

Na osnovu Ugovora o poslovno-tehničkoj saradnji sklopljenog između INSTITUTA ZA MEDICINSKA ISTRAŽIVANJA i "INTERNATIONAL HEALTH" dostavljamo izveštaj

Ispitivanja anti-tumorske aktivnosti i citotoksičnosti preparata **GE132+Natural**

Ispitivanja rađena u Laboratoriji za eksperimentalnu hematologiju i matične ćelije, Instituta za medicinska istraživanja, obuhvatala su određivanje citotoksičnosti i anti-tumorske aktivnosti dijetetskog proizvoda **GE132+Natural**, firme International Health. Ovaj proizvod dobijen je u formi kapsula, pri čemu je deklarirano da jedna kapsula od 500 mg sadrži kombinaciju pet veoma snažnih antioksidanasa i to:

- ekstrakt gljive *Ganoderma lucidum* (ili Reiši gljiva) 180mg,
- matični mleč 160mg,
- resveratrol 100mg,
- likopen 35mg i
- sulforafan 25mg.

Određivanje **anti-proliferativnog efekta** preparata **GE132+Natural** obuhvatalo je testiranje dejstva preparata na tri tumorske ćelijske linije:

- linija PC-3 (humana ćelijska linija kancera prostate),
- linija MCF-7 (humana ćelijska linija adenokarcinoma dojke)
- linija SW480 (humana ćelijska linija kolorektalnog adenokarcinoma)

kao i na kontrolnoj ćelijskoj liniji

- linija EA.hy 926 (humana endotelijalna ćelijska linija).

PC-3 humana ćelijska linija je tzv. "klasična" linija kancera prostate sa velikim metastatskim potencijalom, s obzirom da je dobijena iz koštanih metastaza uznapredovalog androgen-nezavisnog raka prostate. PC-3 ćelije ekspimiraju PSA (Prostata Specifičan Antigen) i imaju nisku aktivnost testosteron-5-alfa reduktaze.

MCF-7 humana ćelijska linija adenokarcinoma dojke je ćelijska linija epitelijalnog tipa, izolovana iz malignog pleuralnog izliva. MCF-7 ćelije ispoljavaju specifične karakteristike epitela dojke, kao što je očuvana estrogenska osetljivost i zadržan nivo estrogenskih receptora.

SW480 humana ćelijska linija kolorektalnog adenokarcinoma je ćelijska linija epitelijalnog tipa, izolovana iz primarnog adenokarcinoma kolona ("Dukes' type B"), sa karakteristikom produkcije karcinoembrionalnog antigena (CEA) i očuvanom hormonskom osetljivošću.

EA.hy 926 humana endotelijalna ćelijska linija je "hibridna" ćelijska linija nastala fuzijom HUVEC ćelija, primarnih ćelija humane umbilikalne vene, sa A549 ćelijama humanog adenokarcinoma pluća. Ova ćelijska linija ispoljava morfološke, fenotipske i funkcionalne karakteristike humanih vaskularnih endotelijalnih ćelija i koristi se kao *in vitro* model sistem za proučavanje različitih fizioloških i patoloških procesa, prvenstveno u ispitivanjima procesa angiogeneze.

Određivanje **citotoksičnog efekta** preparata **GE132+Natural** obuhvatalo je testiranje dejstva preparata na primarnim humanim ćelijama, i to mezenhimalnim matičnim ćelijama ("Mesenchymal Stem Cells" - MSC) izolovanim iz pulpe mlečnih zuba ("DP-MSC"), i ćelijama krvi zdravih ljudi. Mezenhimalne matične ćelije su specijalizovane matične ćelije nađene u mnogim tkivima odraslog organizma (kostna srž, jetra, mozak, srce, zubna pulpa, folikul dlake, koža, mišići, masno tkivo, krv, retina, kornea, epitel gastrointestinalnog trakta) u kojima imaju prvenstveno ulogu u održavanju tkivne homeostaze. U poslednjih 15 godina mezenhimalne matične ćelije su izolovane iz gotovo svih adultnih tkiva, jer su ih osobine samoobnavljanja sopstvene populacije i sposobnosti diferentovanja u ćelije različitih tkiva mezodermalnog porekla, učinile najpristupačnijim izvorom matičnih ćelija za ćelijsku terapiju. Međutim, zbog lakoće sa kojom se mogu prikupiti i jednostavnosti procedura kultivacije i *ex vivo* ekspanzije ovih ćelija, mezenhimalne matične ćelije su i značajan model sistem za razvoj i ispitivanje delovanja i/ili predikciju toksičnosti novih farmakološki aktivnih supstanci i potencijalnih lekova. U ovim ispitivanjima koristili smo mezenhimalne matične ćelije izolovane u Laboratoriji

za eksperimentalnu hematologiju i matične ćelije, Instituta za medicinska istraživanja, iz pulpe mlečnih zuba - DP-MSc, koje i tokom dugotrajnog kultivisanja ispoljavaju sve karakteristike predložene od strane *Internacionalnog društva za ćelijsku terapiju* za definisanje mezenhimalnih matičnih ćelija (Dominici et al. 2006, Nikolić et al. 2011). Pored mezenhimalnih matičnih ćelija za ispitivanje citotoksičnog efekta preparata **GE132+Natural** na primarne, normalne humane ćelije, korišćene su i ćelije pune krvi zdravih ljudi.

Materijal i metode

Ekstrakt preparata. Za ispitivanje antitumorske aktivnosti i citotoksičnosti preparata **GE132+Natural**, usled njegove nepotpune rastvorljivosti u velikom broju rastvarača, korišćen je "ekstrakt" originalne kapsule preparata, čija je priprema opisana u daljem tekstu. Od početnog rastvora koji je sterilisan filtracijom kroz 0,2 µm filter, pripremane su različite koncentracije ekstrakta koje su dodavane u ćelijske kulture, a koncentracije predstavljene u rezultatima su efektivne koncentracije u finalnom rastvoru testa.

