluks v digestoriju Gimnazije Kranj	21
Slika 10: Advanced DMEM medij.....	24
Slika 11: Dodatek F - 12.....	24
Slika 12: Mikrotitrna ploščica	25
Slika 13: Kompletno gojišče PC - 3.....	26
Slika 14: Reagent CellTiter 96 AQ _{ueous} se je v bolj rjavih poljih prehitro začel spreminjati v formazan	26
Slika 15: Priprava na aplikacijo na mikrotitrne ploščice v sterilni komori	26
Slika 16: Celična linija rakavih celic PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času brez dodanega izvlečka.....	28
Slika 17: Celična linija rakavih celic PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodano citronsko kislino	28
Slika 18: Celična linija rakavih celic PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodanim izvlečkom petih mareličnih jedrc s koncentracijo 100%	29
Slika 19: Celična linija rakavih celic PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodanim izvlečkom petih mareličnih jedrc s koncentracijo 12,5%	29
Slika 20: Celična linija PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodanim izvlečkom dvajsetih mareličnih jedrc s koncentracijo 100%.....	30
Slika 21: Celična linija PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodanim izvlečkom dvajsetih mareličnih jedrc s koncentracijo 12,5%	30

Kazalo grafov

Graf 1: Vpliv izvlečka marelic na število kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v odvisnosti od časa.....	26
Graf 2: Vpliv izvlečka marelic na aktivnost kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v odvisnosti od časa.....	26

1. UVOD

1.1 NAMEN NALOGE

Za izdelavo raziskovalne naloge sva se odločila, ker naju zanima hiter in buren razvoj znanosti na področju biologije. Želela sva si pridobiti tudi praktično znanje v laboratoriju, saj bi nama to prišlo zelo prav pri nadaljnjem izobraževanju na fakulteti.

Temo najine raziskovalne naloge sva izbrala s pomočjo najine mentorice Urše Petrič, profesorice biologije na Gimnaziji Kranj. Že prvi hip se nama je zdel problem izredno zanimiv. Začela sva brati članke na to temo in v enem od njih zasledila ljudstvo Hunza (Vesel, 2014), ki živi v istoimenski dolini na nadmorski višini 1500-3000m na obrobju gorskih verig Karakorum, Himalaja in Hindokuš. Med njimi je zelo veliko stoletnikov, ki so kljub visoki starosti zelo čili. Hunze pravijo, da so nekateri redki posamezniki doživeli celo 130 let. Dolgo časa so mislili, da je nenavadno dolga življenjska doba Hunz posledica genskih in različnih okoljskih dejavnikov, toda raziskave so pokazale, da so dejavniki okolja močnejši od dednosti. Ti dejavniki pa so prehrana, ki temelji predvsem na živilih rastlinskega izvora, gorski zrak in voda, ki priteče iz ledenikov ter preprosto, naravno življenje z veliko telesne dejavnosti. Hunze namreč zelo veliko pešačijo, vsaj od 10 do 20 kilometrov na dan, ko se odpravijo do svojih zelo oddaljenih gorskih teras. Hoja izredno dobro deluje na organizem in je tudi najlažja in najučinkovitejša telovadba.

Pomembno pa je dejstvo, da uživajo jedrca marelic, ki jih pridelajo sami. (Vesel, 2014). Bistvo, zakaj zgodba o Hunzah uživa toliko svetovne medijske pozornosti pa je dejstvo, da naj Hunzami ne bi bilo več vrst karcinoma in drugih degenerativnih bolezni.

Zato sva se odločila tudi sama preveriti, če je uživanje mareličnih koščic res pogojujoč faktor pri nastanku oziroma razvoju karcinoma.

1.2 TEORETIČNE OSNOVE

1.2.1 PREDSTAVITEV VRSTE – MARELICA *Prunus armeniaca*¹

1.2.1.1. SPLOŠNO O MARELICI

Marelica (*Prunus armeniaca*) je majhno do srednje veliko listopadno drevo iz družine rožnic (*Rosaceae*). Ime marelica se nanaša tudi na istoimenski plod omenjenega drevesa. Marelični listi imajo obliko srca z špičastimi konicami; dolgi so okoli osem centimetrov, široki pa 3 – 4 centimetrov. Cvetovi so belorožni.

¹ Celotno poglavje 1.2.1 povzeto po članku: [<http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Apricot>]

Cvetovi in plodovi marelice so pomembni za razmnoževanje rastlin, predstavljajo veliko vrednost v ekosistemi in človeku. Za človeka so sadeži – sveži, zamrznjeni ali posušeni – odličnega okusa, imajo pa tudi visoko hranljivo vrednost. Marelične jedrca se uprabljajo za pridobivanje olja, ki ga uporabljajo v kozmetiki, uporablja se pa tudi kot masažno olje.

Marelice so zdravo sadje, katerih semena oz. jedrca vsebujejo veliko vlaknin, vitaminov in zdravih maščob. Okus moka iz koščic marelic je lahko rahlo grenak ali pa slaek in je podoben mandljevi moki. Ker je tako kot po okusu podobna tudi po strukturi se uporablja za kuhanje. (Blalock, 2011)

Marelice izhajajo iz Kitajske in so se tekom zgodovine postopoma razširile v Evropo in na Bljižni vzhod. Na Kitajskem jo gojijo že 4000 let (Herbst, 2001). Danes uspeva v večini toplejših območjih, od Severne, Srednje in Južne Amerike in Oceanije in južnega dela Evrope.

Prunus je rod rastlin iz družine *Rosaceae*. Rožnice oz. *Rosaceae* so ena največjih družin v rastlinskem svetu, ki štejejo kar 3400 vrst, vključno z jabolki, jagodami, breskavmi, slivami, češnjami itd. Okoli 430 vrst iz rodu *Prunus* raste na severni polobli.

V podred *Prunus* spadajo tudi marelice in slive in se razlikujejo od ostalih podredov v glavnih in stranskih poganjkih, cvetovi so na kratkih steblih razporejeni v skupine od 1 – 5 cvetov, plodovi pa imajo režo in gladko peško.

1.2.1.2. UPORABA

Ljudje marelice jedo sveže, posušene, zamrznjene ali v konzervi. Sveže sadje je seveda sezonsko in pokvarljivo (Herbst, 2001).

Semena oziroma jedrca mareličnih pešk so strupene, dokler jih ne popečemo, uporabljamo pa jih za kozmetiko, pa tudi za izdelavo raznoraznih likerjev (Herbst, 2001). Marelične peške, ki rastejo v centralni Aziji in okoli Mediterana so lahko tako sladke, da so brez problema zamenljive z mandlji. Italijanski liker Amaretto je občasno narejen iz mareličnih koščic, ne pa iz mandljev. Olje koščic pa uporabljamo tudi kot jedilno olje, v kozmetiki ali pa kot masažno olje.

Sveže ali posušene marelice imajo visoko količino vitamina A v obliki karotena. Sveže so odličen vir vitamina C in vlaknin. Posušene so odličen vir kalcija, bakra, niacina in železa. Sveža, 60 – gramsko marelica vsebuje 1.2 grama vlaknin in 18kcal, posušene pa 14.4 grama vlaknin in 110kcal (Bender and Bender, 2005).

Cianogeni glikozidi, katere najdemo v semenih, listih in lubju večine koščičastega sadja, so v visokih količinah prisotni v mareličnih koščicah (TC, 2007). Iz mareličnih koščic pridobivajo tudi laetril, alternativno protirakavo zdravilo, ki ima dolgo zgodovino; že od l. 502 so marelične jedrca uporabljali za zdravljenje tumorjev, na Otoku pa so jih v sedemnajstem stoletju uporabljali za zdravljenje tumorjev in

ulcerjev (TC, 2007). V letu 1980 pa je *National Cancer Institute* v Združenih državah Amerike razglasil laetril za neučinkovito zdravilo za raka (TC, 2007).

V Evropi so marelice dolgo časa veljale za afrodiziak, kar je razvidno v Sheakspearjevem Senu Kresne noči. Kitajci so marelice povezovali z izobrazbo in medicino. Kitajski filozof Chuang Tzu je v četrtem stoletju pred našim štetjem je napisal zgodbo, ki govori o poučevanju Konfucija v gozdu marelic.

1.2.2 PREDSTAVITEV UČINKOVINE – IZOLAT MARELIČNIH JEDRC Z VSEBUJOČIM AMIGDALINOM TER SPLOŠNO O CIANOGENIH GLIKOZIDIH

1.2.2.1 FIZIKALNE IN KEMIJSKE LASTNOSTI AMIGDALINA

Amigdalín je cianogen glikozid, pridobljen iz aromatske aminokisline fenilalanina z molekulsko maso 457.432 g/mol. Njegova kemijska formula je $C_{20}H_{27}NO_{11}$. Po IUPAC-ovem poimenovanju se imenuje *[6-O-β-D-Glukopiranozil-β-D-glukopiranozil)oksi](fenil)acetonitril]*. Amigdalín je topen v vodi in vodni raztopini daje šibko, skoraj neopazno motnost. Pri temperaturi 25°C se ga v vodi raztopi približno 83g/L. Vsebnost amigdalina variira od rastline do rastline in je v veliki meri posledica okoljskih vplivov. Jedrca marelic vrste *Prunus armeniaca*, s katerimi sva operirala midva, vsebujejo 8% amigdalina. Mandlji ga vsebujejo 5%, breskve 6% in slive 2.5% na enoto ene jedrca, vsebujejo pa ga tudi jedrca jabolk, vendar v precej manjših količinah.

1.2.2.2. CIANOGENI GLIKOZIDI²

Cianogeni glikozidi, večkrat okrajšani s kratico CNG, so specifična skupina glikozidov, sestavljenih iz spojin, ki, v procesu hidrolize lahko sprostijo cianovodikovo kislino (*trivialno: pruska kislina*). Kemijsko so spojine dobljene iz alifatskih in aromatskih L-aminokislinskih prekurzorjev, kateri so kemično nestabilni, vendar stabilnost v rastlinah dosežejo z glikozilacijo. CNG-ji pa so, v primerjavi z njihovim intermedijatom cianohidrinom, stabilni. Vseeno je v rastlinah β-glikozidna vez lahko hidrolizirana z β-glikozidazo. Za preprečitev avtotoksičnosti so encimi in substrati ločeni v različnih predelkih celice ali različnih rastlinskih tkivih, ki vsebujejo CNG-je; npr. v listih rodu *Sorghum* (*slovensko - Sirek*) je β-glukozidaza locirana v mezofilnih celicah, medtem ko je substrat Dhurrin lociran v epidermalnih celicah.

