Apoptotičko djelovanje određenih biološki aktivnih spojeva na TCCSUP staničnu liniju karcinoma mokračnog mjehura

Alerić, Anđelo

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:251531

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

APOPTOTIČKO DJELOVANJE ODREĐENIH BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA NA TCCSUP STANIČNU LINIJU KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

ZAVRŠNI RAD

Anđelo Alerić

Matični broj: 304

Split, 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

APOPTOTIČKO DJELOVANJE ODREĐENIH BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA NA TCCSUP STANIČNU LINIJU KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

ZAVRŠNI RAD

Anđelo Alerić

Matični broj: 304

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

APOPTOTIC EFFECT OF SELECTED BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS ON TCCSUP URINARY BLADDER CANCER CELL LINE

BACHELOR THESIS

Anđelo Alerić

Parent number: 304

Split, septemer 2019.

TEMELJNI DOKUMENTACIJSKA ISKAZNICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko – tehnološki fakultet
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Nastavni predmet: Biokemija
Tema rada: je prihvaćena na XIX. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Mila Radan

APOPTOTIČKO DJELOVANJE ODREĐENIH BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA NA TCCSUP STANIČNU LINIJU KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

Anđelo Alerić, 304

Sažetak

Cilj ovog završnog rada bio je ustanoviti apoptozu induciranjem pomoću određenih spojeva (timokinon, farnezol, nerolidol, tujopsen i fitol) na TCCSUP staničnu liniju humanog karcinoma mokraćnog mjehura pomoću protočne citometrije. Apoptoza ili programirana smrt stanice je jako važan fiziološki proces u očuvanju homeostaze. Istraživanja apoptoze su veoma popularna u opisivanju djelovaja mnogih biološki aktivnih spojeva. Danas postoje mnoge različite analitičke metode i tehnike kojima se koriste znanstvenici za praćenje svakog koraka apoptoze, to su na primjer protočna citometrija, fluorescentna mikroskopija i dr.

Rad se sastoji od eksperimentalnog dijela u kojem se TCCSUP korištena stanična linija tretirana s otopinama odabranih spojeva. Nadalje stanice su se bojale specifičnim fluorokromima. Primarno bojilo je antikoagulacijski Ca^{2+}-ovisan protein aneksin V konjugiran sa fluorescein izotiocijanatom. U ranoj apoptozi taj se konjugat, reverzibilno veže za fosfatidilserin, koji je translociran sa unutarnjeg sloja na vanjski sloj stanične membrane dajući zelenu fluorescenciju. U kasnoj apoptozi, stanična membrana postane propusna za sekundarno bojilo propidij-jodid koji se veže za DNA, dajući crvenu fluorescenciju. Korištenjem protočne citometrije određeno je koliko je stanica živo, u apoptotozi i/ili nekrotično.

Ključne riječi: apoptoza, TCCSUP, protočna citometrija, tumor mokraćnog mjehura, timokinon, farnezol, itd.

Rad sadrži: 56 stranica, 34 slika, 10 tablica, 17 grafova
Jezik izvornika: Hrvatski
Sastav povjerenstva obrane

1. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo
2. doc. dr. sc. Franko Burčul
3. doc. dr. sc. Mila Radan

Datum obrane: 26. rujna, 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate Chemistry

Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemistry
Course title: Biochemistry
Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XIX.

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan
Tehnical assistance: doc. dr. sc. Mila Radan

APOPTOTIC EFFECT OF SELECTED BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS ON TCCSUP URINARY BLADDER CANCER CELL LINE

Anđelo Alerić, 304

Abstract

The aim of this thesis was detection of apoptosis induced by selected biologically active compounds (thymoquinone, farnesol, nerolidol, thujopsene and phytol) on the bladder cancer (TCCSUP) cell line using flow cytometry. Apoptosis or programmed cell death is very important physiological procesin protection of homeostasis. Research of apoptosis, has been very popular in detailing and describing an effects of all kinds of different biologically active compounds. Today, there's many different analitical methods and techniques scientist can use for monitoring every step in programmed cell death (PCD), like for example, flow cytometry, flourescent microscopy etc.

The thesis is consistig of experimetal part in which TCCSUP cancer cell line is treated with solutions of the selected compounds. Afterwards cells were stained with specific fluorochromes. Primary staining agent is anticoagulation, Ca^{2+}-dependent protein annexin V conjugated wih fluorecsein isothiocyanate (FTIC). During early apoptosis this conjugate reversibly binds with phosphatidylserine, that is transloceted from inner sheet to outer sheat of cell membrane giving a green fluorescence. In late apoptosis cell membrane becomes permeable for secondary staining agent propidium iodide (PI) and it binds for DNA giving a red fluorescence. Then, flow cytometry was used to determine how much cells are viable, apoptotic and/or necrotic, in every sample.

Keywords: apoptosis, TCCSUP, flow cytometry, urinary bladder cancer, thymoquinone, farnesol etc.

Thesis contains: 56 pages, 10 tables, 34 pictures, 17 graphs
Original in: Croatian
Deffence committee

1. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo
2. doc. dr. sc. Franko Burčul
3. doc. dr. sc. Mila Radan

Defence date: September, 26. 2019.

Printed and electronic (pdf version) of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan, u periodu od ožujka, 2018. godine do lipnja, 2018. godine.

Iskreno se zahvaljujem svojoj menorici doc.dr. sc. Mili Radan na pruženoj šansi i vremenu kako bi izradio ovaj rad, te na strpljenju i pomoći pri izradi rada.

Također, od srca se zahvaljujem svojoj obitelji i svim prijateljima na pruženoj potpori prilikom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Pripremiti otopine reagensa: timokinona, farnezola, nerolidola, tujopsena, i fitola.
- Dodati pripremljene otopine reagensa na kulturu tumorskih stanica mokraćnog mjehura, TCCSUP stanična linija.
- Istražiti proapoptotska djelovanja prije spomenutih biološki aktivnih spojeva na TCCSUP staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura.

SAŽETAK

Cilj ovog završnog rada bio je ustanoviti apoptozu induciranjem pomoću određenih spojeva (timokinon, farnezol, nerolidol, tujopsen i fitol) na TCCSUP staničnu liniju humanog karcinoma mokraćnog mjehura pomoću protočne citometrije. Apoptoza ili programirana smrt stanice je jako važan fiziološki proces u očuvanju homeostaze. Istraživanja apoptoze su veoma popularna u opisivanju djelovaja mnogih biološki aktivnih spojeva. Danas postoje mnoge različite analitičke metode i tehnike kojima se koriste znanstvenici za praćenje svakog koraka apoptoze, to su na primjer protočna citometrija, fluorescentna mikroskopija i dr.

Rad se sastoji od eksperimentalnog dijela u kojem se TCCSUP korištena stanična linija tretirana s otopinama odabranih spojeva. Nadalje stanice su se bojale specifičnim fluorokromima. Primarno bojilo je antikoagulacijski Ca^{2+}-ovisan protein aneksin V konjugiran sa fluorescein izotiocijanatom. U ranoj apoptozi taj se konjugat, reverzibilno veže za fosfatidilserin, koji je translociran sa unutarnjeg sloja na vanjski sloj stanične membrane dajući zelenu fluorescenciju. U kasnoj apoptozi, stanična membrana postane propusna za sekundarno bojilo propidij-jodid koji se veže za DNA, dajući crvenu fluorescenciju. Korištenjem protočne citometrije određeno je koliko je stanica živo, u apoptotozi i/ili nekrotično.

Ključne riječi: apoptoza, TCCSUP, protočna citometrija, tumor mokraćnog mjehura, timokinon, farnezol, itd.

SUMMARY

The aim of this thesis was detection of apoptosis induced by selected biologically active compounds (thymoquinone, farnesol, nerolidol, thujopsene and phytol) on the bladder cancer (TCCSUP) cell line using flow cytometry. Apoptosis or programmed cell death is very important physiological procesin protection of homeostasis. Research of apoptosis, has been very popular in detailing and describing an effects of all kinds of different biologically active compounds. Today, there's many different analitical methods and techniques scientist can use for monitoring every step in programmed cell death (PCD), like for example, flow cytometry, flourescent microscopy etc.

The thesis is consistig of experimetal part in which TCCSUP cancer cell line is treated with solutions of the selected compounds. Afterwards cells were stained with specific fluorochromes. Primary staining agent is anticoagulation, Ca^{2+}-dependent protein annexin V conjugated wih fluorecsein isothiocyanate (FTIC). During early apoptosis this conjugate reversibly binds with phosphatidylserine, that is transloceted from inner sheet to outer sheat of cell membrane giving a green fluorescence. In late apoptosis cell membrane becomes permeable for secondary staining agent propidium iodide (PI) and it binds for DNA giving a red fluorescence. Then, flow cytometry was used to determine how much cells are viable, apoptotic and/or necrotic, in every sample.

Keywords: apoptosis, TCCSUP, flow cytometry, urinary bladder cancer, thymoquinone, farnesol etc.