Ćelijska kultura. Humane tumorske ćelijske linije, PC-3, MCF-7, SW480, kao i humana endotelijalna ćelijska linija EA.hy 926 nabavljene su od ATCC ("American Type Culture Collection", Rockville, USA). DP-MSc su izolovane na prethodno opisan način (Nikolić et al. 2011). Sve navedene ćelijske linije i DP-MSc održavane su u DMEM medijumu (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma St. Louis, MO, USA) sa dodatim 10% FBS (Fetalnim Govedim Serumom, Fetal Bovine Serum-FBS, PAA Laboratories, Linz, Austria) i 100 U/ml penicilin/streptomicina (PAA Laboratories, Linz, Austria). Ćelijske kulture održavane su u inkubatoru, u atmosferi zasićenoj vodenom parom, sa 5% CO₂ na 37 °C.

MTT test. Za određivanje anti-proliferativnog i citotoksičnog efekta preparata **GE132+Natural** korišćen je kolorimetrijski MTT test koji se zasniva na redukciji žute tetrazolijumove soli-MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mitohondrijalnom sukcinat dehidrogenazom iz metabolički aktivnih ćelija, pri čemu nastaje plavi nerastvorni formazan.

Za test, ćelije su zasejavane u koncentraciji od 1×10^4 ćelija/100 μ l/otvoru ploče sa 96 otvora i pre-kultivisane u standardnom medijumu za kultivaciju 24h. Narednog dana, ćelije su tretirane sa po 100 μ l rastućih koncentracija ekstrakta ispitivanog **GE132+Natural** preparata ili medijumom i odgovarajućim rastvaračem kao kontrolama. Nakon odgovarajućih inkubacija (24h-48h), medijum u kome su inkubirane ćelije je izvučen, a ćelijama je dodavano 10 μ l MTT-a koncentracije 0,5 mg/ml. Nakon tročasovne inkubacije na 37°C, nastali kristali formazana rastvarani su dodatkom rastvora 0.1 N HCl u izopropanolu. Optička gustina merena je na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče na 540 nm (Labsystems-Multiskan PLUS, Finska). Test je raden u triplikatu i za svaku ćelijsku liniju je ponavljan tri puta.

Test citotoksičnosti. Ispitivanje uticaja preparata **GE132+Natural** na smrtnost ćelija krvi (liza ćelija) zdravih ljudi vršeno je testom određivanja broja ćelija nakon direktnog kontakta sa preparatom u uslovima *in vitro* inkubacije.

Periferna krv zdravih donora uzimana je iz jugularne vene sa heparinom kao antikoagulansom. Za inkubaciju, na 1 ml pune krvi dodavano je po 0,5 ml uzorka (rastućih koncentracija preparata ili kontrolnih medijuma: fiziološki rastvor-FR, DMEM medijum i odgovarajuće razblaženje rastvarača apsolutnog alkohola). Uzorci su inkubirani 1h i 4h na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti. Po završetku inkubacije u svakom uzorku odredivan je broj leukocita (LEUKO), eritrocita (ERITRO), trombocita (TROMBO), diferencijalni sastav ćelija periferne krvi i vrednost hematokrita (Hct). Testiranje je ponavljano tri puta.

Odredivanje broja leukocita, eritrocita i trombocita je vršeno standardnim metodama. U odgovarajućem melanžeru za leukocite, odnosno eritrocite, puna krv je razblaživana sa *Türk*-ovim rastvorom, *Häyem*-ovim rastvorom ili rastvorom amonijum oksalata, nakon čega je brojanje ćelija vršeno u *Spenser*-ovoj komorici. Diferencijalni sastav ćelija periferne krvi odredivan je na razmazima periferne krvi bojenim po metodi *May-Grünwald-Gimsa*, leukocitarna formula je odredivana na 100 ćelija sa jedrom. Hematokrit je odredivan mikrohematokriskom metodom.

Statistička analiza. Standardni numerički parametri (srednja vrednost, standardna devijacija, standardna greška), kao i *Student*-ov t-test za odredivanje značajnosti razlika između pojedinih eksperimentalnih grupa odredivani su korišćenjem Origin PC programa. Statistički značajnom je smatrana verovatnoća manja od 0,05.

Ispitivanje rastvorljivosti preparata GE132+Natural i modifikovanje MTT testa

Priprema testiranja su ukazala s jedne strane na slabu rastvorljivost sadržaja originalne kapsule preparata **GE132+Natural** u vodi, a s druge strane na obojenost rastvora, koja je bitno uticala na rezultate kolorimetrijskog MTT testa. Stoga su početna ispitivanja bila usmerena na određivanje optimalne rastvorljivosti dobijenog preparata, kao i na modifikovanje samog MTT testa u cilju dobijanja relevantnih rezultata.