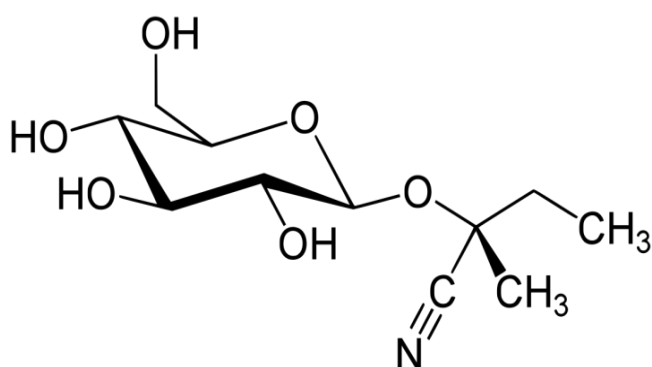
Ko je obstoj rastline ogrožen – npr. ko herbivori rastlino skušajo zaužiti, ko je rastlina zdrobljena, macerirana ali zamrznjena – sta ti dve komponenti v stiku in poteče deglikolizacija. Sproščena cianovodikova kislina ima rahlo grenak, mandlju podoben vonj, katerega nekateri ljudje niso sposobni zaznati (20% populacije ni sposobne zaznati HCN zaradi genetskih predispozicij).

² Celotno poglavje 1.2.2.2. Cianogeni glikozidi je povzeto po: McCreath Badal Simone, Delgoda Rupika. *Pharmacognosy: Fundamentals, applications and strategies*. 146 – 149.

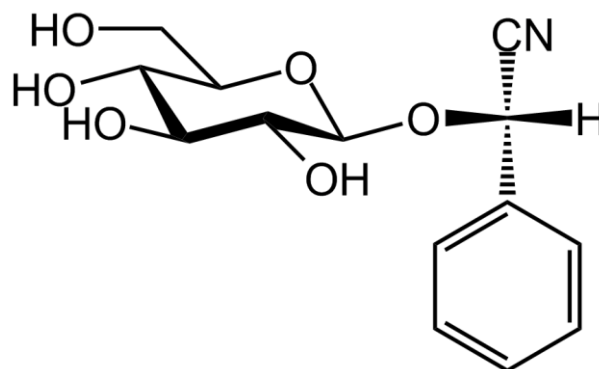
Najbolj pogost sladkor v CNG-jih je glukoza (večina CNG-jev je monoglukozidnih ali diglikozidnih), vendar so opaženi tudi zasledki ostalih sladkorjev, npr. apioze (skupaj z glukozo in oksiantin – 5^{Di} – benzoatom), arabinoze in ksiloze.

Nekateri CNG-ji so bili uspešno izolirani in njihove strukture uspešno pojasnene; npr. amigdalín, ki je bil izoliran v 1830, njegova kemijska struktura pa pojasnena v letu 1837 in sambunigrin v letu 1928.

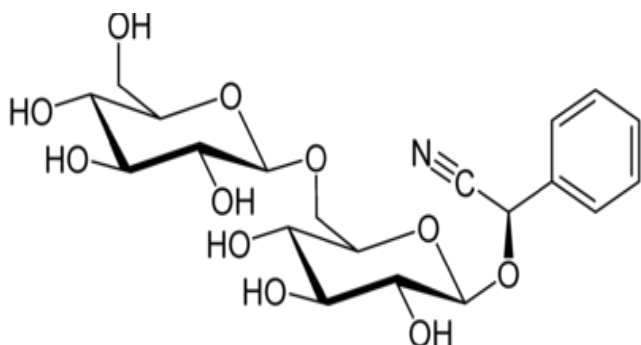
Zaradi napredka na področju inovacij novih biotehnoloških in biokemijskih naprav še danes odkrivajo številne cianogene glikozide, zato je to področje še danes aktivno.



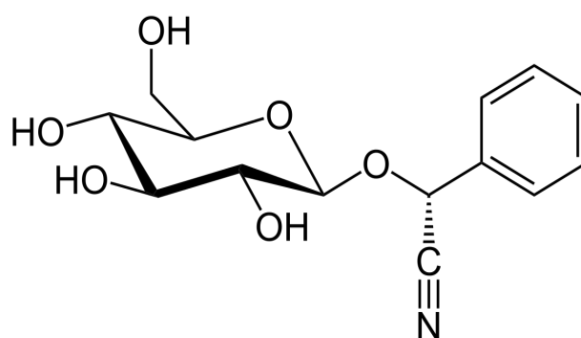
Slika 2: Lotavstralin



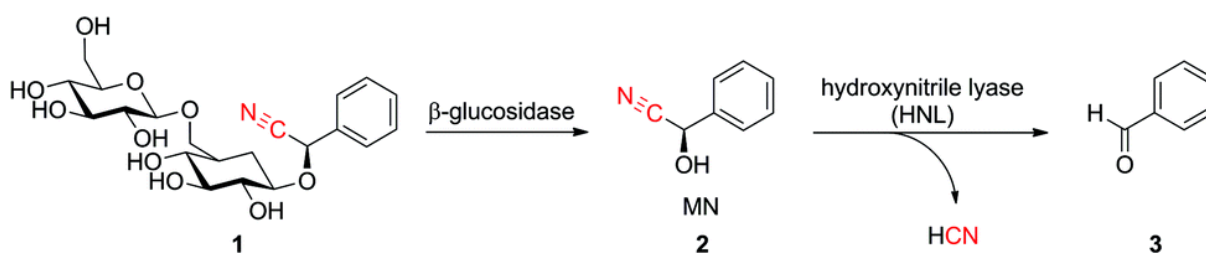
Slika 1: Sambunigrin



Slika 4: Amigdalín



Slika 3: Prunazín



Slika 5: Cianogeneza amigdalína.

1.2.2.2.1. CIANOGENI GLIKOZIDI V RASTLINAH

Cianogeni glikozidi so domnevno del evolucijskega obrambnega mehanizma velikega števila rastlinskih rodov – več kot 3000 rastlin je bilo indentificiranih kot cianogenih. Grenak okus in toksičnost cianogenih spojin rastlino herbivorom dela izrazito neatraktivno in neokusno. Obstajajo pa izjeme – npr. ličinke, ki so sposobne izločiti cianogene spojine (npr. linamarin in lotuastralin) iz rastline in jih uporabiti kot lastni način obrambe pred plenilci.

Koncentracije cianogenih glikozidov v rastlini variirajo skupaj z klimatskimi pogoji in letnimi časi. Prav tako je koncentracija pogojena z pripravo in predelavo hrane. Kot navaja odlok Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) o koncentracijah CNG-jev (navedeno kot »total HCN« – kar vključuje vso koncentracijo HCN v CNG-jih, cianohidrinih in IICN v hrani) v rastlini, ki je bila uporabljena kot hrana ali začimba variira zaradi kulturnih in okoljskih faktorjev, npr. kot že v prej omenjenem bambusu od 70-8000 mg/kg, mandljih (300 – 4700 mg/kg) in mareličnih koščic (900 – 4000 mg/kg).

1.2.2.2.2. BIOAKTIVNOST CIANOGENIH GLIKOZIDOV

Bistveni problem kakšnegakoli zdravljenja s substancami, ki spadajo v skupino cianogenih glikozidov [v nadeljevanju CNG] je vsebnost cianida, ki nedvomno negativno vpliva na človeški gastrointestinalni trakt.

Tako in vitro, kot tudi in vivo so neštete farmakološke raziskave pokazale, da je amigdalín toksičen, kar je vodilo v prepoved prodaje le-tega v številnih državah, med drugim tudi v Sloveniji. V Sloveniji pa je mogoče kupiti jedrca semen marelic *Prunus armeniaca*, vendar je na embalaži navedena maksimalna, za telo še neškodljiva, količina užitih koščic v enem dnevu.

Nekateri CNG-ji, med njimi tudi amigdalín, so v 19. in 20. stoletju v Rusiji in ZDA služili kot učinkovito zdravilo proti več vrstam karcinoma. Veljalo je množično prepričanje, da cianidna podenota v CNG-jih deluje antikancerogeno. Vendar pa je število popolnoma ozdravljenih, bivših bolnikov številnih karcinomov preraslo število bolnikov, ki so, v upanju, da bodo tudi oni ozdravljeni, užili CNG-je, največkrat amigdalín in prunazín, in se pri tem zastrupili, kar je nemalokrat vodilo v smrt. Zato so CNG-ji v veliki meri izredno nevarni, tudi farmacevtska podjetja (npr. Sigmaaldrich) v svojih opisih posameznih zdravil, ki vsebujejo CNG-je vedno navedejo, da je zdravilo toksično in mora biti uživano v strogo določenih količinah.

1.2.2.2.3. NEGATIVNI UČINKI DELOVANJA CIANOGENIH GLIKOZIDOV NA ČLOVEŠKI ORGANIZEM

Že v poglavju Bioaktivnost cianogenih glikozidov sva omenila toksičnost CNG-jev zaradi cianidne podenote, ki v dveh hidrolizah citotoksično vpliva najprej na

gastrointestinalni trakt. Prav zaradi tega uradna medicina amigdalina v največji meri ne priznava kot učinkovito zdravilo za raznorazne karcinome, vendar je opaženo, da se čedalje več ljudi odmika od dogem uradne medicine in se v določeni meri rajši posluži alternativnih metod, med katere uvrščamo tudi zdravljenje karcinoma s CNG-ji, največkrat z amigdalinom (večkrat omenjen kot vitamin B17) in prunazinom.

V prejšnjem stoletju, ko je informacija o, skoraj čudežnem, protirakavem zdravilu, zaokrožila po zahodu, je bilo opravljenih nemalo raziskav v te namene. Namesto čistega amigdalina so za in vitro poskuse uporabljali njegovega kemičnega sorodnika laetrila. Osupljivo je laetril de facto pokazal antikancerogeno aktivnost v živalskih organizmih, ne pa v človeškem.

V tem poglavju je potrebno razložiti še nomenklaturu, povezano z amigdalinom. Imena laetril, Laetril in amigdalin ne pomenijo popolnoma iste spojine. V prejšnjem stoletju v ZDA so sintetizirali Laetril, ! derivat amigdalina (mandelonitril- β -glukuronid), kateri je kemijsko različen amigdalinu/laetrilu (mandelonitril – β - gentobiozid) ki so ga v približno istem času pridobivali iz zdrobljenih mareličnih koščic v sosednji Mehiki. V tem istem času se je zaradi povečane uporabe Laetrila v ZDA povečalo število zastрупitev s cianidom, zato je Uprava ZDA za hrano in zdravila (USA Food and Drug Administration) izdala odlok, v katerem prepoveduje prodajo Laetrila. Velik odstotek zastrupljenih ljudi je Laetril uživalo peroralno.

Vsaj ena raziskava, prav tako opravljena v prejšnjem stoletju, je pokazala povezavo med povečanim sproščanjem cianida iz CNG-jev zaradi prisotnosti vitamina C (povzeto iz članka iz American Cancer Society). Prav tako je nevarnejše uživanje amigdalina pri vegetarijancih z deficienco vitamina B12.

Prav zaradi zgoraj naštetih raziskav je danes na vseh embalažah Laetrila, laetrila in amigdalina (večkrat navedenega kot vitamin B17) navedeno, da kakršnekoli antikancerogene učinke uradna medicina strogo zanika in odsvetuje njegovo rabo.

Toksični učinki cianidnih ionov so generalno enaki pri živalih in ljudeh in kronična izpostavljenost cianovodikove kisline negativno vpliva na človeški, kot tudi na živalski centralni živčni sistem. Poleg centralnega živčnega sistema CNG-ji primarno učinkujejo tudi na kardiovaskularni in respiratorni sistem.