SADRŽAJ

UVOD....1
1 OPĆI DIO....2
1.1 APOPTOZA....3
1.1.1 OPĆENITO O APOPTOZI....3
1.1.2 MEHANIZMI POKRETANJA APOPTOZE....4
1.1.3 VRSTE APOPTOZE....7
1.1.4 RAZLIKA APOPTOZE I NEKROZE....9
1.1.5 KRATKA POVIJEST ISTRAŽIVANJA APOPTOZE....11
1.2 PROTOČNA CITOMETRIJA....12
1.2.1 OPČENITO O CITOMETRIJI....12
1.2.2 MOGUČNOSTI, PRIMJENA I PREDNOSTI METODE....12
1.2.3 KRATKA POVIJEST PROTOČNE CITOMETRIJE....14
1.2.4 PROTOČNI CITOMETAR....14
1.3 OPĆENITO O TUMORU....18
1.3.1 STANIČNE LINIJE TUMORA....18
2 EKSPERIMENTALNI DIO....19
2.1 CILJ RADA....20
2.2 MATERIJALI I METODE....21
2.2.1 BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI – REAGENSI....21
2.2.2 SPECIFIČNA FLUORESCENTNA BOJILA STANICA....27
2.2.3 OPĆENITO O ANEKSIN V-FITC TESTU....30
2.2.4 STANIČNA LINIJA TCCSUP....33
2.3 PRIPREMA OTOPINA REAGENSA....35
2.3.1 OPIS PRIPREME OTOPINA....35
2.4 POSTUPAK....37
2.4.1 PROTOKOL ZA ANEKSIN V - FITC TEST....37
3 REZULTATI....39
4 RASPRAVA....46
5 ZAKLJUČAK....48
6 LITERATURA....50

UVOD

Ispitivanja apoptotičkh učinaka biološki aktivnih spojeva izabranih u ovom radu (timokinon, farnezol, fitol, nerolidol, tujopsen), prate se na TCCSUP staničnoj liniji karcinoma mokraćnog mjehura, protočnom citometrijom uz pomoć aneksin V-FITC testa. U tom testu koristi se antikoagulacijski protein ovisan o Ca^{2+}, aneksin V, konjugiran specifičnim fluorokromom FITC-om odnosno fluorescein izotiocijanatom. Takav konjugat u prisustvu kalcijevih kationa veže se reverzibilno visokim afinitetom za fosfatidilserin na površini stanične membrane u ranom stadiju apoptoze. Kao sekundarno specifično stanično bojilo koristi se propidij-jodid (PI) koji se veže interkalacijom za nukleinske kiseline i kromatin u jezgri u kasnoj apoptozi, kada je omogućen njegov prijenos kroz staničnu membranu. Takvim vezivanjima, uz pomoć protočne citometrije, može se odrediti stadij i broj stanica u apoptozi, jer FITC fluorescira zelenom bojom na površini membrane, a propidij-jodid crvenom bojom unutar same stanice. Analizom protočnom citometrijom dobiju se rezultati u postotcima kao omjeri živih stanica, mrtih (nekrotičnih) stanica, te stanica u kasnoj i ranoj apoptozi, za svaki uzorak tretiran jednim od odabranih spojeva. Uz sve rezultate dobiju se i točkasti grafovi koji pokazuju iste omjere.

1 OPĆI DIO

1.1 APOPTOZA

1.1.1 OPĆENITO O APOPTOZI

Riječ "apoptoza" dolazi od grčke riječi "απόπτωσις", što u prijevodu znaći „stabla na kojima ispada lišće u jesen“. Apoptoza tj. programirana stanična smrt (engl. *programmed cell death; PCD*) je specifično reguliran oblik stanične smrti. Apoptoza je važna za razvoj organizma te održavanje homeostaze u stanici odnosno ravnoteže između gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom života (1, 2, 3).

Mnogi aktivatori programirane smrti stanice, preko različitih posrednika, dovode do pokretanja kaskade proteolitičkih enzima kaspaza (*citoplazmatske „cisteinil-aspartatno-specifične endoproteaze“*) koje degradiraju važne strukturne komponente stanice uključujući genetski materijal. Kaspaze su proteaze, tj. enzimi koji djeluju na proteine, bogate aminokiselinom cisteinom (Cys) koje na aspartatskim ostacima (Asp) kidaju svoj proteinski supstrat procesom hidrolize. Ti se enzimi nalaze u citoplazmi stanice u neaktivnom obliku kao proenzimi (zimogeni), a aktivacija se odvija kaskadno proteolitičkim cijepanjem. Redoslijed njihove aktivacije ovisi o načinu pokretanja apoptoze. Kaspaze svoju potpunu proteolitičku aktivnost postižu kad su u obliku tetramera koji nastaju nakon dvostrukog cijepanja (4).

Poznato je oko četrnaest članova porodice kaspaza koje se označavaju brojevima 1-14, pri čemu razlikujemo pro-kaspaze 2, 8, 9 i 10 tj. inicijatorske i pro-kaspaze 3,6, i 7 tj. efektorne kaspaze (5). Stanice također sadržavaju prirodne proteinske inhibitore kaspaza zvane iAPs (engl. *Inhibitor of Apoptosis; inhibitori apoptoze*), te oni mogu direktno inhibirati kaspaze 8 i 9 (inicijatorske) i kaspaze 3 i 7 (efektorne) (6).

Ključni proteini u procesu apoptoze su: Bcl-2, Smac/Diablo, iAPs, kaspaza-3, kaspaza-4, kaspaza-8, kaspaza-9, TNF, Fas i brojni drugi koji nizom signalnih puteva aktiviraju nizvodne putove koji će procesom apoptoze dovesti do stanične smrti (3).

1.1.2 MEHANIZMI POKRETANJA APOPTOZE

1.1.2.1 VANJSKI MEHANIZAM

TNF (engl. "*tumor necrosis factor"; tumorski nekrotični čimbenik*) porodica receptora (Fas, TNFR) je skupina proteina u staničnoj membrani koji se protežu od vanjske do unutrašnje površine membrane. Citoplazmatski dijelovi receptora se nazivaju domene smrti DD (engl. "*Death Domain*"). Kad se FasL (CD95L) veže na Fas receptor dolazi do receptorske trimerizacije. To rezultira unutarstaničnim grozdolikim nakupljanjem DD dijelova receptora pomoću kompleksa proteina poznatih kao DISC (engl. "*Death-Inducing-Signaling Complex"; signalizirajući kompleks koji inducira smrt*). Trimerizacija se događa pomoću adapterskih molekula FADD (engl. "*Fas-Associated-Death-Domain Protein"; Fas vezujuće domene smrti*), koje imaju dva receptorska dijela odnosno domene (7). Jedna domena je također naziva DD i veže se na DD-domenu Fas-receptora, a druga se domena naziva DED (engl. "*Death-Effector-Domain"*) i prenosi signal transdukcije vezanjem za zimogen, prokaspazu 8. Tim vezivanjem dolazi do njezina proteolitičkog cijepanja, te prelazi u aktivni oblik koji pokreče kaskadu kaspaza pa tako i process programirane smrti stanice odnosno apoptoze (8, 9).

Kada se TNF-ligand veže za TNFR1-receptor pokreće se sličan put, ali su u tom slučaju adapterske molekule su takozvane TRADD (engl. "*TNFR-Associated Death Domain"; TNFR-vezujuće domene smrti*) koje imaju sposobnost vezanja raznih proteina na aktiviranom dijelu receptora. Kad se takav aktivirani dio veže na FADD, također dolazi do aktivacije prokaspaze 8, time i kaskade kaspaza.

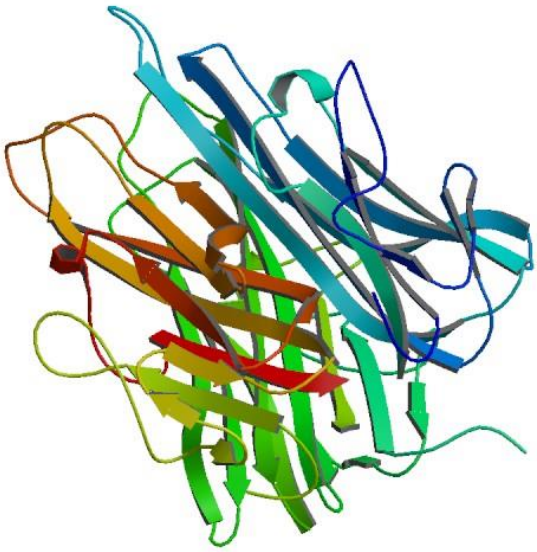
TRAIL (engl. *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand; ligand povezan s TNF-om koji inducira apoptozu*) je pokretač smrti koji se veže na DR4 i DR5-receptore, a isti također imaju unutarstanične domene smrti, ali su njihove adapterske molekule slabo poznate. Postoje inhibitori apoptoze na razini receptora smrti u koje ubrajamo FLIP (engl. "*FasL Inhibitor Protein"; FasL inhibirajući protein*) skupinu proteina u kojoj se razlikuju dva člana, v-FLIP i c-FLIP. Ta skupina proteina inhibira apoptozu pokrenutu aktivacijom Fas i TNFR1-receptora. FLIP se kao homolog kaspaze 8, vezuje sa Fas-FADD-komplekom, a time se inhibira aktivacija prokaspaze 8 (10, 2).

1.1.2.2 UNUTRAŠNJI MEHANIZAM

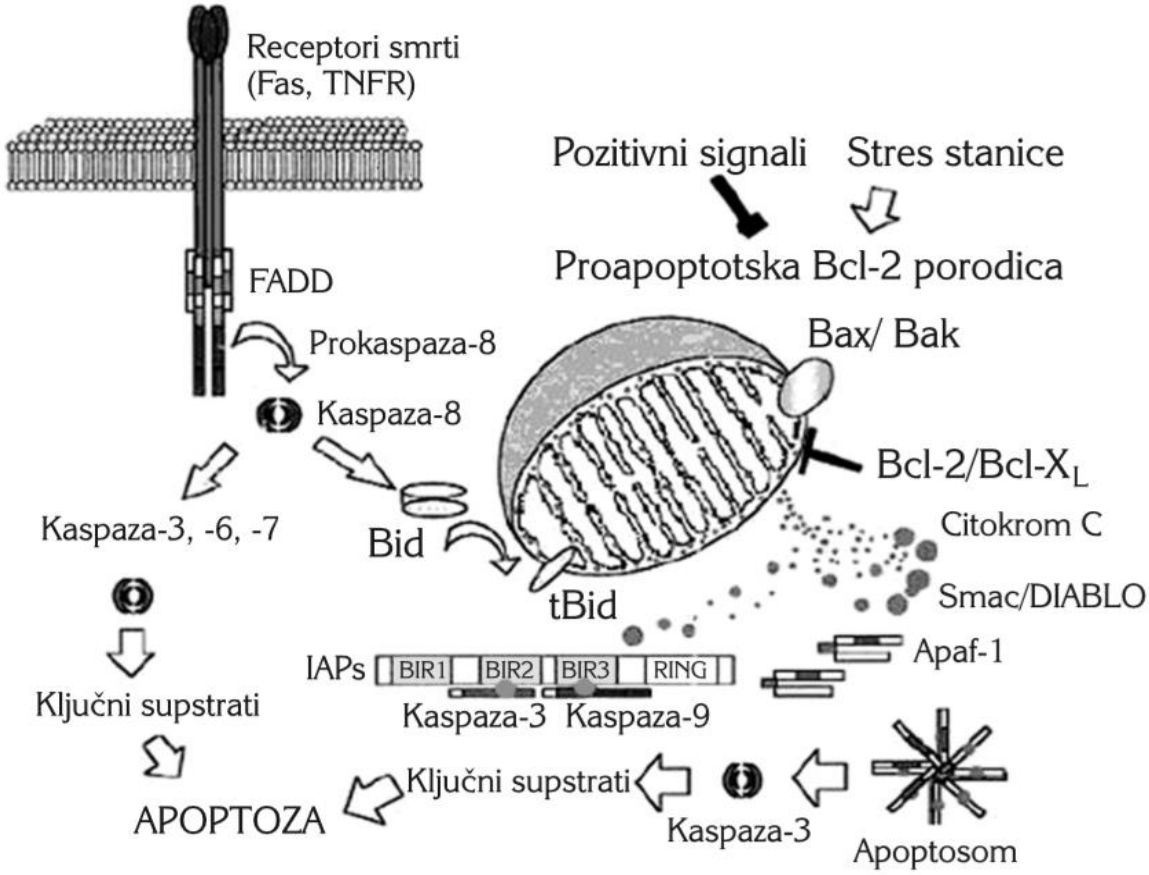
Oštećenje DNA može biti uzrok pokretanja smrti stanice a tada je ključan protein p53, koji je u normalnim stanicama prisutan u neaktivnom obliku. Gen (P53) koji regulira njegovu sintezu nalazi se na sedamnaestom kromosomu. Isti sudjeluje u procesima replikacije i transkripcije DNA. Također ima sposobnost da prekine rast stanice, što je njegova tumor-supresijska funkcija (11, 12). Protein p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondrijskih proteina Bcl-2 porodice, ili da inducira gene koji povećavaju produkciju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), koji su jaki aktivatori oštećenja mitohondrija, time i apoptoze.