Rastvorljivost sadržaja originalne kapsule preparata **GE132+Natural** testirana je u različitim organskim i neorganskim rastvaračima i na različitim pH vrednostima, a u skladu sa literaturnim podacima o rastvorljivosti svake od pojedinačnih komponenti kapsule. Testirani su sledeći rastvarači i uslovi rastvaranja, sa napomenom da je uslov rastvaranja na povišenoj temperaturi odnosno u ključalom rastvoru izbegnut, s obzirom da podaci iz literature pokazuju da toplota utiče na razgradnju pojedinih komponenti preparata:

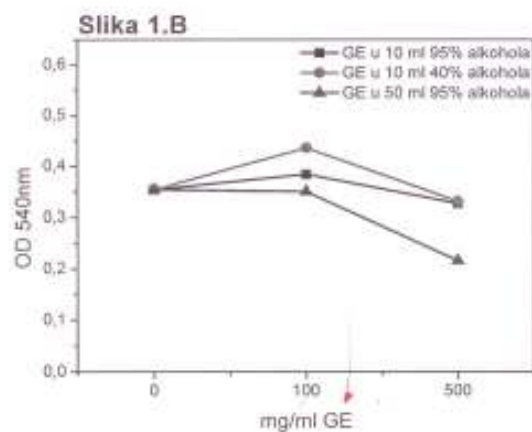
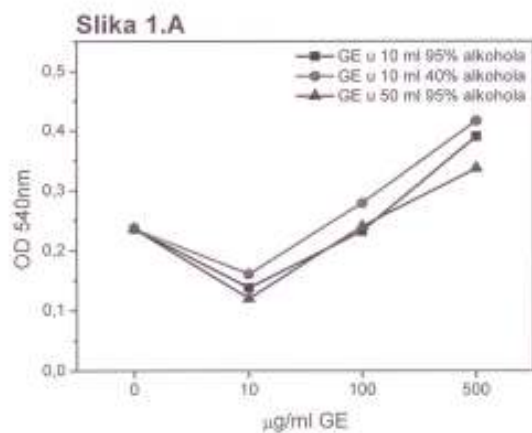
1. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml H₂O, 24h na sobnoj temperaturi,
2. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml H₂O, 24h na 37°C,
3. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml apsolutnog alkohola/95%, 24h na sobnoj temperaturi,
4. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml apsolutnog alkohola/95%, 24h na 37°C,
5. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 40% alkohola, 24h na sobnoj temperaturi,
6. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 40% alkohola, 24h na 37°C,
7. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml DMSO, 24h na sobnoj temperaturi,
8. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml DMSO, 24h na 37°C,
9. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 100 mM glicinskog pufera pH=1,95, 24h na sobnoj temperaturi,
10. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 100 mM glicinskog pufera pH=1,95, 24h na 37°C,
11. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml - 100 mM glicinskog pufera pH=8,7, 24h na sobnoj temperaturi,
12. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml - 100 mM glicinskog pufera pH=8,7, 24h na 37°C,
13. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 100 mM acetatnog pufera pH=2,2, 24h na sobnoj temperaturi,

14. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 100 mM acetatnog pufera pH=2,2, 24h na 37°C,
15. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 100 mM acetatnog pufera pH=7,5, 24h na sobnoj temperaturi,
16. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 100 mM acetatnog pufera pH=7,5, 24h na 37°C,
17. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml hloroforma, 24h na sobnoj temperaturi,
18. 500 mg sadržaja kapsule u 10 ml 100 mM hloroforma, 24h na 37°C,
19. 500 mg sadržaja kapsule u 50 ml 40% alkohola, 24h na sobnoj temperaturi,
20. 500 mg sadržaja kapsule u 50 ml 40% alkohola, 24h na 37°C.

Utvrđeno je da se sadržaj kapsule ne rastvara u potpunosti ni u jednom od navedenih uslova.

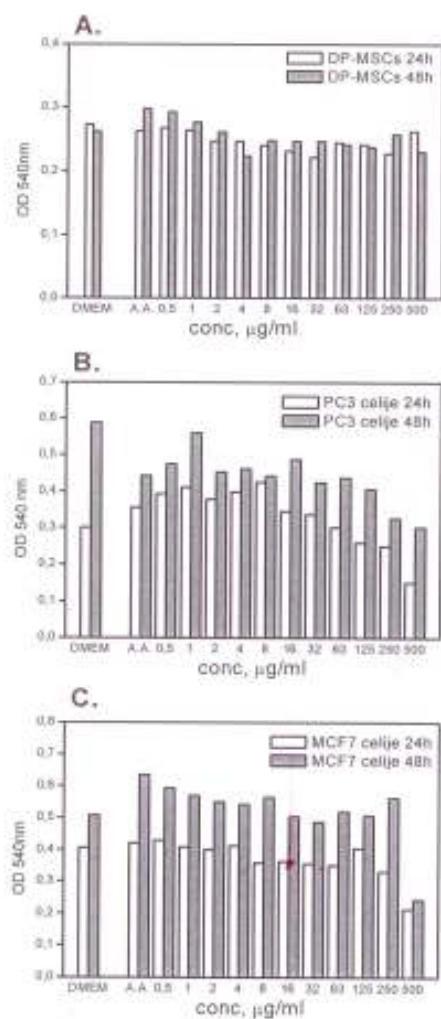
Paralelno sa određivanjem rastvorljivosti sadržaja kapsule preparata **GE132+Natural**, ispitivan je i uticaj boje ekstrakata na dobijanje relevantnih rezultata u MTT testu, s obzirom da je MTT test kolorimetrijski test u kome postoji direktna proporcionalnost između rasta ćelijske kulture i intenziteta boje, koja se utvrđuje spektrofotometrijskim merenjem apsorbance rastvora. Stoga, svaki obojeni rastvor može dovesti do nespecifičnog povećanja apsorbance i lažno-pozitivnih rezultata. Na Slici 1.A prikazan je uticaj koncentracije ekstrakta **GE132+Natural** preparata na povećanje vrednosti očitane apsorbance na 540nm u ne-modifikovanom MTT testu radenom sa PC-3 tumorskim ćelijama. Iz ovog razloga test je morao da se modifikuje i to u smislu uvođenja dodatnog koraka pri izvođenju testa, koji je podrazumevao odstranjivanje uzorka pre dodavanja tetrazolijumove soli-MTT. Na Slici 1.B prikazano je da je izvršenom modifikacijom testa uklonjen uticaj koncentracije samog ekstrakta na vrednost očitane apsorbance.