Zastрупitev je povezana z inaktivacijo encima Citokrom C Oksidaze, pri kateri se cianid spoji z $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ kationi, katere ta encim vsebuje. Prav tako je povezana tudi z inhibicijo celičnega dihanja (respiracije).

Cianid pa lahko inhibira tudi nekatere druge metaloencime (encime, ki imajo kot kofaktor kovinski ion), ki vsebujejo železo, baker ali molibden. Cianid povzroči tudi višek nivoja krvnega sladkorja in mlečne kisline in manjšanje razmerja ATP/ADP kar indicira v spremembo iz aerobnega v anaerobni metabolizem. Kot kaže, cianid prav tako aktivira glikogenolizo in premesti glukozo v Pentoza-fosfatno pot. S tem zniža

stopnjo glikolize in inhibira cikel trikarboksilnih kislin, bolje poznan pod imenom Krebsov cikel.

Če pride cianovodikova kislina ali cianidne soli v kontakt s kožo, lahko povzroči iritacijo in rane. Znani so primeri delavcev, ki so v določenem časovnem obdobju vdihovali zanemarljivo malo HCN-hlapov (6-10 ppm), so imeli težave z dihanjem poleg tega pa tudi bolečine v prsnem košu, spremembe v krvni sliki, slabost, bruhanje, glavoboli in inhibicijo ščitnice. Akutna zastrupitev in umrljivost z različnimi CNG-ji na poskusnih živalih je direktno povezana s sproščanjem in detoksifikacijo HCN.

Da se prehrambena industrija izogne toksičnosti CNG-jev v svojih izdelkih, uporablja številne predelave, ki eliminirajo veliko mero CNG-jev iz rastlinske hrane (npr. yucca, bambus, sorgo in lanena semena v kruhu). Kot navaja tudi poročilo svetovne zdravstvene organizacije (WHO), je potencialna toksičnost HCN z zaužitjem CNG-jev močno odvisna od raznoraznih nutricionističnih faktorjev, vključenih v detoksifikacijske mehanizme, med katerimi uvrščamo tudi razpoložljivost žveplo vsebujoče aminokisline in vitamin B12. Cianid dokazano reagira tudi s hidroksokobalaminom kar povzroči nastanek cianokobalamina in ta reakcija je, s konstantom deficita žveplo-vsebujočih aminokislin, delno povezana z degradacijo obkrajnega (perifernega) živčevja (*tropic ataxic neuropathy – ataksična nevropatija, včasih poimenovana tudi KONZO*).

O epidemskih izbruhih KONZA je poročalo več, največ zahodnoafriških držav, kjer je izbruh KONZA povezan z visoko konzumacijo nezadostno predelane rastline cassava.

1.2.3. KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM ZA PREUČEVANJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Kot modelni organizem sva že, kot omenjeno, uporabila kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

Med številne pozitivne lastnosti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, zaradi katerih se je uveljavila kot modelni organizem, prištevamo robustnost celic kvasovke, kratek podvojevalni cikel in enostavno vzdrževanje. Kvasovke za razliko od nekaterih drugih organizmov ne zahtevajo dovršenih sterilnih tehnik ali kompleksnih medijev, so ekonomsko ugodne, njihove potrebe po hranilih pa nezahtevne. Rastejo lahko v obliki dispergiranih celic v tekočem gojišču ali pa tvorijo kolonije na trdih gojiščih. Prištevamo jih v skupino GRAS organizmov (Generally Recognize As Safe), njihova prednost pa je tudi v tem, da jih z lahkoto apliciramo v postopke visoko zmogljivostnih avtomatskih metod (Parsons in sod. 2003).

Kvasni genom sestavlja 6000 genov (Goffeau, 2000), kar je precej manj v primerjavi s 25000 kodirajočimi regijami človeškega genoma (Pennisi, 2003), kljub vsemu pa so bile študije kvasovk bistvene za razumevanje osnovnih celičnih procesov pri

človeku, kot so metabolizem (Hilt, 2004; Wolf, 2004), DNA popravljalni mehanizmi, celični cikel (Hartwell, 1994) in pojasnitev vpletenosti celičnega cikla pri razvoju raka (Hartwell in Kastan, 2004).

Za organizem *Saccharomyces cerevisiae* je značilna visoka stopnja ohranjenosti celičnih procesov med kvasovkami ter višje razvitimi organizmi in ravno to je tisto zaradi česar so kvasovke odlično orodje pri študiji vpliva zdravilnih učinkovin (Menacho in Murguía, 2007).

Kljub temu, da gre za enocelični organizem, lahko pri kvasovki induciramo izražanje lastnosti, ki so sicer značilne za večje skupine organizmov ter lastnosti pa so pseudohife, intracelularno signaliziranje ter programirana celična smrt (Carool in sod., 2003).

Najzgodnejša točka v kateri lahko kvasovke vključimo v potek raziskav pri odkrivanju novih zdravilnih substanc je pri identifikaciji potencialnih tarč delovanja zdravilnih substanc, ter ilustrativen prikaz kako prilagajanje aktivnosti ter specifičnih tarč prispeva k željenemu fiziološkemu rezultatu delovanja zdravilne substance. Kljub temu, da obstajajo očitne ovire pri uporabi mikroorganizmov za identifikacijo potencialnih tarč delovanja zdravilnih substanc na človeške proteine, pa je na tisočim proteinom kvasovke skupno s proteini pri človeku vsaj primarno aminokislinsko zaporedje. Med temi aminokislinskimi zaporedji je več kot 100 takšnih, katerih zaporedje je podobno zaporedju človeških proteinov, ki so vpleteni pri razvoju bolezni (Bassett in sod. 1997; Reiter, 2001). Znano je tudi, da številne, vsakodnevno uporabljene zdravilne učinkovine, ki imajo za svoje tarče proteine pri človeku, specifično inhibirajo ortologne proteine pri kvasovki npr. lovastatin (Bach in Lichtenhalter, 1983), dejstvo, ki zakonsko upravičuje uporabo kvasne biologije za identifikacijo in raziskovanje potencialnih človeških tarč zdravilnih učinkovin.

Največji izziv pri razvoju novih zdravil je identifikacija proteinov in celičnih poti na katere zdravilne učinkovine vplivajo. Nepričakovani stranski učinki zdravilnih učinkovin se pogosto odkrijejo šele pozno v razvoju. Nadvse priročno bi bilo imeti pri načrtovanju razvoja novih zdravilnih učinkovin katalog s popisom vseh proteinov, na katere raziskovana zdravilna učinkovina vpliva, da bi lahko razvoj tekel v smeri povečevanja željenih farmakoloških učinkov ter zmanjševanja tistih nezaželenih, pravtako pa bi bistveno prispeval k izbiri živalskega modela in načrtovanju kliničnih raziskav. (Huges, 2002).

1.2.4. CELIČNA LINIJA ADENOKARCINOMA PROSTATE PC - 3³

1.2.4.1. KARIOTIP PC – 3

Celična linija je že skoraj triploidna z modalnim številom 62 kromosomov. V vsaki celici lahko najdemo približno 20 marker – kromosomov, nezaznavni pa so N2, N3, N4, N5, N12 in N15. Normalni Y – kromosom je nezaznaven z analizo QBA (*Q-band analysis*).⁴

1.2.4.2. LABORATORIJ

Eden bolj cenjenih vidikov gojenja celičnih kultur je potrebo po načrtovanju ustreznih prostorov, ki omogočajo varno, učinkovito ter kvalitetno delo. Idealno naj bi delo s celičnimi kulturami potekalo v laboratoriju, ki je razdeljen v predprostor (tu se preoblečemo, preobujemo), ter območje, kjer ni kontaminantov (glavni sterilni laboratorij). Poleg tega je potrebna uporaba ustreznih sterilnih komor (laminar) te celičnih inkubatorjev. Zahteva po kategoriji celičnega laboratorija je odvisna od celične linije ter narave samega dela. Priporočila za delo v celičnem laboratoriju določajo ogrevanje, svetlobo, tip delovnih površin in tal ter prostor za preoblačenje in umivanje rok. Vsem zgoraj naštetim pogojem za celični laboratorij je ustrezal celični laboratorij Fakultete za farmacijo v Ljubljani, kjer sva poskus s celičnimi linijami PC – 3 tudi midva opravljala.

1.2.4.3. MIKROBIOLOŠKO VARNE POVRŠINE

Mikrobiološka varna površina (laminarij) je najverjetneje najpomembnejši del opreme, saj zagotavlja čisto delovno okolje ter varuje raziskovalca pred aerosolom in celične kulture pred mikroorganizmi. Zaščito zagotavljajo filtri HEPA (*high – efficiency – particulate air*), ki glede na kategorijo laboratorija omogočajo različno prepustnost delcev.

1.2.4.4. CENTRIFUGE

Centrifuge se rutinsko uporabljajo v celičnem laboratoriju za subkultivacijo celičnih linij ter pripravo celic za zamrzovanje. Centrifuge naj bi bile zaprtega tipa, da je onemogočeno nastajanje aerosolov ter s prozornim pokrovom, ki zagotavlja pregled v primeru razlitja vzorcev.

1.2.4.5. INKUBATORJI

Celične kulture zahtevajo natančno kontrolirano okolje za gojenje. V ta namen se uporabljajo specializirani inkubatorji, ki nudijo potrebne pogoje za rast, kot je temperatura 28°C (za insektne celične linije) in 37°C (za sesalske celične linije),

³ Povzeto po knjigi: Pečar Fonović Urša idr.⁵ 2009. *Vaje iz farmacevtske biokemije*. 2. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo. ISBN 9616378228, 9789616378222.

⁴ Povzeto po https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1435.aspx?geo_country=si#

stopnja vlažnosti, raven CO₂ (5 – 10%). Nekateri inkubatorji omogočijo tudi kontrolo ravni O₂. Za mikrobiološko neoporečnost inkubatorjev sta potrebna redno vzdrževanje in sterilizacija.

1.2.4.6. POSODE ZA GOJENJE IN OSTALI POTROŠNI MATERIAL

Večina posod za gojenje celičnih kultur je na voljo za enkratno uporabo in sterilna. Uporaba tovrstne embalaže je učinkovitejša od recikliranja steklenih posod, pri čemer je potrebno validirati postopek sterilizacije. Plastične posode za gojenje celic imajo obdelano površino za primernejše priterjevanje adherentnih celičnih kultur. Po uporabi je potrebno gojilne posode/material dekontaminirati, bodisi kemično ali z avtoklaviranjem.