Bcl-2 poodica ima oko petnaest poznatih proteina koji se dijele na proapoptotske (Bad, Bax, Bak, Bcl-xl, Bag, Bid, Bik, Hrk) i antiapoptotske (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Brag1, A1) (13). Proapoptotski proteini prisutni su u citoplazmi kao senzori oštećenja stanice ili stresa, a antiapoptotski proteini nalaze se u među-membranskom prostoru mitohondrija. Članovi Bcl-2 porodice reguliraju količinu i tip ionskih kanala u unutarnjoj membrani mitohondrija, zatim Bad i Bax interakcijom s antiapoptotskim proteinima stvaraju veći ionski kanali kroz koje prolaze citokrom c i druge proapoptotske molekule.

Otpušteni citokrom c veže se uz Apaf-1 (Apoptotički proteaze sktivirajući ćimbenik 1) posredničke molekule koje aktiviraju kaspaze 9, a potom kreće kaskada drugih kaspaza (4, 14). Proteinski kompleks s jedinicama citokroma c, Apaf1 i ATP-a (adenozin trifosfata) je apoptosom (15). Osim citokroma c, mitohondriji sadržavaju i druge apoptotske faktore kao što su AIF (engl. "*Apoptosis-Inducing-Factor"; čimbenik induciranja apoptoze*) i endonukleaza G. Endonukleaza G tijekom apoptoze izlazi iz mitohondrija, te djelomično je odgovorna za cijepanje DNA neovisno o kaspazama (16, 17). Vanjska membrana mitohondrija, u ranoj fazi apoptoze, propusna je za proteine, to rezultira otpuštanjem topljivih među-membranskih mitohondrijskih proteina, dok na unutrašnjoj membrani slabi transmembranski potencijal ($\Delta\Psi m$), čime možemo određivati kao indikator rane apoptotske promjene, in vivo (18). Bcl-2 ima manji utjecaj na interakcije receptor-ligand. Tako npr. smrtonosni signali Fas receptora mogu zaobići kontrolu Bcl-2 porodice. Bax ima mjesta za vezanje proteina p53 tako da je njegova funkcija i regulirana ovisno o oštećenju DNA i porastu p53 u citoplazmi stanice. (2)



Slika 1. Kristalna struktura TNFR1 (eng. Tumor necrosis factor receptor 1).



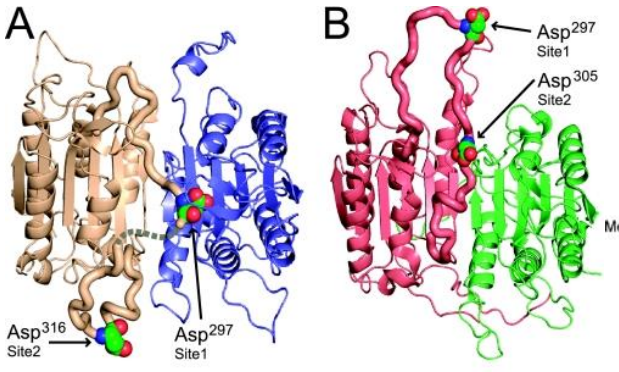
Slika 2. Signalni put apoptoze

1.1.3 VRSTE APOPTOZE

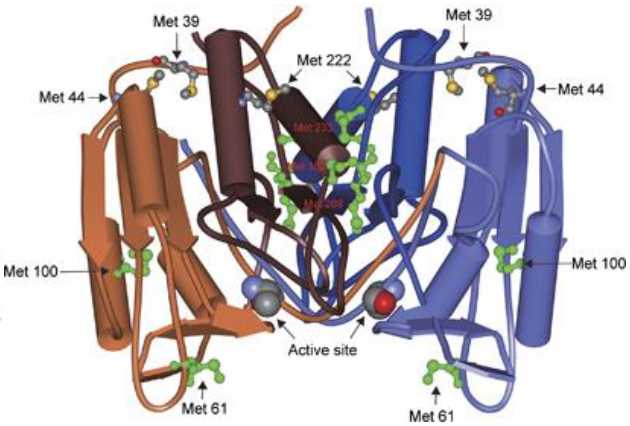
1. APOPTOZA OVISNA O KASPAZAMA

Ova vrsta apoptoze (Slika 4.) specifično je regulirana aktivnošću kaspaza kao što su CASP-3, CASP-4, CASP-7, CASP-8, CASP-9 i CASP-12 (7). Kalcijevi kanali sudjeluju u apoptozi zbog depolarizacije unutrašnje membrane, tako da dolazi do izlaska citokroma c iz mitohondrija koji se veže s Apaf1 što aktivira kaspazu 9. Potom aktivna kaspaza 9 aktivira nizvodne kaspaze koje vode proces do stanične smrti.

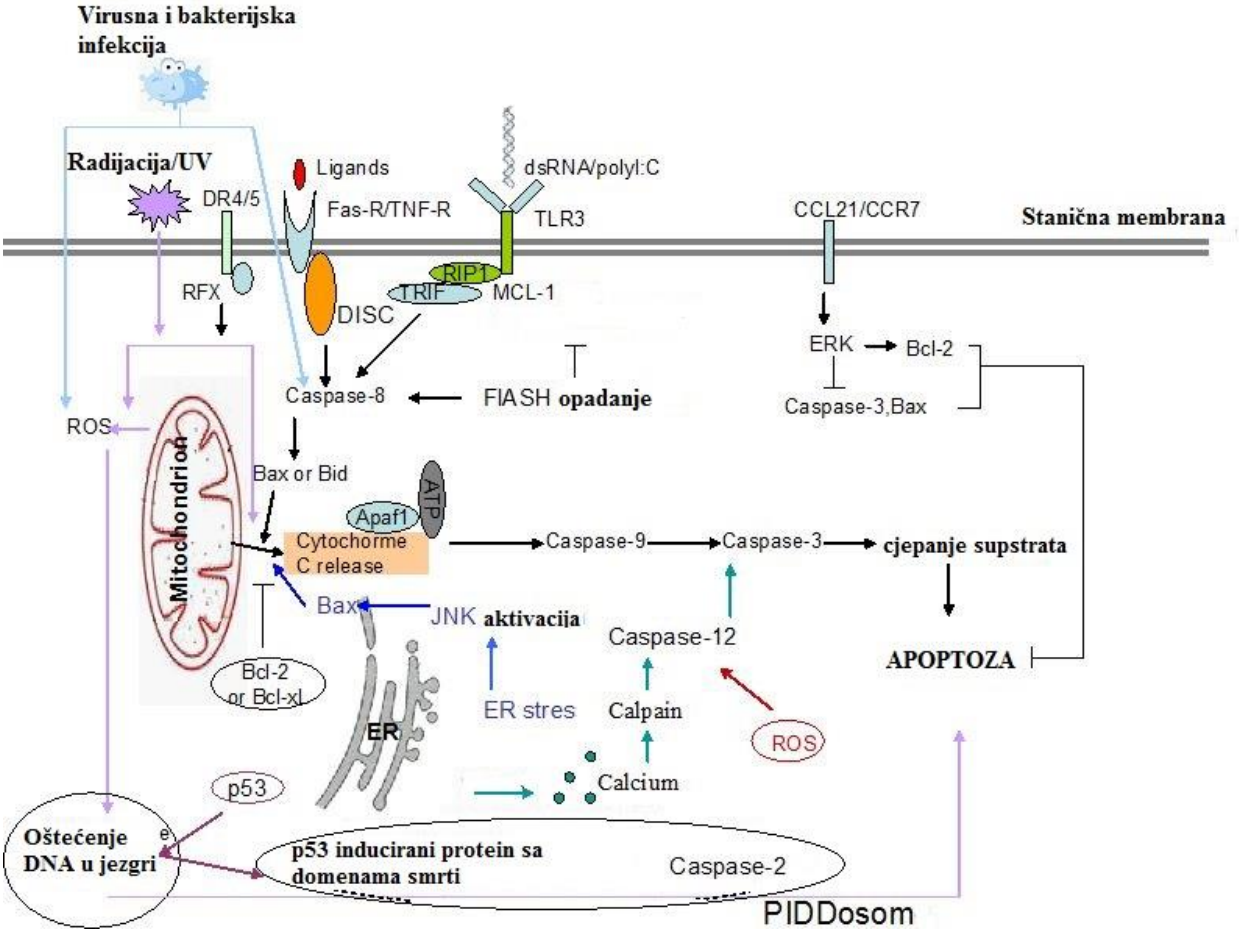
Neke proteinske jedinke kao TNF ili Smac/Diablo prenose poruke za programiranu staničnu smrt t. apoptozu (19). Kaskadni putevi aktivacije kaspaza mogu se aktivirati i vanjskim čimbenicima npr. X zračenjem, virusi (*Herpes virus* koji aktivira CASP-8), bakterije (*Mycobacterium tuberculosis* koja aktivira CASP-12), slobodni radikali (aktiviraju CASP-12) i brojnim drugim (20). Apoptoza je kontrolirana inhibitorima apoptoze (iAP) i proteinskim kompleksima Bcl-2 porodice. Kompleksi Bcl-2 imaju dvojnu ulogu: može kočiti ili poticati apoptozu (3).