Na osnovu naših rezultata, kao i literaturnih podataka da je najveći broj komponenti u sadržaju kapsule **GE132+Natural** preparata rastvorljivo u alkoholu, kao i da alkoholni rastvori imaju jači efekat na inhibiciju rasta tumorskih ćelija, za dalja ispitivanja korišćen je ekstrakt pripreman na sledeći način: na 500 mg originalnog sadržaja kapsule dodavano je 10 ml apsolutnog alkohola, sadržaj je inkubiran 24h na temperaturi od 37°C, uz povremeno mešanje. Nakon inkubacije, sakupljen je rastvor iznad taloga i filtriran kroz 0,2 µm filter u cilju dobijanja bistrog i sterilnog rastora za dalji rad u ćelijskim kulturama.



Slika 1. Uticaj koncentracije ekstrakta **GE132+Natural** preparata na vrednosti absorbance u: **A.** ne modifikovanom MTT testu; **B.** modifikovanom MTT testu.

Efekat preparata **GE132+Natural** na tumorske i normalne mezenhimalne matične ćelije u MTT testu upoređivan je i za dva termina inkubacije 24h i 48h (Slika 2). S obzirom da je nakon 48h inkubacije detektovan povišen nivo nespecifične reakcije testa (veća absorbanca u kontrolnim uzorcima, pogotovo tumorskih ćelija), a podjednak anti-proliferativan efekat na tumorske ćelije za dalji rad je korišćena 24h inkubacija preparata sa ćelijama.



Slika 2. Uticaj vremena inkubacije ekstrakta **GE132+Natural** preparata sa normalnim DP-MSC ćelijama i tumorskim PC3 i MCF7 ćelijama na vrednosti absorbance u modifikovanom MTT testu.

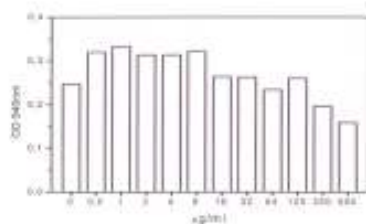
Ispitivanje anti-proliferativnog efekta preparata **GE132+Natural** na tumorskim ćelijskim linijama

Ispitivanja anti-proliferativnog efekta preparata **GE132+Natural** na tumorskim ćelijskim linijama vršeno je MTT testom. Čelije svake od testiranih linija inkubirane su 24h sa rastućim koncentracijama preparata **GE132+Natural**, kao i sa kontrolnim rastvaračima: DMEM medijumom i odgovarajućim razblaženjem apsolutnog alkohola kao rastvarača preparata. S obzirom da u MTT testu postoji direktna proporcionalnost između rasta ćelijske kulture i intenziteta boje, sa smanjenjem intenziteta redukovano MTT-a raste antiproliferativni efekat, odnosno citotoksičnost, ispitivanog uzorka. Kako je test za svaku ćelijsku liniju ponavljan tri puta, rezultati svakog pojedinačnog testa su predstavljani kao promena apsorbance u odnosu na kontrolne vrednosti. Sumirani rezultati svih merenja za svaku od testiranih ćelijskih linija su normalizovani i predstavljeni kao procenat intenziteta redukcije MTT-a u odnosu na kontrolne vrednosti (predstavljene kao 100% rast ćelija).

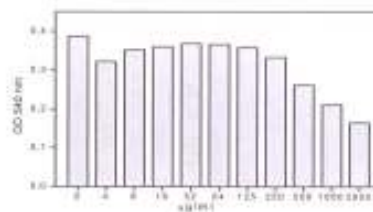
Određivanje anti-proliferativnog efekta preparata **GE132+Natural** na PC-3 tumorskim ćelijama, prikazano je na Slici 3. Određivanje anti-proliferativnog efekta preparata **GE132+Natural** na MCF7 tumorskim ćelijama prikazano je na Slici 4. Određivanje anti-proliferativnog efekta preparata **GE132+Natural** na SW480 tumorskim ćelijama prikazano je na Slici 5. Određivanje anti-proliferativnog efekta preparata **GE132+Natural** na EA.hy 926 ćelijama prikazano je na Slici 6.

Anti-proliferativni efekat preparata bio je podjednako izražen kod svih testiranih tumorskih ćelijskih linija, jer je statistički značajna inhibicija rasta tumorskih ćelija, PC-3, MCF7 i SW480, detektovana već sa koncentracijama preparata od 250 odnosno 500 µg/ml. Ono što bi trebalo posebno naglasiti je da je sličan inhibicioni efekat preparata detektovan i na rast EA.hy 926 humane endotelijalne ćelijske linije, koja je korišćena kao "kontrolna" ćelijska linija. S jedne strane, ovaj nalaz ukazuje da su komponente u preparatu **GE132+Natural** odgovorne za anti-proliferativni efekat "prepoznale" tumorsku komponentu u ovoj hibridnoj ćelijskoj liniji, koja potiče i od A549 ćelija humanog adenokarcinoma pluća. Međutim, ovakav efekat mogao bi da ukaže i na inhibiciono delovanje preparata na proces angiogeneze, s obzirom da je ova ćelijska linija model sistem za proučavanje različitih fizioloških i patoloških procesa, prvenstveno u ispitivanjima procesa angiogeneze.