Slika 7: Steklencičke za gojenje celičnih kultur



Slika 6: Centrifugirke

1.2.4.7. GOJIŠČA

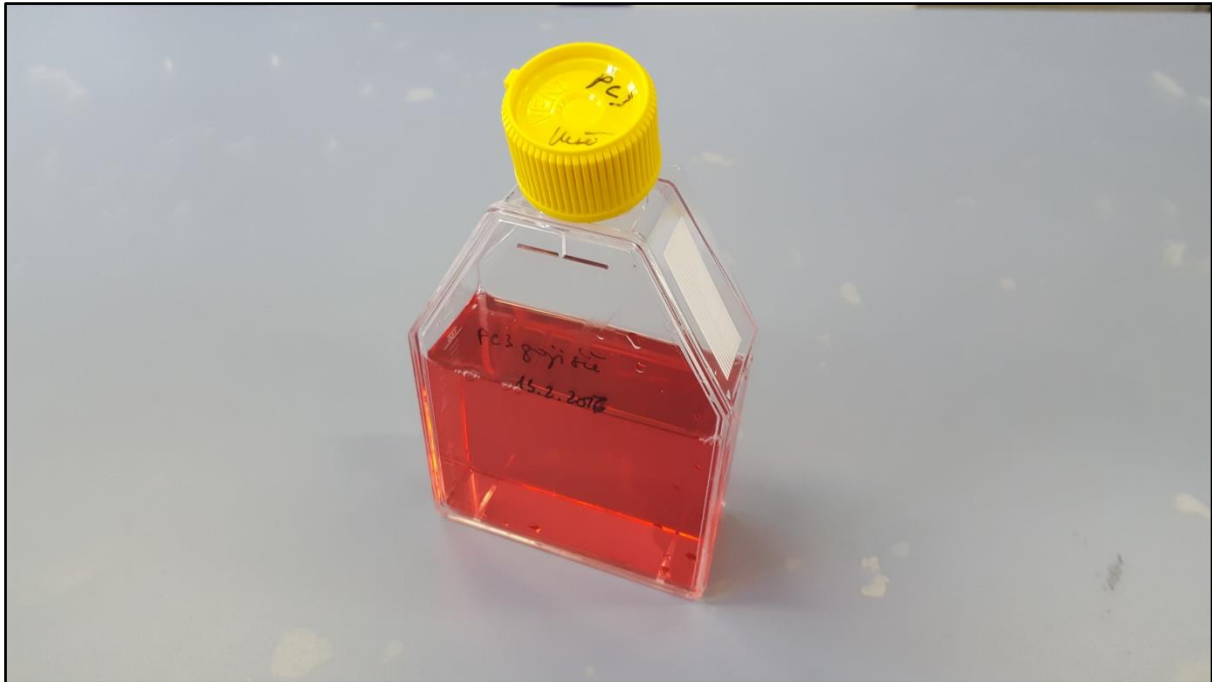
Prvotna gojišča, ki so se uporabljala za gojenje celic, so temeljila na tkivnih ekstraktih (npr. ekstrakt jeter, vranice; piščančji embrio) in telesnih tekočinah (npr. serum, limfa, amnijska tekočina). Njihova slabost so razlike v sestavi, poleg tega jih ne znamo umetno pripraviti zaradi nepoznavanja natančne sestave.

Kemično definirana gojišča so razvili na podlagi analiz telesnih tekočin in osnov biokemije. Široko uporabna so osnovna gojišča Eagle's Basal Medium (BME) in izpeljanki Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) ter Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Osnovna gojišča vsebujejo esencialne aminokisline, soli, glukozo, natrijev piruvat in vitamine. Z različnimi kombinacijami dodatkov – anorganske soli, prekurzorji, aminokisline, sladkorji, vitamini, serum, proteini in peptidi - dobimo t.i. kompletna gojišča, v katerih lahko gojimo številne celične linije.

Večina sesalskih celičnih linij raste pri pH 7.4. Kot indikator pH se v gojišče dodaja fenol rdeče, gojišče se obarva rumeno v kislem ter vijolično v bazičnem. Uporabljamo lahko dva puferska sistema: - naravnega, kjer gre za vzpostavljanje razmerja med plinastim CO₂ iz zraka ter CO₂/HCO₃⁻ v gojišču; kulture s takim

sistemom gojimo v inkubatorjih s 5-10% CO₂, - sistem HEPES (ion dvojček), ki ne zahteva kontrolirane atmosfere v inkubatorjih; HEPES ima sicer večjo zmogljivost, vendar je drag in v višjih koncentracijah toksičen za nekatere celične linije.

Večina linij potrebuje atmosferske vrednosti O₂, osmolalnost 260 – 320 mOsm/kg in 37 °C.



Slika 8: Pripravljeno gojišče PC – 3

1.3. RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

1. Pričakujeva, da izvleček semen marelic (*Prunus armeniaca*) ne bo vplival na rast in razmnoževanje gliv kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) kot modelni organizem.
2. Pričakujeva, da ne bo spremembe na številu celic ob tretiranju celic kvasovk z 10% in 25% koncentracijo izvlečka dvajsetih semen marelic.
3. Pričakujeva, da ob tretiranju celic kvasovk z izvlečkoma z različno količino semen marelic (5 in 20 semen) ne bo sprememb v številu celic.
4. Pričakujeva, da izvleček mareličnih jedrc ne bo vplival na aktivnost kvasovk.

Ker sva pa imela možnost raziskave na celični liniji rakavih celic PC – 3, sva izoblikovala še tri hipoteze, ki sva jih na podlagi dobljenih rezultatov bodisi potrdila bodisi ovrgla.

1. Pričakujeva, da izvleček semen marelic ne bo vplival na rast in razvoj celične linije rakavih celic prostate PC3.

2. Pričakujeva, da ne bo spremembe ob tretiranju PC3 celic z 12,5% in 100% koncentracijo izvlečka dvajsetih in petih semen marelic.
3. Pričakujeva, da ob tretiranju PC - 3 celic z izvlečkoma z različno koncentracijo semen marelic (5 in 20 semen) ne bo sprememb.

2. RAZISKAVA

2.1 METODA DELA

2.1.1 PRIPOMOČKI, KI SVA JIH UPORABILA ZA IZOLACIJO IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC

- Aparatura za refluks: bučka, povratni hladilnik, stojalo, prižema, mufa, živosrebrni termometer
- Termostatska vodna kopel WBS, Fried electric
- Tehnica Kern EW
- Destilirana voda
- Citronska kislina v prahu Orka
- Marelična jedrca, država porekla: Turčija, uvaža Ekolife Natura
- Multipraktik KenWood Multi – Pro 900
- Steklovina; erlenmajerica, lij

2.1.2. PRIPRAVA IZVLEČKA MARELIC *Prunus armeniaca*

Najina metoda za pripravo izvlečka marelic *Prunus armeniaca* je izhajala iz članka Wei Feng Lv, Ming Yu Ding in Rui Zheng iz univerze Tsinghua v Pekingu (avgust, 2005) iz oddelka za kemijo in biokemijo. V tem članku zgoraj navedeni avtorji navajajo tri metode priprave izvlečka amigdalina, katere sva navedla v naslednjem poglavju. Ker je amigdal in v farmacevtskoizolirani obliki v Sloveniji nedosegljiv sva se odločila, da v raziskovalni nalogi ne bova za aplicirano snov na kvasovke in pozneje na celično linijo rakavih celic prostate, uporabila imena amigdal in, pač pa splošno izvleček marelic, ker poleg nedosegljivosti amigdalina nisva imela možnosti preveriti koncentracijo samega amigdalina v izvlečku zaradi specifičnega modela aparata HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), katerega Gimnazija Kranj nima. Avtorji članka so izpostavili tri ekstrakcijske metode za pripravo samega izvlečka.

2.1.2.1. TRI EKSTRAKCIJSKE METODE ZA PRIPRAVO IZVLEČKA MARELIC

V članku avtorji navajajo tri metode za pripravo izvlečka marelic.

2.1.2.2. ULTRASONIČNA EKSTRAKCIJA

Prvi korak, ki je skupen pri vseh treh metodah je mletje mareličnih koščic *Prunus armeniaca* na manjše koščke. Vsak vzorec (1g) je nato potopljen v 10ml metanola in za trideset minut postavljen pod ultrazvok.

2.1.2.3. EKSTRAKCIJA Z SOXHLETOM

Po mletju mareličnih koščic *Prunus armeniaca* na manjše koščke so bili ekstrahirani s 100mL metanola v Soxhlet aparatu za pet ur. Ekstrakt je nato razrečen na 100mL vodne raztopine.

2.1.2.4. EKSTRAKCIJA Z REFLUKSOM

V članku je za optimalno ekstrakcijsko metodo naveden refluks, zato sva se midva poslužila te metode. Refluks je kemijska metoda, ki vključuje kondenzacijo pare in vrnitev kondenzata nazaj, iz kjer je prišel. Postopek sva začela z mletjem mareličnih koščic v električnem mlinčku. Istočasno sva v čaši namerila 100mL destilirane vode ter ji dodala 1% citronske kisline v prahu. Refluks je trajal dve uri in pol v vodni kopeli s temperaturo 60°C.

Destilirani vodi je citronska kislina v prahu bila dodana zato, da preprečimo dekompozicijo amigdalina v izvlečku oziroma da zavremo pretvorbo amigdalina v neoamigdal in. S kratkim časom refluksa in nizko temperaturo vodne kopeli ne bi izkoristila vsega potenciala ekstrakcije z refluksom, dolg čas refluksa in visoka temperatura vodne kopeli pa bi znatno povišala možnost pretvorbe amigdalina v njegove epimere ali celo dekompozicijo v vodni raztopini.



Slika 9: Aparat za refluks v digestoriju Gimnazije Kranj

2.1.3 KVASOVKE

Sprva sva izvleček marelic uporabila na kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1.3.1 PRIPOMOČKI

- Glive kvasovke, instant suhi kvas Merkator
- Jabolčni sok Merkator
- Glukoza v prahu, lekarna Deteljica
- Steklovina: epruvete, erlenmajerica
- Plastična pipeta
- Kovinsko stojalo
- Aparat Vernier LabQuest Lodger Pro
- Senzor za temperaturo in CO₂ Vernier LabQuest Lodger Pro
- Hemocitometer: Bürker – Türk, Fein Optik, Bad Blankenburg, DDR
- Mikroskop Olympus CX22LED, Olympus Corporation Tokio, Japan

2.1.3.2. OPIS DELA – PRIPRAVA GOJIŠČA KVASOVK

Najprej sva pripravila gojišče in kvasni nastavek. Kvasovke sva kupila v obliki suhega pekarskega instant kvasa. V čašo sva natočila vodo, katero sva predhodno segrevala do temperature približno 40°C. Čaši z vodo sva dodala tudi nekaj gramov glukoze v prahu.

Nakar sva dodala 7g suhega instant kvasa in postavila na radiator za 10 minut, da je kvasni nastavek začel oddajati značilen vonj po kvasu, kar je pomenilo, da so kvasvoke začele brsteti.

Po pregledu vzorcev kvasovk pod mikroskopom smo se odločili za redčitev po Kochu, in sicer 10^{-4} . Sledilo je štetje osnovnega vzorca kvasovk, nato pa smo začeli dodajati najprej izvleček petih mareličnih jedrc, izvleček dvajsetih mareličnih jedrc, nato pa še 25% in 10% izvleček dvajsetih mareličnih jedrc. Kontrolni epruveti izvlečka nismo dodali. Čez dve uri smo prešteli celice v vseh vzorcih s hemocitometrom pod mikroskopom.

Merili pa smo tudi aktivnost kvasovk, in sicer sproščeno temperaturo v odvisnosti od časa. V tri ločene termosteklenice smo zmešali 7g instant suhega kvasa in jabolčni sok. Termosteklenice smo zaprli s sondo, ki je merila temperaturo, sonda pa je bila povezana z Vernier LabQuest.