Slika 3. A) kristalna struktura prokaspaze 1, B) kristalna struktura proakspaze 7



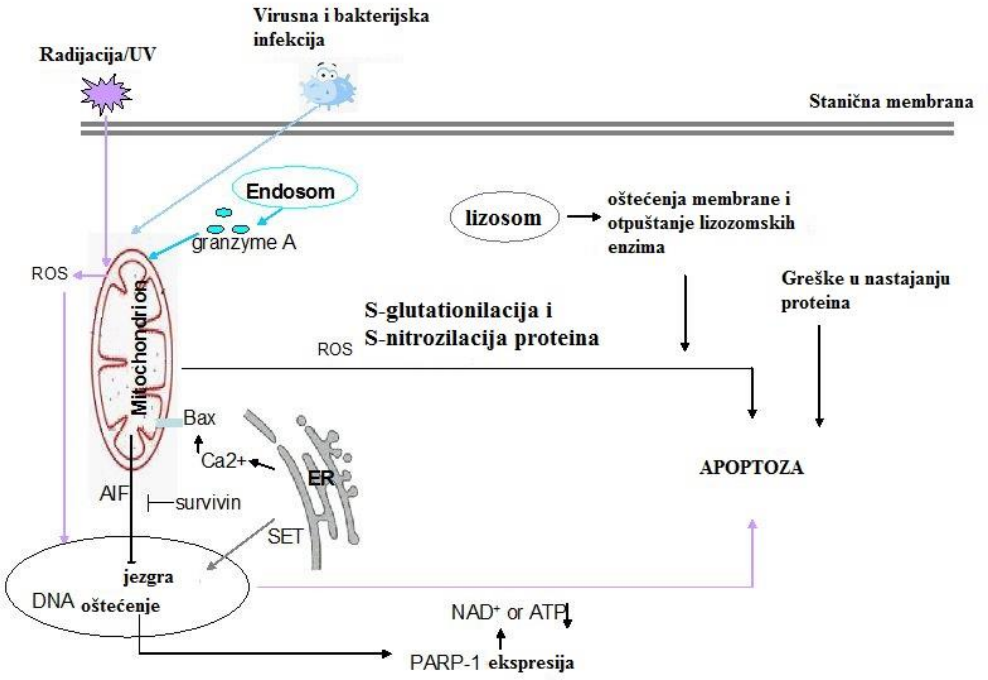
Slika 4. Kristalna struktura kaspaze 3



Slika 5. Apoptoza ovisna o kaspazama.

2. APOPTOZA NEOVISNA O KASPAZAMA

Promjene potencijala na membrani mitohondrija rezultiraju apoptozom neovisnoj o kaspazama (Slika 5.), a posljedica je povećanja proizvodnje slobodnih radikala tj. reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *"Reactive oxygen species"*; ROS) (3). Faktor indukcije apoptoze (eng. "*apoptosis inducing factor"*; AIF) je flavoprotein s važnom ulogom u fragmentaciji stanice neovisne o kaspazama. Pronađeni su neki spojevi koji mogu inducirati AIF: simvastatin, staurosporin, kadmij i drugi. Takvi spojevi pokreću apoptozu neovisnu o kaspazama. Osim AIF, ROS također sudjeluju u ovakvom načinu smrti stanice. ROS mogu aktivirati PARP-1 (*"poli-(ADP-riboza) polimeraza 1")* koji omogućava izlazak AIF iz stanice (21). Reducirani glutation (GSH) i dušikov monoksid (NO) mogu blokirati neke tiolne skupine. Zbog svoje citotoksičnosti velike količine NO pokreću apoptozu. Proučavanje mehanizma apoptoze neovisne o kaspazama ostavilo brojna neriješena pitanja, a to omogućuje budućim generacijama znanstvenika daljnja istraživanja u traženju konačnog mehanizma. (1)



Slika 6. Apoptoza neovisna o kaspazama

Ustanovljeno je da neki hormoni reguliraju apoptozu (npr. leptin, hormon adipocita, koji regulira cijepanje CASP-3 i Bcl-2). Kad je razina hormona normalna, ne dolazi do apoptoze, međutim, ako je razina hormona smanjena, pokreće se proces apoptoze.

Vitamin E djeluje na staničnu održivost blokirajući CASP-3 (12). Učinak ljubičastog slatkog krumpira *Ipomea batatas* kod mišjih timocita je smanjenje količine ROS-a.

Likopen (rodopurpurin) je antioksidant i može spriječiti apoptozu kod epitelnih stanica želudca zaraženih s *Helicobacter pylori*.

Biljni aktivni sastojci kao što je fizetin mogu pokrenuti apoptozu. Fizetin je flavonoid koji aktivira CASP-8/CASP-3 apoptozni put.

Vongonin, je flavonoid koji također ima sposobnost aktivacije apoptoze nekih stanica raka povećavajući razinu PARP-a i aktivnost prokaspaze 3. (1)

1.1.4 RAZLIKA APOPTOZE I NEKROZE

Nekroza ili slučajna smrt stanice, dolazi od grčke riječi ″νέκρωσις″ što u prijevodu znači "smrt", "proces umiranja" ili "čin ubojstva". Nekroza je oblik smrti stanice nastale ozljedom što rezultira preuranjenom smrti stanice, procesom autolize. Dakle, dogodi se nepovratna ozljeda stanice zbog susreta sa škodljivim stimulansima koja vodi do stanične smrti. Takvi stimulansi najčešće uključuju infekcije (virusi, bakterije, gljivice), manjak kisika (hipoksija) te ekstremne vanjske uvjete kao sto su veća topline, radijacija, UV zračenje itd. Nekrotičnu stanicu obilježavaju puknuće stanične membrane, bubrenje staničnih organela, i nagli pad razine ATP-a unutar stanice. (22)

Apoptotska stanica pokazuje različite morfološke karakteristike i biokemijska svojstva, što može varirati ovisno o podražaju i vrsti stanice. Velika većina klasičnih obilježja apoptoze može se brzo izmjeriti protočnom i slikovnom citometrijom. (23)

1.1.4.1 BIOKEMIJSKA, MOLEKULARNA I MORFOLOŠKA OBILJEŽJA APOPTOZE

Tablica 1. 1. Biokemijska i molekularna obilježja:

PROGRAMIRANA SMRT STANICE (APOPTOZA)	SLUČAJNA SMRT STANICE (NEKROZA)
➢ Očuvanje razina ATP-a ➢ Gubitak potencijala na mitohondrijskoj membrani ➢ Oksidativni stres ➢ Peroksidacija kardiolipina ➢ Oslobađanje citokroma C iz mitohondrija ➢ Oslobađanje AIF, EndoG, Smac/Diablo i HtrA2 iz mitohondrija ➢ Mobilizacija unutarstaničnih Ca^{2+} iona ➢ Aktivacija kaspaza ➢ Aktivacija serin proteaza ➢ Aktivacija endonukleaza ➢ PARP cijepanje ➢ Fragmentacija DNA ➢ Gubitak stabilnosti dvostruke uzvojnice DNA (osjetljivost na denaturaciju) ➢ Unutar-jezgrina degradacija DNA ➢ Odvijeno pakiranje DNA i RNA u apoptotička tijela ➢ Uglavnom sačuvani integritet stanične membrane ➢ Prebacivanje fosfatidilserina na vanjski sloj stanične membrane ➢ Aktivacija transglutaminaza	➢ Prestanak funkcije mitohondrija ➢ Brzo opadanje razine unutarstaničnog ATP-a ➢ Neaktiviraju se kaspaze ➢ Nasumična degradacija DNA ➢ Brz gubitak integriteta stanične membrane ➢ Nekontrolirano ispuštanje sastavnica citoplazme

Tablica 1. 2. Morfološka obilježja stanica u procesima:

PROGRAMIRANA SMRT STANICE (APOPTOZA)	SLUČAJNA SMRT STANICE (NEKROZA)
➢ Dehidratacija i skupljanje stanice ➢ Odvajanje od površine ➢ Bubrenje stanične membrane ➢ Kondenzacija kromatina ➢ Fragmentacija jezgre ➢ Sačuvana struktura mitohondrija ➢ Rastavljanje Golgijeva aparata ➢ Nastajanje i otpuštanje apoptotičnih tijela ➢ Okruživanje i eliminacija fagocitima/susjednim stanicama	➢ Bubrenje stanice ➢ Bubrenje mitohondrija i jezgre ➢ Vakuolizacija citoplazme ➢ Puknuće stanične membrane ➢ Raspuštanje kromatina ➢ Raspuštanje dijelova stanice ➢ Stvaranje ožiljka

1.1.5 KRATKA POVIJEST ISTRAŽIVANJA APOPTOZE

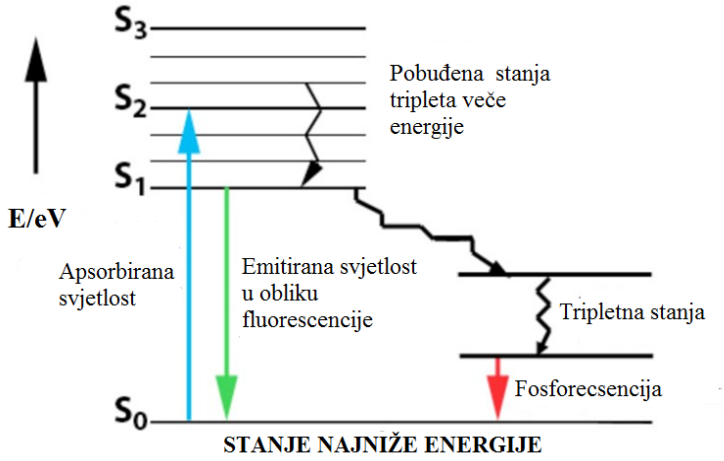
Njemački znanstvenik Karl Vogt je prvi koji je opisao temeljni princip apoptoze još 1842. godine. Već 1885. godine Walther Flemming je prezentirao još precizniji opis procesa programirane smrti stanice, iako tek osamdeset godina poslije točnije 1965. Godine tema se ponovno istraživala. Dok je proučavao tkiva koristeći se elektronskim mikroskopom, John Foxton Ross Kerr (engl. *University of Queensland*) uočio je razliku između apoptoze i traumatične smrti stanice. Nakon publikacije rada u kojem opisuje fenomenom udružio se s A. R. Currie i A. Wyllie (engl. *University of Aberdeen*), te su 1972. godine objavili članak u British Journal of Cancer. Kerr je prvotno proces zvao programirana stanična nekroza, ali u članku se po prvi put pojavljuje termin „apoptoza“. Ideja za naziv apoptoza potječe od profesora Grčkog jezika James Cormack-a (engl. *University of Aberdeen; sveučilište u Abardeenu*). J. F. R. Kerr je na 14. Ožujak, 2000.godine dobio Paul Ehrlich Ludwig Darmstaedter nagradu za svoj rad, a nagradu je dijelio s Bostonskim biologom H. R. Horvitzom.