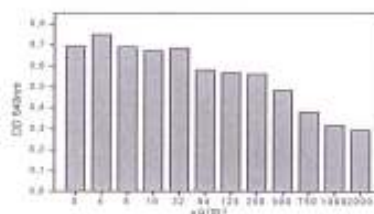
3A. Određivanje #1



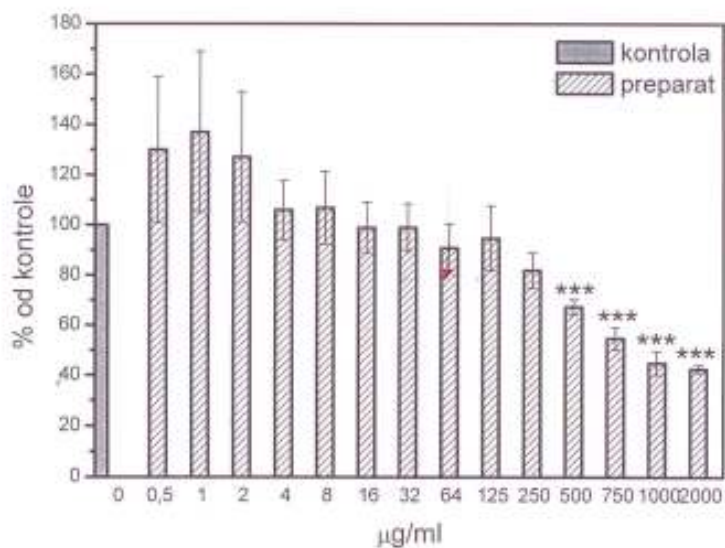
3B. Određivanje #2



3C. Određivanje #3

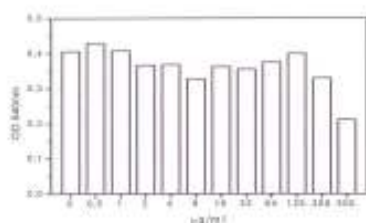


3D. Zbirni rezultat

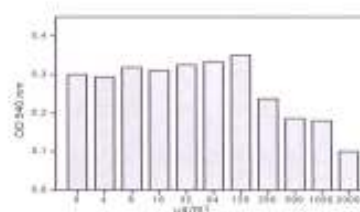


Slika 3. Anti-proliferativni efekat preparata GE132+Natural na PC-3 tumorskim ćelijama. A.-C, Rezultati pojedinačnih eksperimenata, D. Sumirani rezultati – inhibicija proliferacije PC3 ćelijske linije izražena kao procenat od kontrole - 100%, rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija za tri eksperimenata. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; *** p< 0,001.

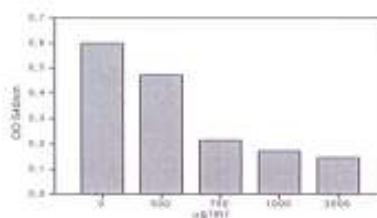
4A. Određivanje #1



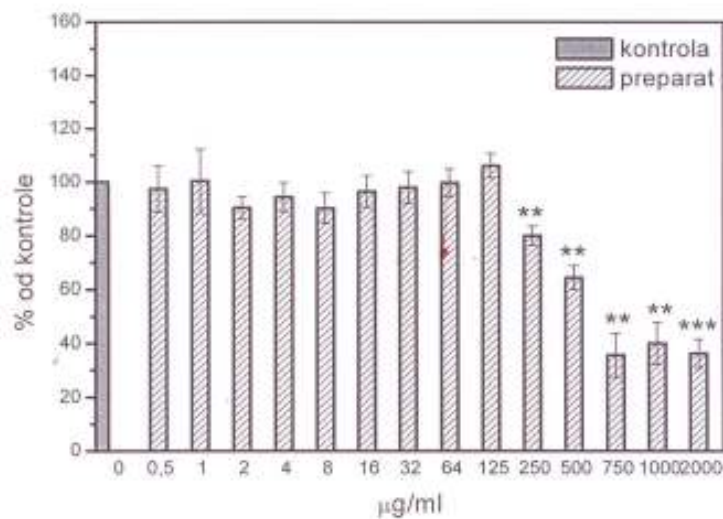
4B. Određivanje #2



4C. Određivanje #3

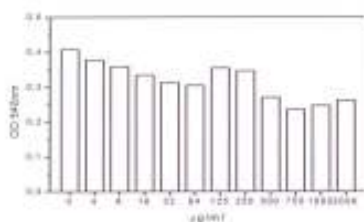


4D. Zbirni rezultat

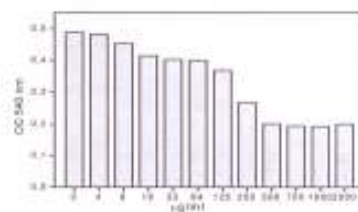


Slika 4. Anti-proliferativni efekat preparata **GE132+Natural** na **MCF7** tumorskim ćelijama. **A.-C.** Rezultati pojedinačnih eksperimenata, **D.** Sumirani rezultati – inhibicija proliferacije MCF7 ćelijske linije izražena kao procenat od kontrole -100%, rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± standardna devijacija za tri eksperimenata. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