2.1.4. CELICE PC – 3

Izvleček petih in dvajsetih mareličnih jedrc sva prenesla tudi v celični laboratorij v Ljubljani, kjer sva učinkovino preizkušala na celični liniji rakavih celic.

Kot eksperimentalni organizem sva uporabila celice PC-3. Možnost, da lahko raziskujemo na prav teh celicah, sva dobila na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Celično linijo raka na prostati je daroval 62 - letni moški s Kavkaza. Sev celic so vzeli iz kosti. Najprej smo jih morali odmrzniti, saj so bile skladiščene v tekočem dušiku.

2.1.4.1. PRIPOMOČKI

- Celična linija rakavih celic prostate PC – 3, ATCC[®] CRL 1435[™]
- Mikrotitrne ploščice, TPP
- Hemocitometer Bürker – Türk, Fein Optik, Bad Blankenburg, DDR
- Stekleničke za gojenje celičnih kultur, TPP
- Centrifugirke, TPP
- Mikrocentrifugirke, TPP
- pH papirčki, Panpeha, Sigma - Aldrich
- pH meter, Hanna instruments
- Avtomatske pipete, Biohit
- Multikanalna pipeta, Biohit
- Celični inkubator CB 210 Binder
- Centrifuga Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific
- Komora z laminarnim pretokom zraka PIO SMBC 183AV, PIO LFVP9, Iskra
- Vibracijski mešalnik Vibromix 10
- Mikroskop Nikon TMS - F
- Etanol (70%)
- Medij Advanced DMEM, Gibco[®] by life technologies[™]

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich
- F-12, Gibco® Thermo Fisher Scientific
- Fosfatni pufer - PBS, Sigma Aldrich
- Fetalni goveji serum - FBS, Gibco® Thermo Fisher Scientific
- L – glutamin, Sigma Aldrich
- Penicilin/streptomycin, Sigma Aldrich
- Trypsin, Gibco™ Thermo Fisher Scientific
- Nigrozin, Thermo Fisher Scientific

2.1.4.2. OPIS DELA – PRIPRAVA GOJIŠČA CELIC PC - 3

Najprej je bilo treba pripraviti osnovno gojišče za samo celično linijo PC – 3; 44 mL DMEM smo dodali 44 mL F – 12, 10 mL FBS, 1 mL L – glutamina in 1 mL penicilina/streptomicina. Nato smo celotno gojišče segreli na 37°C.

Stekleničko smo dvakrat sprali s 5mL fosfatnega pufera z 0,02% EDTA (ta celicam odvzame Ca^{2+} , ki jo potrebujejo za adhezijo/pritrnitev). V to raztopino smo dodali še tripsin, ki cepi adhezijske molekule in poskrbi, da celice niso zlepljene med sabo, ali pa s podlago. Stekleničko s pripravljenim gojiščem smo za 10min postavili v inkubator na 37°C, v katerem je 5% CO_2 , ki skozi filtrirni pokrovček stekleničke za gojenje celičnih kultur vzdržuje pH 7,4. Čisto na koncu smo dodali še 3 mL svežega gojišča, ki je ustavilo delovanje tripsina.

Nato smo vse prelili v centrifugirko ter centrifugirali 5 minut z 2000 obrati na minuto. Ob odvzetju iz centrifuge je bilo možno opaziti usedlino, ki se je naredila ob centrifugiranju – to so bile celice PC – 3, nad usedlino pa je ostal PBS. Pufer smo odlili stran, celice pa smo resuspendirali v 1 mL svežega gojišča.

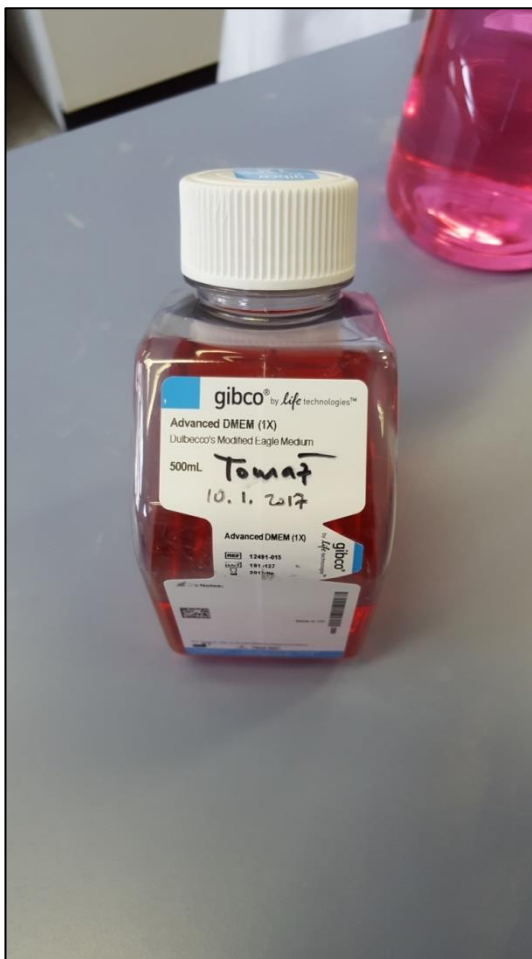
Vmes smo pripravili tudi mikrotirsko ploščico s 96 vdolbinicami za gojenje celic. V zunanji kvadrat polj ploščice smo z multikanalno pipeto napipetirali sterilno destilirano vodo, ki med inkubacijskim časom skrbi, da tako učinkovina kot gojišče ne izhlapi.

Pred nasaditvijo na testne plošče smo celice prešteli s hemocitometrom. V celični kulturi so naravno prisotne tudi mrtve celice; zato smo celicam dodali nigrozin, ki ne prehaja skozi celično membrano, če je ta živa – zato smo lahko brez problema prešteli žive (neobarvane celice). Celice so bile do zdaj dvakrat redčene z barvilom, kar smo upoštevali pri izračunu njihove koncentracije.

Z multikanalno pipeto smo v vsak kanal namerili 100 μm gojišča oziroma celic ustrezne koncentracije in ga aplicirali v označena polja. Ker je bila naša osnova test MTS, ki je kasneje propadel, smo za začetek pripravili tri stekleničke, v katerem je bilo gojišče s celicami.

- V prvi steklenički za gojenje celičnih kultur je bilo gojišče z 24 – urnim inkubacijskim časom, v katerem je bilo 234 μm gojišča in 266 μm celic.
- V drugi steklenički za gojenje celičnih kultur je bilo gojišče z 48 – urnim inkubacijskim časom, v kateri je bilo 393 μm gojišča in 106 μm celic.
- V tretji steklenički za gojenje celičnih kultur je bilo gojišče z 72 – urnim inkubacijskim časom s 457 μm gojišča in 42,6 μm celic.

Stekleničko z 72 – urnim inkubacijskim časom smo zavrgli, ker bi bila možnost celičnega propada do izteka dobe precej višja, zato smo za optimalne rezultate vzeli stekleničko z 48 – urnim inkubacijskim časom. Po 48 urah smo stekleničko za gojenje celičnih kultur postavili pod mikroskop in slikali posamezna polja.



Slika 10: Advanced DMEM medij



Slika 11: Dodatek F - 12



Slika 12: Mikrotitrna ploščica

2.1.4.3. NEUSPEH TESTA MTS

V poglavju 2.1.2. Priprava izvlečka marelic *Prunus armeniaca* sva navedla, da je v postopku izolacije učinkovine z refluksom dodana citronska kislina destilirani vodi zato, da prepreči pretvorbo amigdalina v njegove epimere oziroma, da prepreči kemijski razpad snovi.

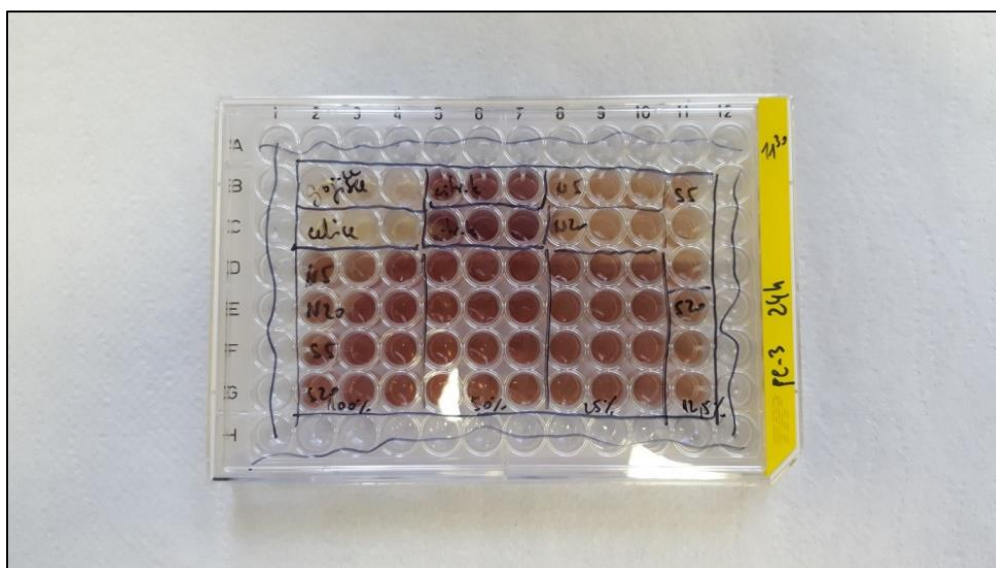
V celičnem laboratoriju Katedre za farmacevtsko biologijo, na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, smo sprva zasnovali načrt, da delovanje same učinkovine na celice PC – 3 detektiramo s testom MTS. Po zastavljenem 48 – urnem času inkubacije celic PC – 3 z izvlečkom, je prišel čas, da je v celično gojišče dodan reagent CellTiter 96® AQ_{ueous}, ki bi s pretvorbo v formazan pokazal vpliv izvlečka na metabolno aktivnost celic.

Takoj po dodanem indikatorju smo opazili, da nekaj ni tako, kot bi moralo biti. Gojišče se je začelo nemudoma barvati.