2002. godine Nobelova nagrada za medicine dodijeljena je trojici znanstvenika Sydney Brenner, Horvitz and John E. Sulston za njihov rad u identifikaciji gena koji kontroliraju apoptozu. Ti geni identificirani su u oblića *Caenorhabditis elegans* a homologni su ljudskima. (24)

1.2 PROTOČNA CITOMETRIJA

1.2.1 OPČENITO O CITOMETRIJI

Kvantitativna i visoko informativna metoda bazirana na mjerenju fluorescencije koja služi za određivanje apoptoze na razini pojedinačnih stanica, te je dovoljan relativno mali broj stanica u ispitivanom uzorku. Razne morfološke i biokemijske promjene za vrijeme apoptoze u stanici mogu se iskoristiti za citometrijsko praćenje, počevši od plazmolize stanice, aktivacije kaspaza, gubitka mitohondrijskoga membranskog potencijala, aktivacije endonukleaza, pa sve do potpunog gubitka integriteta stanice i nastajanja apoptotskih tijela (25).



Slika 7. Prikaz energijskih stanja elektrona i fluorescencije

1.2.2 MOGUČNOSTI, PRIMJENA I PREDNOSTI METODE

Ova metoda može mjeriti različite grupe materijala, a pri tome je jedini zahtjev da analizirani materijal bude čestica ili topljive molekule. Sve komponente i funkcije unutar stanice mogu se izmjeriti ukoliko postoje fluorescentne sonde koje otkrivaju navedenu komponentu ili funkciju.

Analiza ovom metodom može se vršiti na različitim tipovima stanica – bakterije, kvasac, stanice sisavaca, te biljne stanice. Mjeriti se mogu podvrste i strukture, npr. kromosomi, funkcije stanica (npr. unutarnji pH stanica [H^+], [Na^+], [Zn^+], DNA sadržaj).

Glavni fluorescentni proteini (npr. zeleni fluorescentni protein, GFP) omogućavaju lako ispitivanje ekspresije gena. Da se topljive molekule mogu izmjeriti tj analizirati, iste moraju biti uhvaćene na određenoj površini i zatim izložene djelovanju fluorescentnih sondi (npr. monoklonska protutijela).

Pregled primjene:

- Brojanje stanica
- Sortiranje stanica
- Bojanje specifičnim fluorescentnim protutijelima:
  - Bojanje površine i/ili unutarstanično bojanje
- Praćenje genske ekspresije
  - Fluorescentni protein (npr. GFP, YFP itd.)
- Odnos života stanice I proliferacije prema staničnoj smrti
- Funkcionalni testovi npr. Praćenje protoka Ca^{2+}
- Detekcije; mikrobiologija, virologija itd.

Glavne prednosti:

- multiparametarsko mjerenje (korelacija različitih staničnih "događaja" u trenutku)
- analiza jedne stanice (izbjegavanje analize nakupina)
- brzo vrijeme analize (tisuću stanica u sekundi)

Prednost citometije je ta što postoji mogućnost kombiniranja rezultata dobivenih pomoću prednjeg i bočnoga svjetlosnog snopa (zbog promjene promjera apoptotskih stanica i konformacije unutrašnjih staničnih struktura) s rezultatima analize staničnih markera, odnosno specifičnih fluorescentnih protututijela za apoptotske molekule kao što su Fas, FasL, Bcl-2, p53, fosfatidilserin itd. (26). Također se izbjegavaju problemi osjetljivosti uobičajenih metoda poput fluorimetrije, spektrofotometrije ili analiza na gelu (25).

1.2.3 KRATKA POVIJEST PROTOČNE CITOMETRIJE

Protočna citometrija mjerenje je stanica, tj. promjenama stanica za vrijeme njihovog prolaska kroz sustav detekcije. Ta je metoda svoj razvoj počela kasnih 40-tih i ranih 50–tih, prošloga stoljeća. W. Coulter je osmislio Coulter–ov brojač, taj je uređaj mjerio volumen stanica zamjenom elektrolita.

Nove mogućnosti detekcije - mjerenje veličine i granularnosti raspršivanjem svjetla te mjerenje fluorescentnosti. Svi ovakvi instrumenti koristili su svjetlo i optiku kao sustav detekcije.

Za pojam Razvrstavanje Stanica Fluorescentnom Aktivacijom-FACS zaslužan je Len Herzenberg. FACS je korišten kao zaštitni znak jednoga od proizvođača (B-D), te ova vrsta instrumenata tj. uređaja nazivaju se protočni citometri.

Razvoji koji su potpomogli i proširili korištenje protočnih citometara bili su otkrića širokog spektra različitih fluorescentnih sondi, te važni razvoj monoklonskih antitijela, na kojima j prvi radio Cesar Milstein (25)

1.2.4 PROTOČNI CITOMETAR

Uređaj koji radi na principu analitičke metode protočne citometrije naziva se protočni citometar (25).

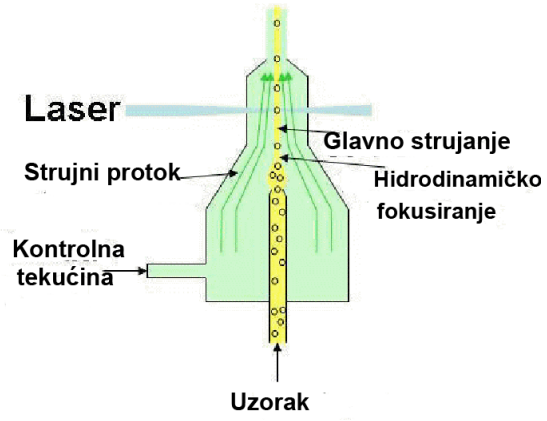
DIJELOVI PROTOČNOG CITOMETRA SU:

- Fluidizacijski sustav potočnog citometra (hidroautomatika)
- Sofisticirani optički sustav protočnog citometra
- Sustav elektronike protočnog citometra
- Računalni sustav za iščitavanje i prikaz rezultata

PRINCIP RADA DIJELOVA PROTOČNOG CITOMETRA

1. Fluidizacijski sustav potočnog citometra (hidroautomatika):

Stanice suspendirane u uzorku, injektiranjem se unose u uređaj i precizno se pozicioniraju strujanjem kontaktne tekućine na način da se suspenzija uzorka nosi centrom takve kontakne tekućine tj. fluida. To gibanje uzorka nazivamo glavnim strujanjem (bujicom uzorka),. Svaka pojedinačna stanica tako dolazi do lasera za ispitivanje. Takav način fokusiranja struje uzorka potpomognute strujanjem nekog drugog fluida, naziva se hidrodinamičko fokusiranje (25).

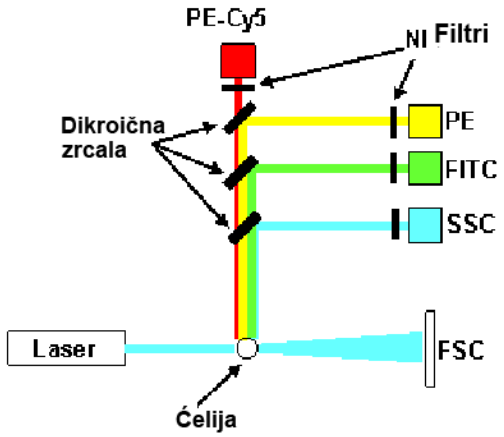


Slika 8. Prikaz rada fluidizacijskog sustava protočnog citometra.

2. Sofisticirani optički sustav protočnog citometra

Rutinski se mjeri svijetlo raspršeno na dva različita kuta (naprijed i bočno). Raspršivanje svijetlosti u smjeru prema naprijed mjeri se u smjeru pomicanja laserske zrake. Prednje raspršivanje je tipično i obično se ravna prema veličini. Bočni signali raspršivanja mjere granuliranost ili unutrašnju strukturu stanice.

Da se izolira boja za pojedinačnu sondu koriste se različiti filtri smješteni ispred svakog pojedinačnog detektora. Određena boja svjetlosti izdvaja se iz dolazećeg spektra i usmjerava se prema detektorima koristeći različite filtre koji su dizajnirani za rad pod drugim kutovima – dikroična zrcala (25).