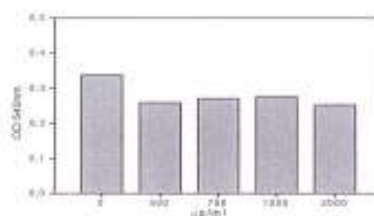
5A. Određivanje #1



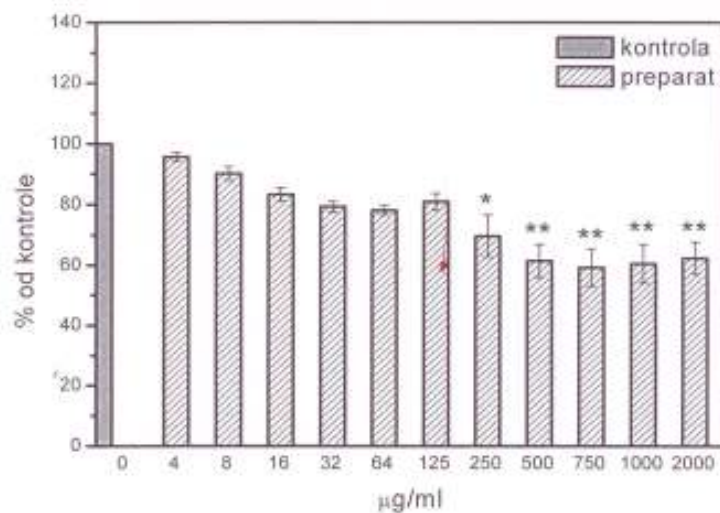
5B. Određivanje #2



5C. Određivanje #3

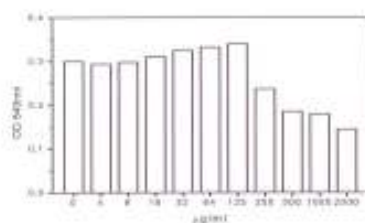


5D. Zbirni rezultat

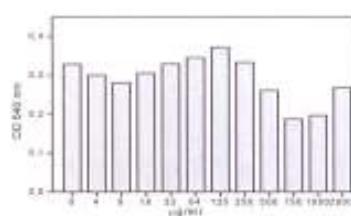


Slika 5. Anti-proliferativni efekat preparata GE132+Natural na SW480 tumorskim ćelijama. A.-C. Rezultati pojedinačnih eksperimenata, D. Sumirani rezultati – inhibicija proliferacije SW480 ćelijske linije izražena kao procenat od kontrole -100%, rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija za tri eksperimenta. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

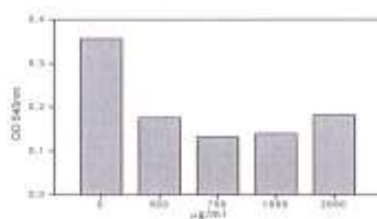
6A. Određivanje #1



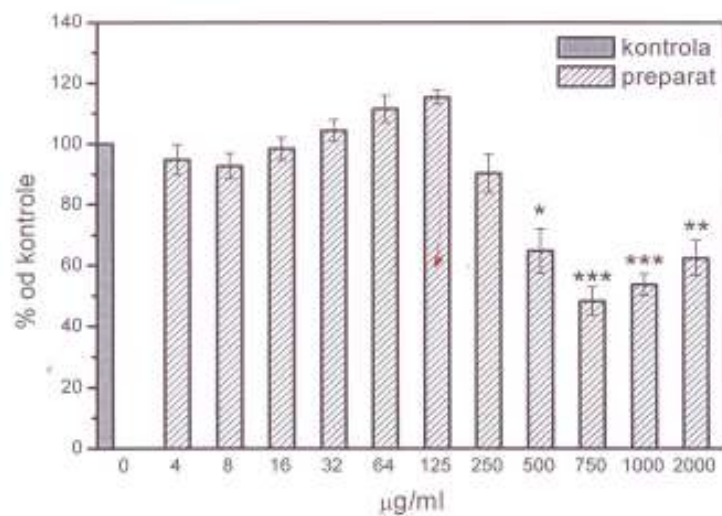
6B. Određivanje #2



6C. Određivanje #3



6D. Zbirni rezultat



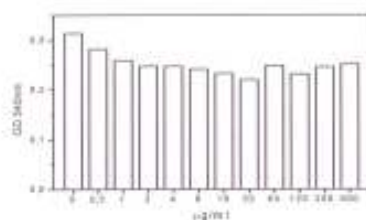
Slika 6. Anti-proliferativni efekat preparata GE132+Natural na EA.hy 926 ćelijama. A.-C. Rezultati pojedinačnih eksperimenata, D. Sumirani rezultati – inhibicija proliferacije EA.hy 926 ćelijske linije izražena kao procenat od kontrole -100%, rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija za tri eksperimenta. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu: *p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001.

Ispitivanje citotoksičnog efekta preparata GE132+Natural na ćelije zdravih donora

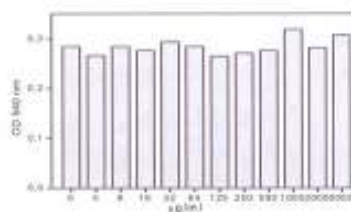
Anti-proliferativni efekat preparata **GE132+Natural**, u smislu citotoksičnog delovanja na ćelije zdravih donora, ispitivan je i na mezenhimalnim matičnim ćelijama izolovanim iz pulpe mlečnih zuba (Slika 7). Dobijeni rezultati pokazali su da u širokom rasponu koncentracija preparat **GE132+Natural** ne inhibira rast i proliferaciju ovih ćelija u MTT testu, što ukazuje da preparat nema toksičan efekat na normalne, zdrave ćelije i da je zapaženi anti-proliferativni efekat specifičan za tumorske ćelijske linije.

Citotoksični efekat preparata **GE132+Natural** ispitivan je i u direktnom kontaktu sa ćelijama periferne krvi zdravih donora. U *in vitro* uslovima, rastuće koncentracije preparata inkubirane su sa punom krvlju zdravih donora, a preživljavanje leukocita, eritrocita i trombocita, kao i vrednosti hematokrita upoređivane su sa vrednostima dobijenim u kulturama pune krvi inkubiranim sa kontrolnim rastvorima. Rezultati su pokazali da ispitivani preparat, u širokom opsegu koncentracija, ne uzrokuje statistički značajne promene u broju ćelija periferne krvi u toku inkubacije od 1h i 4h, jer su nađene vrednosti leukocita (Tabela 1), eritrocita (Tabela 2), trombocita (Tabela 3) i hematokrita (Tabela 4) bile na nivou vrednosti dobijenih u kontrolnim eksperimentalnim grupama sa fiziološkim rastvorom, DMEM medijumom i/ili odgovarajućim razblaženjem rastvarača-apsolutnog alkohola. Preparat **GE132+Natural** u ispitivanim koncentracijama nije uzrokovao promene ni u diferencijalnom sastavu ćelija periferne krvi nakon inkubacija od 1h i 4h, a u poređenju sa vrednostima dobijenim nakon inkubacije ćelija sa kontrolnim rastvorima (Tabela 5 i Tabela 6).