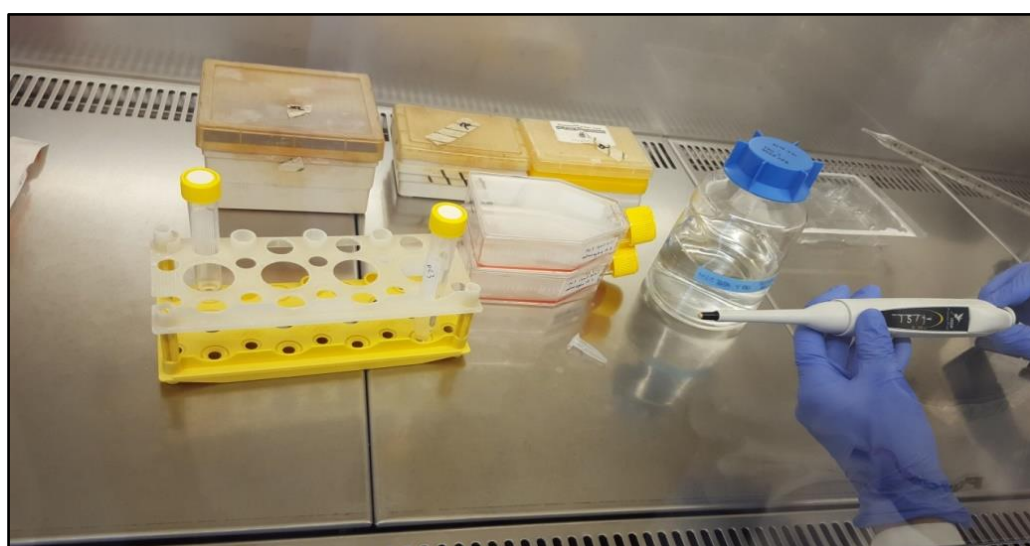
Reagent CellTiter 96® AQ_{ueous} je občutljiv na prenizek pH, ki sva ga midva že v sami učinkovini *de facto* dosegla, zato uporaba tega testa ni bila možna, midva pa sva morala najti drugo metodo, da bi lahko ovrednotila vpliv izvlečka na celice. Zato sva prosila za mikroskopske slike celic, ker bi se tako ali drugače tudi na mikroskopski ravni videlo, če so prisotne razlike v številu in obliki/morfologiji celic.



Slika 13: Kompletno gojišče PC – 3.



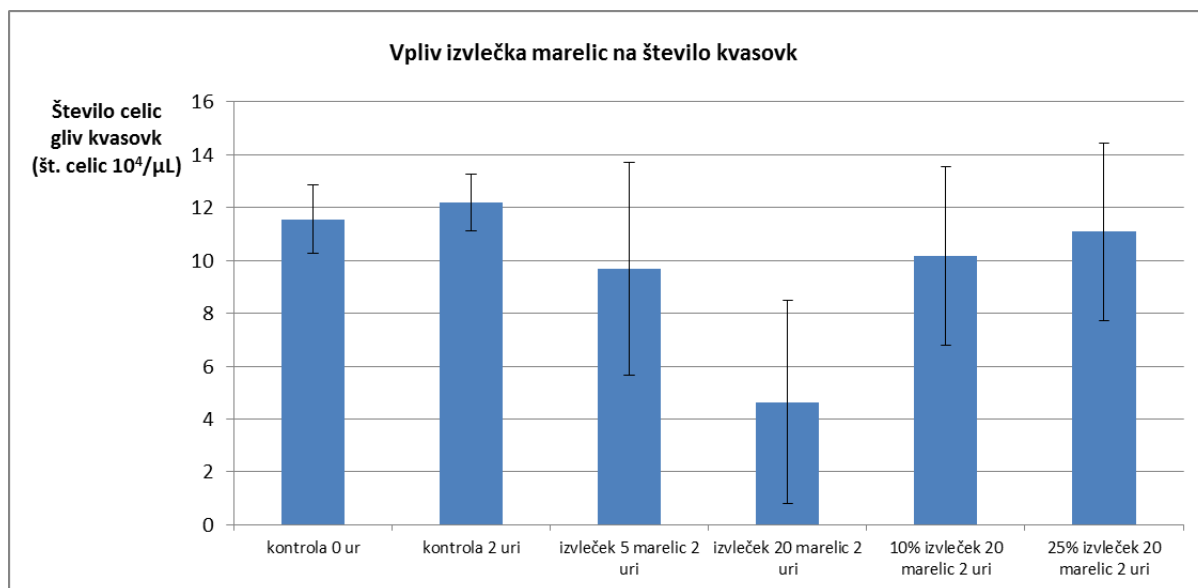
Slika 14: Reagent CellTiter 96 Aqueous se je v bolj rjavih poljih prehitro začel spreminjati v formazan.



Slika 15: Priprava na aplikacijo na mikrotitrne ploščice v sterilni komori.

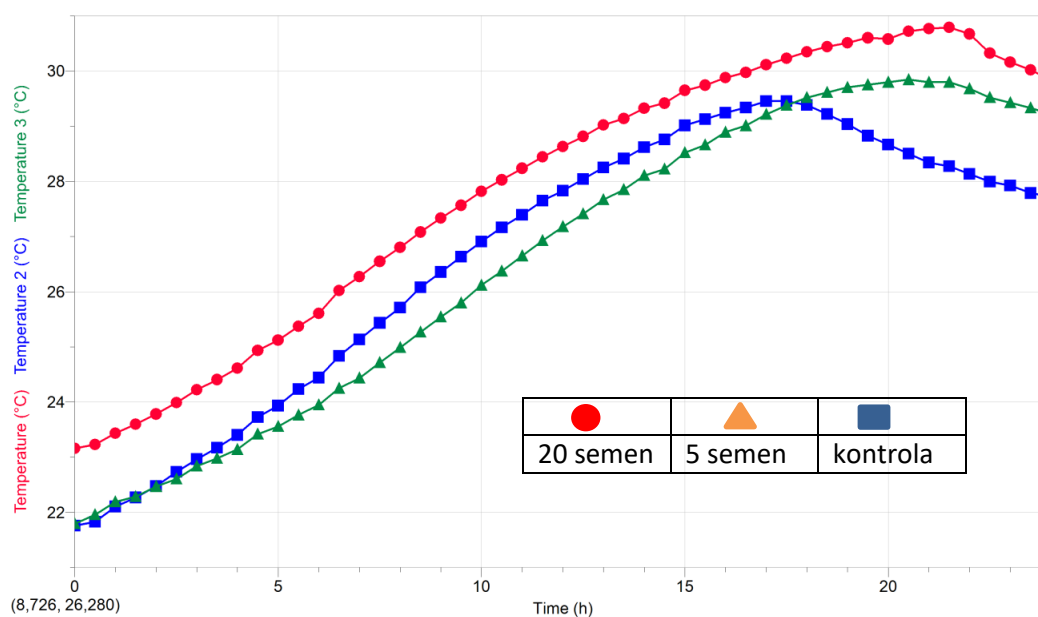
2.2. MERITVE

2.2.1. UGOTAVLJANJE VPLIVA IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC NA ŠTEVILO KVASOVK *Saccharomyces cerevisiae*



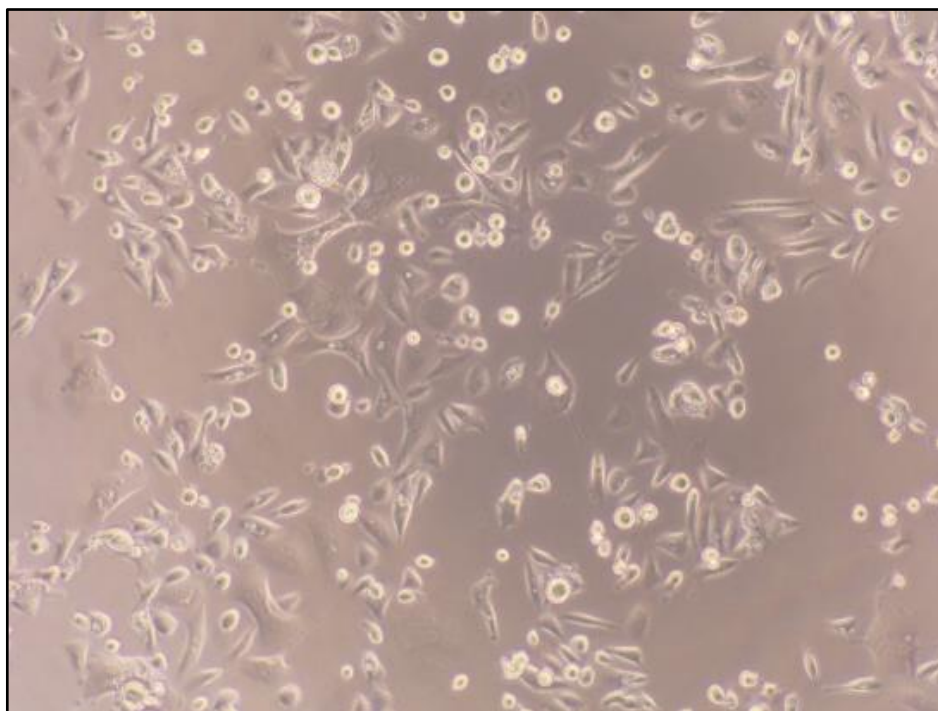
Graf 1: Vpliv izvlečka marelic na število kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v odvisnosti od časa.

2.2.2. UGOTAVLJANJE VPLIVA IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC NA AKTIVNOST KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* V ODVISNOSTI OD ČASA

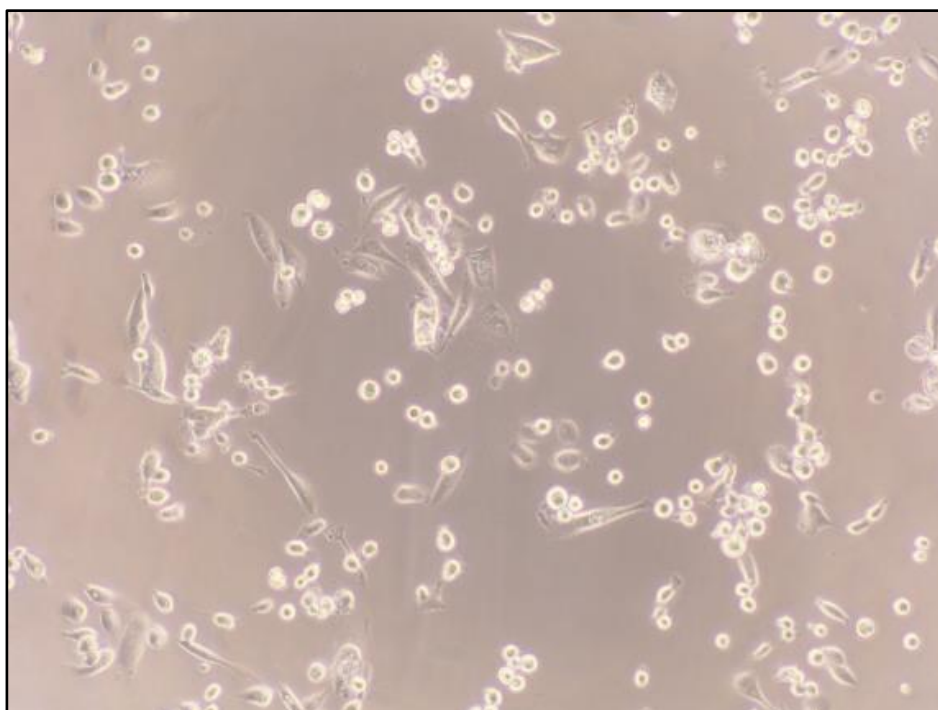


Graf 2: Vpliv izvlečka marelic na aktivnost kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v odvisnosti od časa.