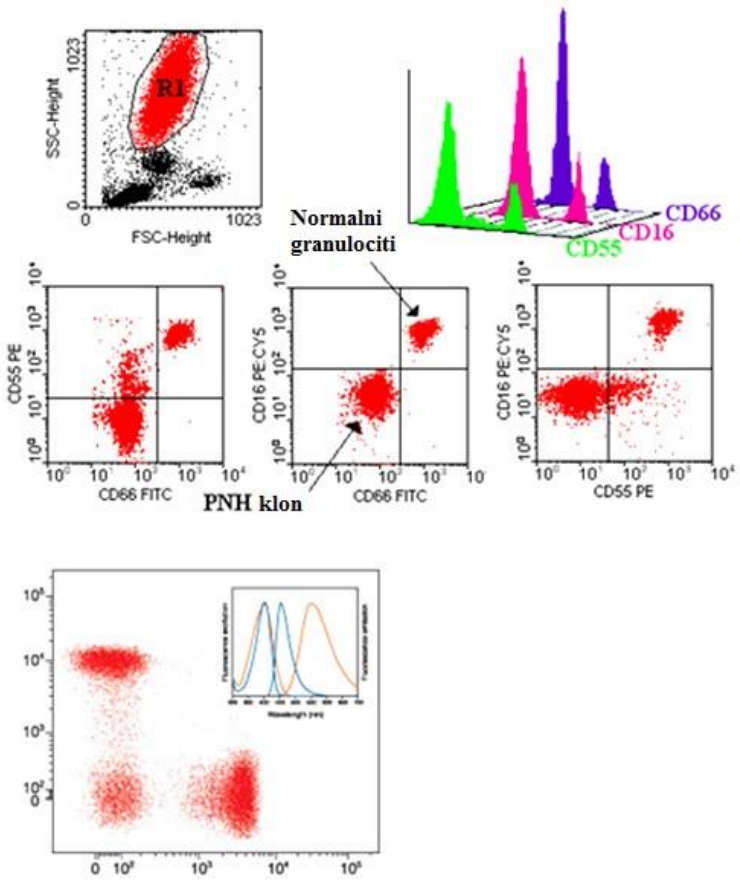
Slika 9. Prikaz rada optičkog sustava protočnog citometra

3. Sustav elektronike protočnog citometra

Ovaj sustav pretvara detektirane svjetlosne informacije u analognu električnu informaciju, potom se takva analogna informacija konvertira u digitalnu informaciju, koji se kao takva može obraditi odgovarajućim računalnim programom (25).

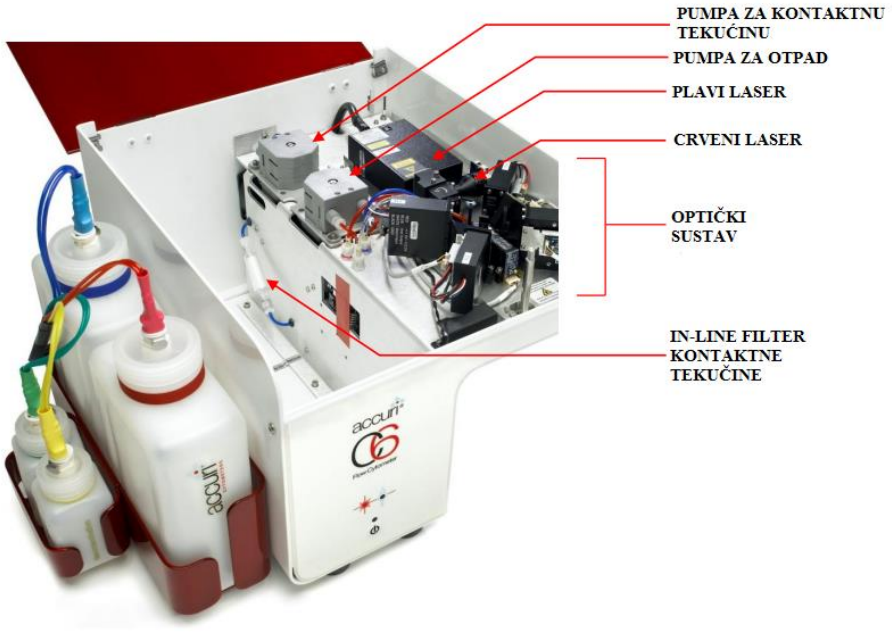
4. Računalni sustav za iščitavanje i prikaz rezultata

Digitalne vrijednosti tj. informacije primaju se i obrađuju putem računala, a program ove podatke prevodi u rezultate kao što su slike tj. grafove (npr. histogrami) koje možemo vizualno razumjeti te iz njih iščitati rezultate. Struktura datoteka podataka dozvoljava ne samo pohranjivanje čistih neobrađenih podataka iz detektora već i ostalih podataka o uzorku te o načinu na koji je uzorak prikupljen (npr. voltaža višestruke foto cijevi i postavke kompenzacije). Svi neobrađeni podaci kao odvojene informacije za svaki detektor za svaku stanicu, postoje u FCS datoteci. To omogućava korisnicima kombinaciju i spajanje različitih podataka u svrhu logičke analize (25).



Slika 10.

Primjeri rezultata dobivenih analizom protočnom citometrijom



Slika 11. Unutarnje komponente protočnog citometra (BD Accuri C6, BD Biosciences)

1.3 OPĆENITO O TUMORU

Tumor označava skup promijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast tkiva. Nastanak tumora može uslijediti poremećajem regulacije bilo koje vrste stanica u tijelu, stoga razlikujemo više stotina različitih tumora tj. staničnih linija tumora. Tumor dolazi od latinske riječi tumor koja znači oteklina, a drugi naziv je novotvorina odnosno neoplazma. Rak je zloćudni tumor koji može biti opasan po život. Znanost koja se bavi proučavanjem novotvorina jest onkologija.

1.3.1 STANIČNE LINIJE TUMORA

Stanična linija, populacija tumorskih stanica uzgojena u kontroliranim uvjetima uglavnom izvan svog prirodnog okruženja. Nakon izdvajanja iz živog tkiva stanice se održavaju na životu u uvjetima u koji su im potrebni za rast i proliferaciju. Održavanje se vrši u posudama koje sadrže hranjivi medij. Hranjivi medij sadržavaju sve tvari koje su pružene stanicama u njihovoj prirodnoj sredini, tako u sastav medija ulaze aminokiseline, ugljikohidrati, vitamini, minerali, faktori rasta, hormoni te plinovi poput CO_2 i O_2. Osim hranjivih tvari potrebno je dodati pufere, te kontrolirati osmotski tlak i temperaturu. Većina stanica zahtijeva površinu ili suspendirani supstrat na koji se mogu pričvrstiti dok ostale stanice ne zahtijevaju pa se one mogu uzgojiti unutar medija kao suspendirana kultura. Životni vijek takvih stanica određen je skraćivanjem molekule DNA i gubitkom genetičke informacije. Neke stanične linije su besmrtne, pa se proliferiraju tj. reproduciraju beskonačno uz strogo održavanje optimalnih uvjeta. Takvo je umjetno svojstvo postignuto mutacijom gena zaduženih za starenje pa stanica ulazi u proces mitoze bez da na nju utječu normalni mehanizmi starenja stanice koji nakon određenog broja dioba sprječavaju stanicu da se dijeli ne bi li se izbjegao prijenos nakupljenih pogrešaka na genomu na stanice kćeri. Ovaj tip staničnih linija veoma je važan za znanstvena istraživanja u biokemiji i staničnoj biologiji. Staničnim linijama podrazumijevamo, stanice dobivene iz višestaničnih eukariotskih organizama (ljudi, životinja, biljaka, gljiva i mikroba). (42)

2 EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 CILJ RADA

Cilj ovoga rada je istražiti djelovanje nekih biološki aktivnih spojeva: timokinon farnezol, tujopsen, nerolidol i fitol, na programiranu smrt stanica humanog karcinoma.

Djelovanje tih biološki aktivnih spojeva na apoptozu, pratiti će se na stanicama karcinoma mokraćnog mjehura, stanične linije TCCSUP.

Hipoteza:

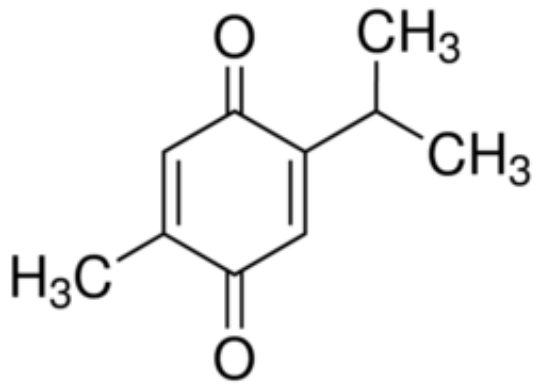
Biološki aktivni spojevi korišteni za izradu eksperimentalnog dijela ovoga rada imaju antiproliferativno i proapoptotsko djelovanje na stanice humanog karcinoma stanične linije TCCSUP.

2.2 MATERIJALI I METODE

2.2.1 BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI – REAGENSI

1. Timokinon (TQ)

Timokinon ili 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon je glavni i najvažniji biološki aktivni spoj u sastavu ulja sjemenki crnog kima (lat. *Nigella sativa*, L.). Njegova molekulska formula je $C_{10}H_{12}O_2$, dok strukturno spada u benzoidne diketone s izopropilnom tj. 1-metiletilnom skupinom na drugom i metilnom skupinom na petom C-atomu (27).

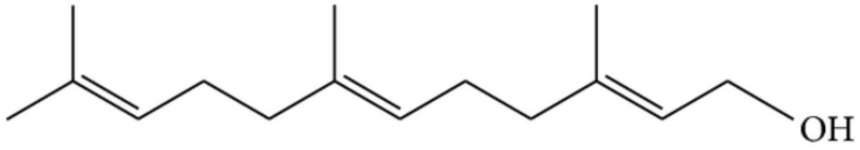


Slika 12. Strukturna formula timokinona

Timokinon pokazuje različita farmakološka svojstva. Ovaj spoj se pokazuje kao izvrstan antioksidant, a posjeduje i protuupalna, te antitumorska svojstva, djelovanja, ali također i mnoga druga važna svojstva. Timokinon učinkovito transformira signalne putove u tumorskim stanicama, te ima značajno antproliferativno djelovanje u kancerogenezi, a posljedično može smanjiti progres tumora. Njegovo antitumorsko djelovanje i aktivnost, očituju se u pokretanju p53-neovisne apoptoze aktivacijom kaspaza 8, te kaspaza 9 i 3, otpuštanjem citokroma c, regulacija omjera Bax/Bacl-2 itd (28).