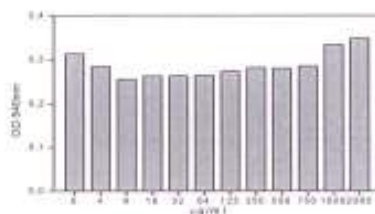
7A. Određivanje #1



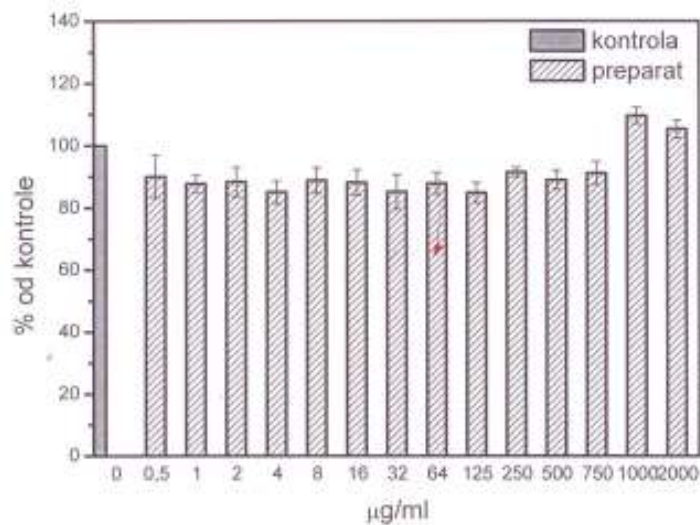
7B. Određivanje #2



7C. Određivanje #3



7D.



Slika 7. Anti-proliferativni/citotoksični efekat preparata **GE132+Natural** na DP-MSK ćelije. A.-C. Rezultati pojedinačnih eksperimenata, D. Sumirani rezultati – efekat na proliferaciju DP-MSK ćelije izražena kao procenat od kontrole -100%, rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za tri eksperimenta.

Tabela 1. Efekat *in vitro* inkubacije preparata GE132+Natural na leukocite periferne krvi

Grupe	LEUKO x 10 ⁹ /l		
	I exp.	II exp.	III exp.
<i>Inkubacija 1h</i>			
<i>Kontrole</i>			
FR	5,25	3,35	2,40
DMEM	3,50	3,85	2,30
Aps.alkohol 1:2,5	4,60	3,35	2,65
<i>Uzorci</i>			
4 µg/ml	-	4,10	1,50
8 µg/ml	-	5,00	1,70
16 µg/ml	-	4,25	1,80
32 µg/ml	-	3,85	1,75
64 µg/ml	-	4,15	2,75
125 µg/ml	-	3,55	1,85
250 µg/ml	3,25	4,10	2,85
500 µg/ml	3,65	3,8	2,65
1000 µg/ml	2,20	4,35	2,40
2000 µg/ml	2,30	4,20	2,75
<i>Inkubacija 4h</i>			
<i>Kontrole</i>			
FR	3,40	4,10	2,35
DMEM	2,45	4,00	2,05
Aps.alkohol 1:2,5	2,55	3,60	2,00
<i>Uzorci</i>			
4 µg/ml	-	3,40	2,0
8 µg/ml	-	4,30	2,1
16 µg/ml	-	3,45	1,95
32 µg/ml	-	3,45	2,35
64 µg/ml	-	3,45	2,40
125 µg/ml	-	3,15	2,05
250 µg/ml	1,35	3,60	1,85
500 µg/ml	-	3,55	2,60
1000 µg/ml	1,55	4,10	2,75
2000 µg/ml	1,30	3,60	2,65

Tabela 2. Efekat *in vitro* inkubacije preparata GE132+Natural na eritrocite periferne krvi

Grupe	ERITRO x 10 ¹² /l		
	I exp.		I exp.
<i>Inkubacija 1h</i>			
<i>Kontrole</i>			
FR	2,37	3,19	4,30
DMEM	2,64	3,52	4,46
Aps.alkohol 1:2,5	2,57	3,60	4,38
<i>Uzorci</i>			
4 µg/ml	-	3,23	4,08
8 µg/ml	-	3,18	3,60
16 µg/ml	-	3,10	4,12
32 µg/ml	-	2,85	3,77
64 µg/ml	-	2,81	3,88
125 µg/ml	-	3,02	4,40
250 µg/ml	2,74	2,87	3,87
500 µg/ml	3,66	3,13	4,56
1000 µg/ml	2,84	3,46	3,16
2000 µg/ml	2,93	3,27	3,82
<i>Inkubacija 4h</i>			
<i>Kontrole</i>			
FR	4,54	3,16	4,83
DMEM	2,25	3,27	5,17
Aps.alkohol 1:2,5	5,05	2,75	4,69
<i>Uzorci</i>			
4 µg/ml	-	2,65	4,50
8 µg/ml	-	2,67	4,20
16 µg/ml	-	3,10	4,20
32 µg/ml	-	2,69	4,53
64 µg/ml	-	3,13	3,52
125 µg/ml	-	2,68	3,41
250 µg/ml	2,10	2,93	4,05
500 µg/ml	-	2,75	3,53
1000 µg/ml	3,72	3,21	3,80
2000 µg/ml	2,62	2,80	3,77

Tabela 3. Efekat *in vitro* inkubacije preparata GE132+Natural na trombocite perifernu krvi