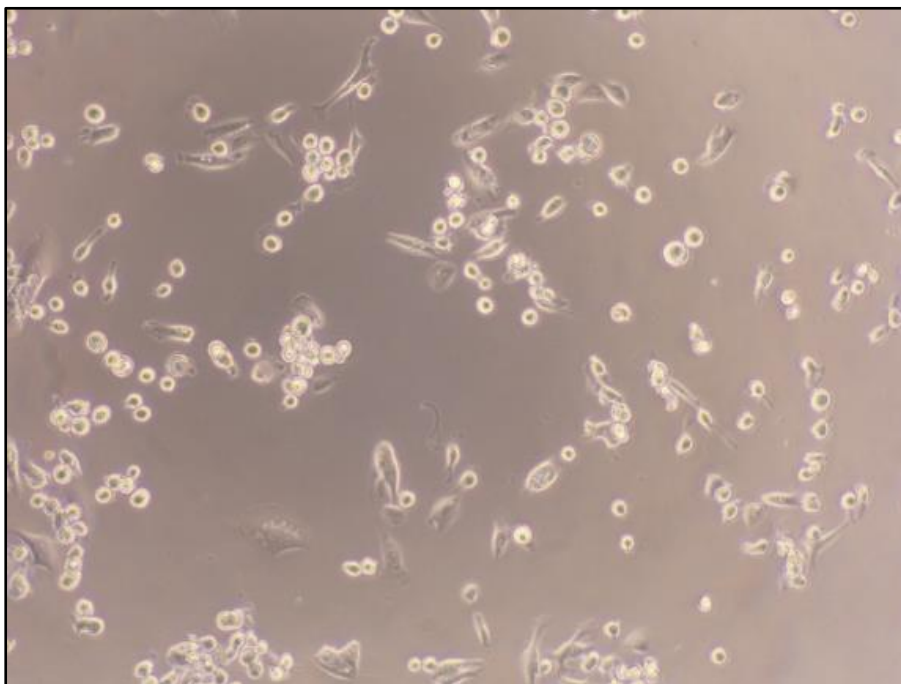
2.2.3. SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU



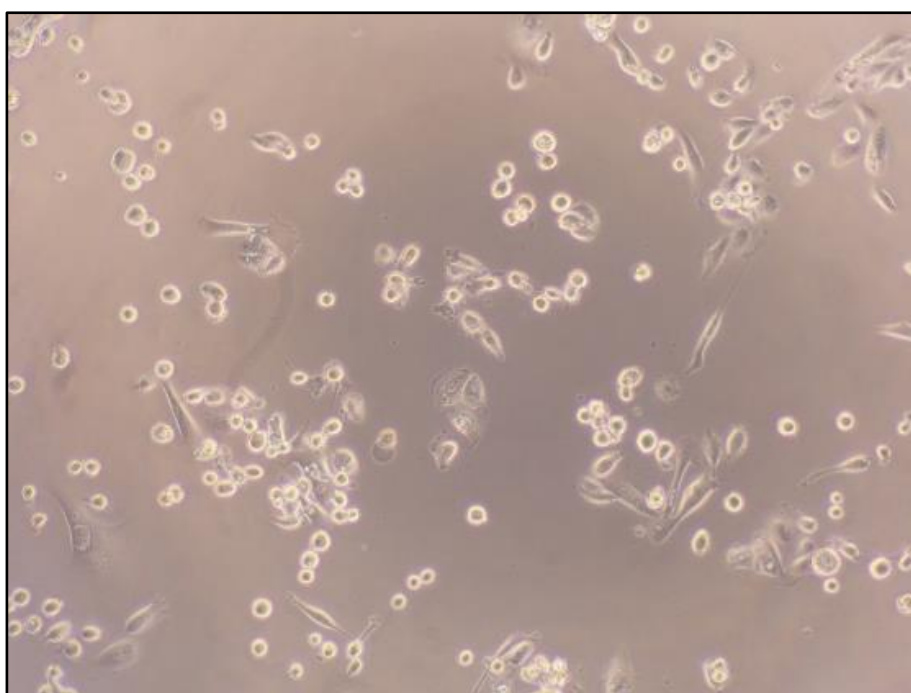
Slika 16: Celična linija rakavih celic PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času brez dodanega izvlečka.



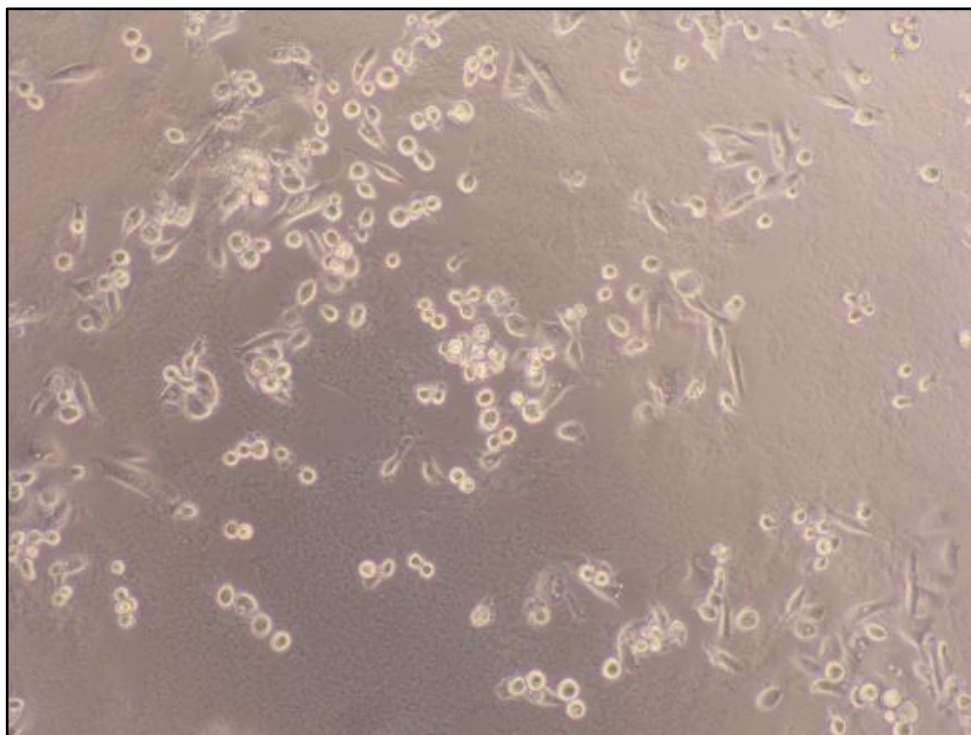
Slika 17: Celična linija rakavih celic PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodano citronsko kislino.



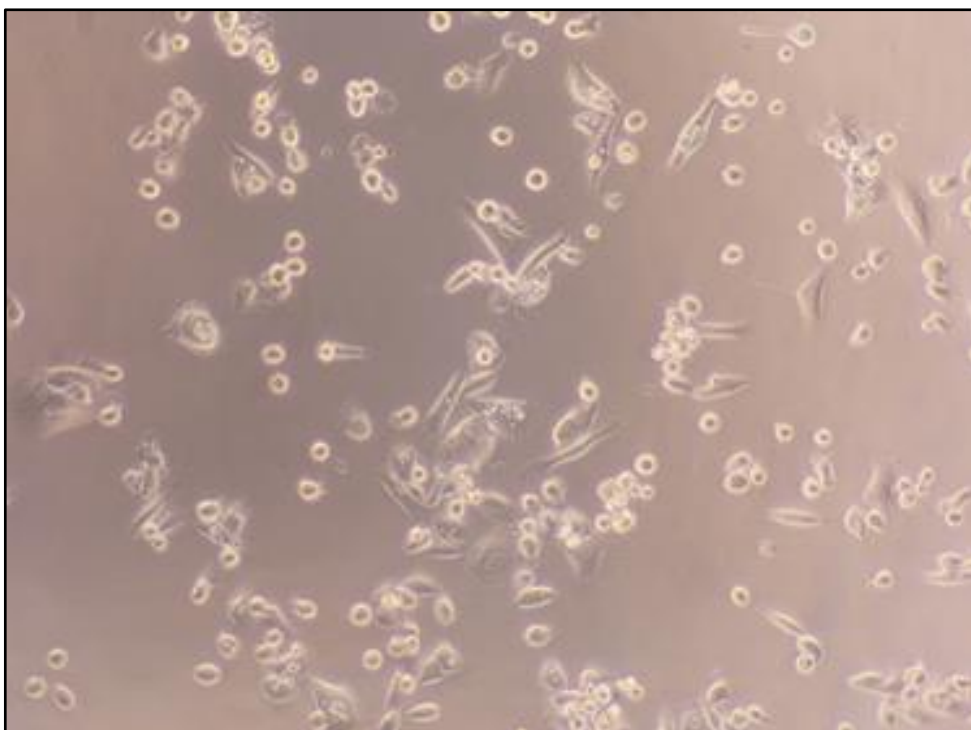
Slika 18: Celična linija rakavih celic PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodanim izvlečkom petih mareličnih jedrc s koncentracijo 100%.



Slika 19: Celična linija rakavih celic PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodanim izvlečkom petih mareličnih jedrc s koncentracijo 12,5%.



Slika 20: Celična linija PC -3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodanim izvlečkom dvajsetih mareličnih jedrc s koncentracijo 100%.



Slika 21: Celična linija PC – 3 po 48 – urnem inkubacijskem času z dodanim izvlečkom dvajsetih mareličnih jedrc s koncentracijo 12,5%.

3. RAZPRAVA

3.1. RAZPRAVA O VPLIVU IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC NA RAST IN RAZMNOŽEVANJE KVASOVK

Graf 1 prikazuje vpliv izvlečka marelic na rast in razvoj gliv kvasovk. Iz grafa lahko razberemo, da je v kontrolnem vzorcu (čas 2h), ki ni bil tretiran z izvlečkom marelic, več celic, kot v prvem kontrolnem vzorcu (čas 0). To je posledica uspešnega razmnoževanja kvasovk v tem času.

Pri primerjanju različnih koncentraciji izvlečka 20 semen marelic na grafu opazimo, da je večje število kvasovk v vzorcu z 25% izvlečkom 20 marelic. V vzorcu z 10% izvlečkom 20 marelic je število kvasovk manjše, kar pomeni, da je bilo razmnoževanje zavrto. Razlika v številu celic kvasovk ni velika. Glede na število celic v kontrolnem poskusu ni večjih odstopanj od števila celic v vzorcu z 25% in 10% izvlečkom 20 marelic.

S temi rezultati lahko potrdimo najino 2. hipotezo. Izvleček 20 semen marelic s koncentracijo 10% in 25%, ne vpliva na rast in razvoj celic gliv kvasovk.

Ugotavljala sva vpliv izvlečka iz 5 in 20 semen marelic na število kvasovk, torej na uspešnost razmnoževanja. Na grafu lahko opazimo da se je v vzorcu z izvlečkom 5 semen število kvasovk zmanjšalo, vendar razlika ni velika. Večja razlika je v številu kvasovk med kontrolnim vzorcem in vzorcem tretiranim z izvlečkom 20 semen marelic. Tu se je število gliv kvasovk zmanjšalo za več kot polovico. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepava, da je bilo v izvlečku prisotne več učinkovine amigdalina, kar je vplivalo na razmnoževanje gliv kvasovk oz. je na njih vplivalo toksično.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko delno potrdimo 3. hipotezo. Ne glede na količino semen marelic, izvleček nima vpliva na rast in razvoj celic kvasovk. Izvleček 5 semen marelic ni vplival na celice. Vendar sva opazila, da je izvleček 20 marelic imel vpliv na celice. Količina celic je manjša.