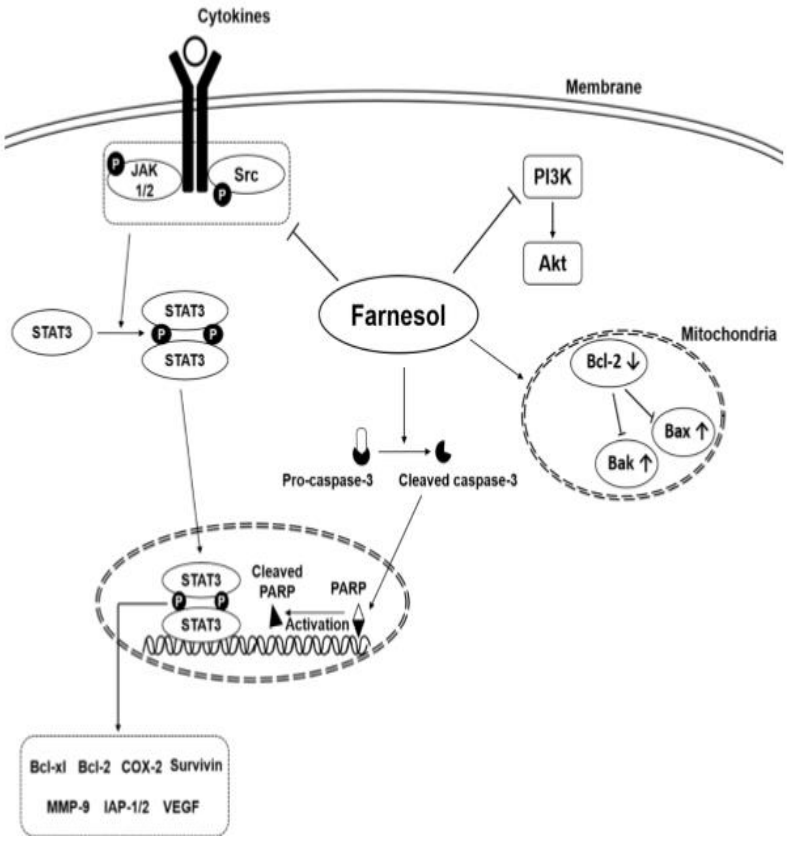
2. Farnezol (FAR)

Farnezol ili (*2E,6E*)-3,7,11-trimetildodeka-2,6,10-trien-1-ol je biološki aktivni spoj nađen u mnogo različitih biljaka kao što su ruža (lat. *Rosa hybrida*, L.), limunska trava (lat. *Cymbopogon citratus*, DC. Stapf.), citronela (lat. *Cymbopogon nardus*, L. Rendle) itd., te jakog je cvjetnog mirisa pa se koristi u proizvodnji parfema. Farnezol je seskviterpenski alkohol s 15 C-atoma, pa je njegova molekulska formula $C_{15}H_{26}O$ (29).



Slika 13. Strukturna formula farnezola

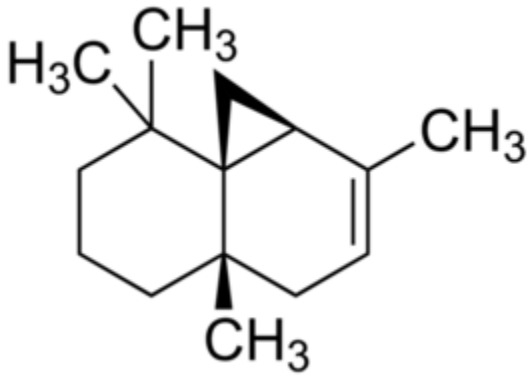
Opaženo je da farnezol posjeduje razna farmakološka svojstva kao što su protuupalna, antitumorska, te antibakterijska svojstva, a uz to i antioksidativna svojstva. Farnezol je učinkoviti pokretač apoptoze, te zaustavlja stanični ciklus. Na različitim staničnim linijama tumora, farnezol može modificirati neke tumorogene protein i/ili regulirati mnoge kaskade u transdukciji signala unutar stanice, a tako može pokrenuti apoptozu potisnuti proliferaciju stanica. Svojstva farnezola vidimo u većini biokemijskih i staničnih procesa povezanim sa inhibicijiom rasta, te pokretanjem apoptoze. Neki od takvih procesa uključuju regulaciju enzima kao što su 3-hidroksil-3-metilglutaril-CoA reduktaze (*HMG-CoA reduktaza*), fosfokolin cistidiltransferaza α (*CCT-α*), važni regulacijski enzimi u sintetskom putu mevalonata i biosintezi fosfatidil-kolina. Također ima i antioksidacijsko djelovanje jer smanjuje nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (*ROS*). Farnezol, potiskuje ekspresiju upalnih medijatora kao što su COX-2 (ciklooksigenaza 2), TNF-α, iNOS (inducirajuća NO sintetaza) i interlukin-6 na način da modificira Ras protein, te nuklearni factor (NF-κB) (30).



Slika 14. Uloga farnezola u procesu programirane smrti stanice

3. Tujopsen (TUY)

Tujopsen ili (1aS,4aS,8aS)-2,4a,8,8-tetrametil-1,1a,4,4a,5,6,7,8-oktahidrociklopropa[d]naftalen je biološki aktivni spoj najčešće nađen u esencijalnim uljima drveća kao što su (lat. *Juniperus cedrus*, Webb & Berthel), (lat. *Thujopsis dolobrata*, Siebold & Zucc.) i (lat. *Thuja plicata*, Donn.). Njegovo vrelište je na 258-260 °C, ali je on također termički nestabilan jer autooksidira u prisustvu kisika. Njegova molekulska formula je $C_{15}H_{24}$, a spada u skupinu seskviterpena (31).

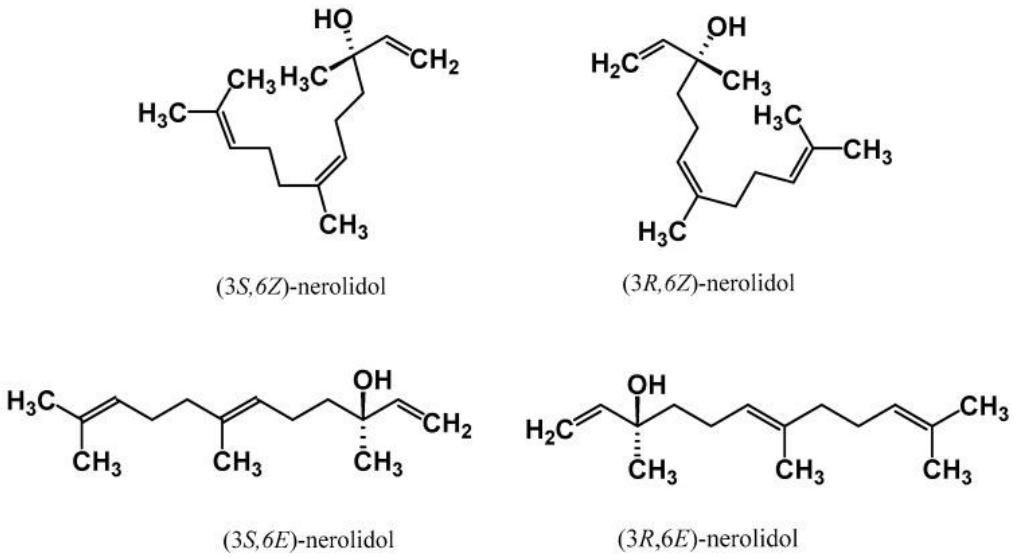


Slika 15. Strukturna formula tujopsena

Biosinteza tujopsena kreće od farnezil pirofosfata, a važan enzim u procesu njegove biosinteze je tujopsen-sintetaza odnosno (*2E,6E*)-farnezil difosfat liaza.

4. Nerolidol (NER)

Nerolidol (peruviol) ili 3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol je biološki aktivni spoj u sastavu esencijalnih ulja različitih biljaka, kao što sugorka naranča, đumbir (lat. *Zingiber officinale,* Roscoe), limunska trava, jasmin (lat. *Jasminum officinale,* L.), Cannabis sativa itd. Nerolidol ima specifičan drvenast miris te se koristi u proizvodnji parfema, ali i u proizvodnji sapuna i deterđenata. Nerolidol je seskviterpenski alkohol što znaći da ima 15 C-atoma i pojavljuje se kao racemična smjesa dvaju enantiomera, (zbog asimetričnog 3C-atoma) koja imaju dva strukturna izomera (s obzirom na dvostruku vezu na 6C-atomu). Tako je molekulska formula nerolidola $C_{15}H_{26}O$ (32).



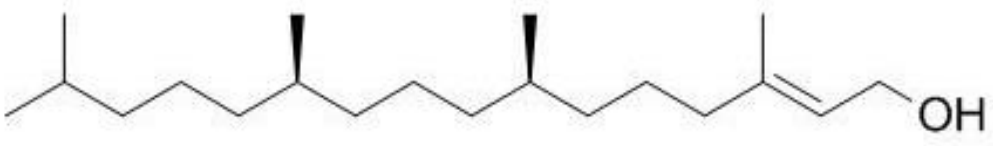
Slika 16. Strukturne formule svih izomera nerolidola

Danas su nam poznata različita farmakološka i biološka djelovanja nerolidola. Neka od njih su antimikrobna, antifungalna, antiparazitska, antioksidacijska, protuupalna i antitumorska svojstva. Mnoga su istraživanja pokazala da je upravo dugi seskviterpenski lanac nerolidola pojačivač za transdermalnu isporuku lijekova i za tvari koje općenito opskrbljuju membrane ljudske kože. Nerolidol je hidrofobni spoj, stoga može lako proći kroz staničnu membranu.

Unutar stanice može sudjelovati u interakcijama s raznim staničnim proteinima, a ovisno o koncentraciji može smanjiti mitohondrijski transmembranski električni potencijal, te na taj način započeti apoptozu (33).