Grupe	TROMBO x 10 ⁹ /l		
	I exp.	II exp.	III exp.
<i>Inkubacija 1h</i>			
<i>Kontrole</i>			
FR	203	241	115
DMEM	185	285	102
Aps.alkohol 1:2,5	119	253	90
<i>Uzorci</i>			
4 µg/ml	-	118	83
8 µg/ml	-	290	128
16 µg/ml	-	228	79
32 µg/ml	-	165	92
64 µg/ml	-	187	120
125 µg/ml	-	216	101
250 µg/ml	124	270	135
500 µg/ml	111	249	124
1000 µg/ml	168	301	118
2000 µg/ml	128	194	102
<i>Inkubacija 4h</i>			
<i>Kontrole</i>			
FR	163	122	108
DMEM	168	134	132
Aps.alkohol 1:2,5	159	187	83
<i>Uzorci</i>			
4 µg/ml	-	187	122
8 µg/ml	-	178	89
16 µg/ml	-	193	92
32 µg/ml	-	229	97
64 µg/ml	-	168	123
125 µg/ml	-	149	85
250 µg/ml	-	184	130
500 µg/ml	-	231	101
1000 µg/ml	154	212	118
2000 µg/ml	209	211	97

Tabela 4. Efekat *in vitro* inkubacije preparata GE132+Natural na hematokrit

Grupe	Het %		
	I exp.	II exp.	III exp.
<i>Inkubacija 1h</i>			
<i>Kontrole</i>			
FR	29	26,5	28
DMEM	24,5	27	27,5
Aps.alkohol 1:2,5	25	27	28
<i>Uzorci</i>			
4 µg/ml	-	25,5	28
8 µg/ml	-	26,5	27
16 µg/ml	-	26	28
32 µg/ml	-	27	26
64 µg/ml	-	25	23
125 µg/ml	-	23	28
250 µg/ml	24	20	27
500 µg/ml	24	25	26
1000 µg/ml	27	23	25
2000 µg/ml	26	22	26
<i>Inkubacija 4h</i>			
<i>Kontrole</i>			
FR	24	27	30
DMEM	25	28	29
Aps.alkohol 1:2,5	23	27	29,5
<i>Uzorci</i>			
4 µg/ml	-	25	32
8 µg/ml	-	26,5	30,5
16 µg/ml	-	25	31
32 µg/ml	-	27	29
64 µg/ml	-	26	27
125 µg/ml	-	26,5	28
250 µg/ml	22	26	26
500 µg/ml	23	27,5	27
1000 µg/ml	22	26,5	26
2000 µg/ml	24,5	23	28

Tabela 5. Efekat *in vitro* inkubacije preparata GE132+Natural na diferencijalni sastav leukocita periferne krvi

Grupe	broj ćelija x 10 ⁹ /l krvi				
	Ukupan br. leukocita	Ukup. GRAN	MONO	LIMFO	Ostale ćelije
<i>Inkubacija 1h</i>					
<i>Kontrole</i>					
FR	2,66 ± 0,5	1,02 ± 0,2	0,11 ± 0,09	1,53 ± 0,07	0
<i>Uzorci</i>					
4 µg/ml	2,64 ± 1,3	1,14 ± 0,3	0,02 ± 0,02	1,46 ± 1,0	0,015 ± 0,01
2000 µg/ml	3,23 ± 0,7	1,65 ± 0,3	0,14 ± 0,03	1,42 ± 0,78	0,015 ± 0,01
<i>Inkubacija 4h</i>					
<i>Kontrole</i>					
FR	3,11 ± 0,9	1,23 ± 0,08	0,15 ± 0,05	1,69 ± 0,65	0,04 ± 0,02
<i>Uzorci</i>					
4 µg/ml	2,96 ± 0,3	1,43 ± 0,06	0,52 ± 0,48	1,01 ± 0,66	0
2000 µg/ml	3,02 ± 1,1	1,42 ± 0,005	0,06 ± 0,05	1,50 ± 0,4	0,04 ± 0,007

Tabela 5. Efekat *in vitro* inkubacije preparata GE132+Natural na diferencijalni sastav polimorfonuklearnih ćelija perifernе krvi

Grupe	broj ćelija x 10 ⁹ /l krvi				
	Ukupan br. granulocita	štapičasti	eozinofili	bazofili	granulociti
<i>Inkubacija 1h</i>					
<i>Kontrole</i>					
FR	1,02 ± 0,2	0,19 ± 0,05	0,01 ± 0,001	0	0,82 ± 0,2
<i>Uzorci</i>					
4 µg/ml	1,14 ± 0,3	0,19 ± 0,02	0,01 ± 0	0	0,94 ± 0,3
2000 µg/ml	1,65 ± 0,3	0,19 ± 0,1	0,007 ± 0,003	0	1,46 ± 0,2
<i>Inkubacija 4h</i>					
<i>Kontrole</i>					
FR	1,23 ± 0,08	0,19 ± 0,02	0,008 ± 0,002	0	1,035 ± 0,1
<i>Uzorci</i>					
4 µg/ml	1,43 ± 0,06	0,22 ± 0,06	0,007 ± 0	0	1,21 ± 0,01
2000 µg/ml	1,42 ± 0,005	0,27 ± 0,05	0,01 ± 0,002	0	1,14 ± 0,05

Literatura

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Dj P, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317, 2006

Nikolic N, Krstic A, Trivanovic D, Mojsilovic S, Kocic J, Santibanez JF, Jovicic G, Bugarski D. Mesenchymal stem cell properties of dental pulp cells from deciduous teeth. *Arch Biol Sci, Belgrade* 63 (4), 933-942, 2011

U Beogradu, 11.04.2012.

Odgovorni istraživač



Dr Diana Bugarski, naučni savetnik