Ob pritrditvi druge in tretje hipoteze in ob analiziranju podatkov, lahko potrdimo najino 1. hipotezo. Izvleček semen marelic, ne vpliva na rast in razvoj celic gliv kvasovk, kot modelnega organizma.

3.2. RAZPRAVA O VPLIVU IZVLEČKA MARELIČNIH JEDRC NA AKTIVNOST KVASOVK

Graf 2 prikazuje aktivnost gliv kvasovk. Glive kvasovk vršijo proces alkoholnega vrenja. Pri tem se sprošča energija v obliki toplote. Z merjenjem temperature smo tako posredno ugotavljali aktivnost kvasovk v času 24 ur.

Na grafu med krivuljami ne opazimo bistvenih razlik. Meritve so zelo podobne, kar sva pričakovala, saj glede na to, da naj izvleček ne bi imel vpliva na rast in razmnoževanje kvasovk, tudi manjše aktivnosti nisva pričakovala. Po 24 urah meritev opazimo, da vse tri krivulje naraščajo vzporedno. Začetek rdeče krivulje je odstopal, vzrok je bila različna začetna temperatura oziroma napaka v poskusu. Izvleček 5 in izvleček 20 semen marelic ni vplival na aktivnost gliv kvasovk.

Na grafu lahko opazimo padec aktivnosti na modri krivulji ob času 17 in na rdeči in zeleni krivulji ob času 20. Sklepava, da je pri alkoholnem vrenju nastal alkohol, ki je postal toksičen za rast in razvoj kvasovk. Tako se je število kvasovk zmanjšalo in s tem je aktivnost celic upadla.

Ob dobljenih podatkih ponovno potrjujeva najino prvo hipotezo. Izvleček semen marelic ne vpliva na rast in razvoj modelnega organizma gliv kvasovk.

Potrjujeva tudi četrto hipotezo. Izvleček ne vpliva na aktivnost razmnoževanja kvasovk.

3.3. ANALIZA SLIK CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU

3.3.1 ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU BREZ DODANE UČINKOVINE.

V primerjavi z drugimi slikami posameznih gojišč je celic več, ker je tudi koncentracija samih celic največja (100%). Celice so razporejene v večih nivojih; podolgovate, temnejše strukture so celice, ki so se v 48 – urnem časovnem obdobju prilepile na podlago celične posode, okrogle in svetlejše strukture pa so celice, katerih adhezijske molekule so se zaradi tripsina odlepili od podlage in se še niso pritrdile na samo podlago.

Večjih opaženih razlik ni, ker so bila tri polja s samo celicami in njihovimi gojišči na celični ploščici le osnova za nadaljne poskuse.

3.3.2. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANO CITRONSKO KISLINO.

Število celic je opazno manjše. V vsako vdolbinico smo nasadili enako koncentracijo celic, ki so se pritrdile. Naslednji dan je bilo potem v vsaki vdolbinici enako število celic. Takrat smo odstranili gojišče in dodali gojišče, gojišče s citronsko kislino oziroma gojišče z izvlečkom. Iz tega lahko sklepamo, da je že sama citronska kislina pobila veliko celic, zato je bilo po 48 – urah toliko manj celic. Tri polja v katera smo aplicirali citronsko kislino, so le služila kot kontrole, ki bi pokazale vpliv citronske kisline na celice.

Na sliki sta spet opaženi dve celični strukturi; podolgovate, temnejše strukture so celice, ki so se prilepile na podlago, okrogle in svetlejše pa so celice, ki niso pritrjene

na podlago. Poleg tega, da jih je opazno manj, večjih morfoloških posebnosti ni, ker tudi ni dodane učinkovine.

Tri polja s celicami v gojišču z dodano citronsko kislino brez učinkovine so služile za predogled po dodatku reagenta CellTiter 96® AQ_{ueous}. Prav zaradi tega smo lahko »okrivili« citronsko kislino za neuspeh testa MTS, kajti tukaj se je barva razvila neprimerno hitreje, kot v polju brez citronske kisline. Iz morfološkega vidika se le malo razlikujejo od dejanskega adenokarcinoma.

3.3.3. ANALIZA CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANIM IZVLEČKOM PETIH MARELIČNIH JEDRC S KONCENTRACIJO 100%.

Število celic ni dosti manjše od prejšnje slike, zato lahko sklepava, da učinkovina ne daje takih rezultatov, vsaj kar zadeva izvleček iz petih mareličnih koščic. Lahko pa opazimo, da so se odlepljene celice – torej celice, katerih adhezijske molekule je tripsin razgradil – so se v večini sprijele med sabo, kar lahko nakazuje povečano celično adhezijo.

Še kar ni opaznih nobenih celic, ki bi bile v karkšnemkoli vidiku oškodovane zaradi dodajanja učinkovine, zato lahko trdimo, da učinkovina izvlečka iz petih mareličnih koščic pri koncentraciji 100% zanesljivo ne daje antikancerogenega učinka na kakršnikoli celični ravni. Zato pričakujemo, da tudi 12,5% koncentracija izvlečka ne bo pokazala nikakršnih rezultatov. Prav tako je število celic praktično enako, kot na sliki iz prejšnjega poglavja.

Na podlagi te slike celic PC – 3 potrjujeva vse tri hipoteze.

3.3.4 ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANO UČINKOVINO IZVLEČKA PETIH MARELIČNIH KOŠČIC S KONCENTRACIJO 12,5%.

Vidimo nekaj celične adhezije. Prav tako vidimo podolgovate, temnejše strukture, ki so celice, katere adhezijske molekule so se prijele na podlago posode za gojenje celičnih kultur, vidimo pa okrogle, svetlejše strukture, ki so celice, še odlepljene od podlage posode.

Oblika celic PC – 3 je lahko precej različna. V sredini slike lahko vidimo tri pritrjene celice, ena zraven druge.

Kot pričakovano ni opaziti posebnega, nobena celica ne kaže znakov niti najmanjše nekroze, zato lahko z gotovostjo trdimo, da tudi 12,5% koncentracija izvlečka petih mareličnih koščic ne kaže nobene antikancerogene aktivnosti.

Na podlagi te slike celic PC – 3 celic potrjujeva vse tri hipoteze.

3.3.5. ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANO UČINKOVINO IZVLEČKA DVAJSETIH MARELIČNIH KOŠČIC S KONCENTRACIJO 100%.

Na sliki dobro vidimo, da je število odlepljenih celic občutno večje, kot število celic, pritrjenih na podlago.

Na podlagi te slike PC – 3 celic, potrjujeva vse tri hipoteze.

3.3.6 ANALIZA SLIKE CELIČNE LINIJE RAKAVIH CELIC PC – 3 PO 48 – URNEM INKUBACIJSKEM ČASU Z DODANO UČINKOVINO IZVLEČKA DVJASETIH MARELIČNIH KOŠČIC S KONCENTRACIJO 12,5%

Na sliki vidimo odlepljene in pritrjene celice. Opaznejših struktur, ki bi kakorkoli indicirale antikancerogeno delovanje učinkovine, ni.

Na podlagi te slike PC – 3 celic, potrjujeva vse tri hipoteze.

4. ZAKLJUČEK

Ob izdelavi raziskovalne naloge sva se naučila veliko novih stvari, ki jih pri rednem pouku ne bi obravnavali. Praktično sva se spoznala z laboratorijskim delom in se naučila novih načinov raziskovanja. Izvedla sva postopek refluksiranja in se naučila uporabljati hemocitometer. Prav tako sva spoznala delo v celičnem laboratoriju, za katerega lahko trdimo, da nama bo izredno prav prišel v nadaljnjem šolanju na fakulteti.

Pri najinem delu sva naletela na težavo, ker je načrt za eksekucijo testa MTS propadel, vendar nisva obupala in našla novo pot ter rezultate primerjala slikovno. Ob koncu lahko zapišemo, da sva dobila rezultate, ki sva jih pričakovala in s tem potrdila, da je vpliv amigdalin le placebo, prodajanje tovrstnih izdelkov v tretiranje rakavih obolenj pa le tržna niša, ki ne temelji na nobenih znanstveno – empiričnih dokazih, pač pa le po pričevanju posameznikov. Kljub temu pa puščava predvsem nadaljnim farmacevtskim raziskavam odprta vrata, kajti tako farmakognozija kot tudi področje raziskovanja cianogenih glikozidov je izredno široko, zato najine podatke nočemo aplicirati na celotno področje cianogenih glikozidov.

V prihodnosti bi se osredotočila na izdelavo izvlečka brez uporabe raztopine citronske kisline, kar bi lahko vodilo v pravilno izvedbo testa MTS. Prav tako bi lahko šla še dlje in z bolj zapletenimi postopki izolirala ter preverila čistost izoliranega amigdalina.

5. VIRI

1. Pečar Fonović, Urša, idr.⁵ 2009. *Vaje iz farmacevtske biokemije*. 2. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo. ISBN 9616378228, 9789616378222.
2. Grant, Boileau, J.C. 1962. *Grant's Atlas of Anatomy*. 5. USA: Williams & Wilkins Company. ISBN ni.
3. Badal McCreath, Simone, in Delgoda, Rupika. 2016. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*. 1. Založba: Academic Press. ebook ISBN: 9780128020999.
4. Wilson, Keith in Walker, John. 2005. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Založba: Cambridge University Press. ISBN 0521828899, 9780521828895.
5. Čili prebivalci ledeniške doline – Hunze [online]. aura.si. [citirano: 2.2.2017]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://www.aura.si/cili-prebivalci-ledeniske-doline-hunze/>>
6. Please don't eat apricot kernels [online]. Chronicleflask.com. [citirano: 3.2.2017]. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://chronicleflask.com/2015/02/06/please-dont-eat-apricot-kernels/>>.
7. Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin [online]. Cancer journal.net. [citirano: 2.3.2017]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482;year=2014;volume=10;issue=5;spage=3;epage=7;aulast=Song>>
8. Amygdalin Blocks Bladder Cancer Cell Growth *In Vitro* by Diminishing Cyclin A and cdk2 [online]. ncbi.nlm.nih.gov. [citirano: 6.3. 2017.]. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4138189/>>
9. Toxicity of apricot kernels [online]. Livestrong.com. [citirano: 21.1. 2017]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://www.livestrong.com/article/488111-toxicity-of-apricot-kernels/>> .
10. Apricot Seeds: Fight Cancer or Too Dangerous? [online]. Draxe.com. [citirano 5.2.2017]. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://draxe.com/apricot-seeds/>>.
11. Marelična jedrca in njihova zdravilna moč [online]. Bodieko.si. [citirano 2.3.2017]. Dostopno na spletnem naslovu: <<https://www.bodieko.si/marelicne-koscice-jedrca>>.
12. Vitamin B17 ali laetril proti raku [online]. alternativno – zdravljenje.si [citirano 2.3.2017]. Dostopno na spletnem naslovu: <<http://alternativno-zdravljenje.si/alternativno-zdravljenje-raka/vitamin-b17-ali-laetril-proti-raku.html>> .