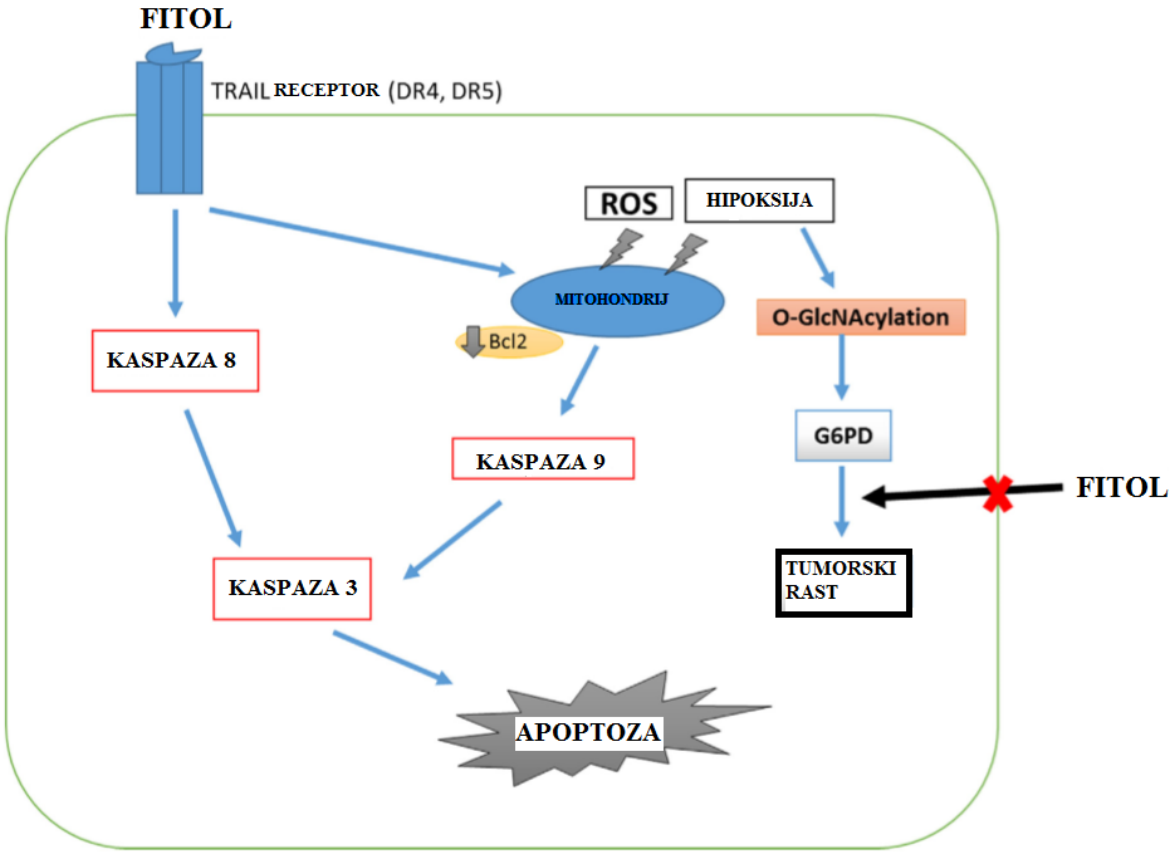
5. Fitol (FIT)

Fitol ili 3,7,11,15-tetrametilheksadek-2-en-1-ol je biološki aktivni spoj, koji se nalazi u sastavu strukture klorofila. On je sveprisutan u biljkama kao esterificirani dio i kao produkt razgradnje klorofila. Fitol ima slab cvjetni, te balzamični miris. Koristi se u proizvodnji parfema, sapuna, detedženata, u kozmetičkoj industriji itd. Također, fitol mož biti preteča za sintezu vitamina E i K1. Rjeđe je nađen u esencijalnim uljima. Fitol je mononezasićeni alifatski diterpenski alkohol, sa molekulskom formulom $C_{20}H_{40}O$ (34).



Slika 17. Strukturna formula fitola

Istraživanja farmakoloških i bioloških efekata fitola pokazali su da isti ima anksiolitička, citotoksična, antioksidacijska, protuupalna, antimikrobna svojstva, inducira apoptozu i autofagiju, te modulira metabolizam i imonosni sustav. Bioaktivnost fitola također se odnosi na mehanizme i njegovu interakciju sa PPAR i NF-κB receptorima. Fitol npr. u stanicama karcinoma pluća stanične linije A549 odgovoran je za karakteristične apoptoičke morfološke promjene i nastajanje ROS-a u tim stanicama. Takvi mehanizam fitola uključuje aktivaciju TRAIL, Fas i TNFα receptora smrti kao i kaspaze 3 i 9. Neka istraživanja pokazala su da se fitol dobro veže za glavni regulacijski enzim puta pentoze fosfata, glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G-6-PD) pa time djeluje antiproliferativno (35).

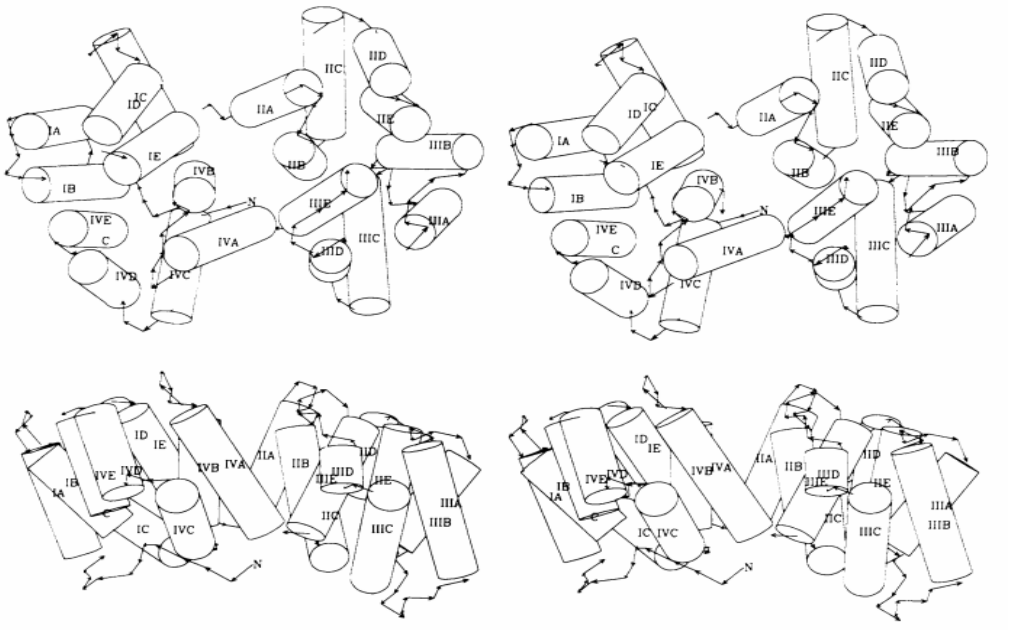


Slika 18. Utjecaj fitola na prokretanje apoptoze u stanicama raka linije A549.

2.2.2 SPECIFIČNA FLUORESCENTNA BOJILA STANICA

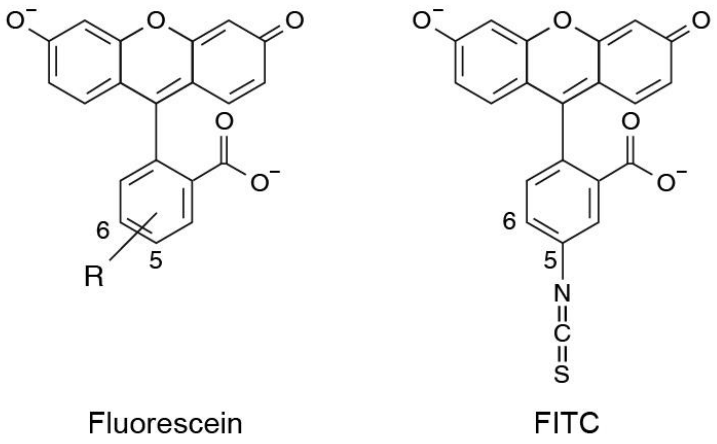
1. Aneksin V-FITC

Aneksin A5, odnosno Aneksin V, amfipatski unutarstanični protein, annexin grupe proteina, relativne je molekulske mase od 35-36 kDa. Sastavljen je od četiri domene od koje svaka domena je sastavljena pet α-uzvojnica navijenih u desnu superuzvojnicu, iz čega proizlazi globularna struktura. Aneksin V ima strukturne značajke membranskih proteina koji tvore kanale, ali ima i polarnu površinu što ga čini topljivim. Ovaj Ca^{2+} - ovisan i membranski vezujući protein, ima afinitet vezivanja za aminofosfolipide (npr. fosfatidiletannolamin, fosfatidilserin), od kojih je u procsu apoptoze najvažniji fosfatidilserin (PS), jer se translocira odnosno premješta s unutrašnje strane stanične membrane na vanjsku, te tako omogućava vezivanje aneksina V. On je također, antikoagulant odnosno inhibira koagulaciju krvi sprječavanjem vezivanja trombina. Aneksin V može biti konjugiran odnosno vezan s različitim fluorokromima (npr. FITC, APC itd.), a da pritom ne gubi afinitet za vezanje na fosfatidilserin. Zbog toga, koristi se kao osjetljiva i specifična sonda tj. antitijelo, kod analize protočnom citometrijom, stanica u apoptozi (36, 25).

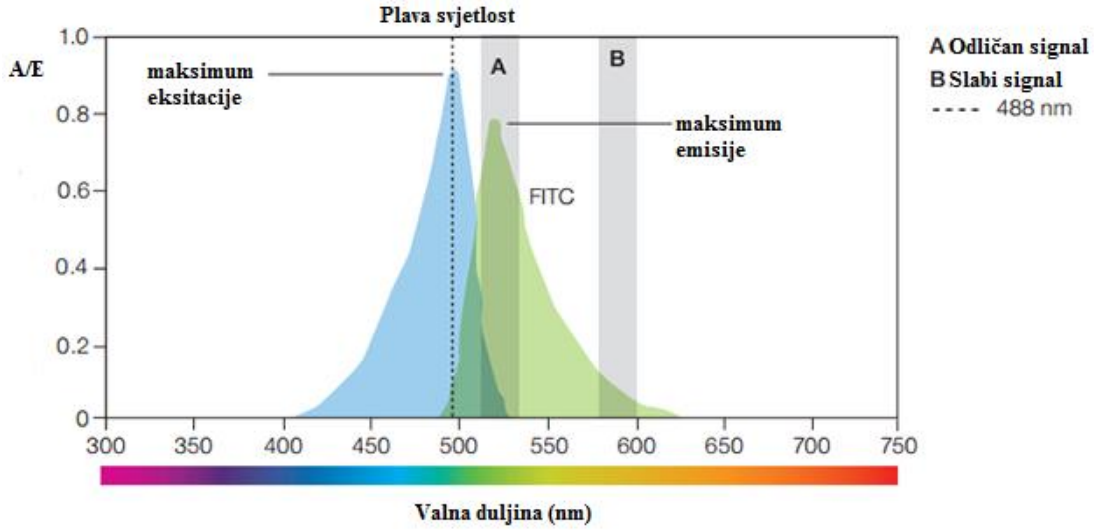


Slika 19. Kristalna struktura Annexina A5

FITC tj. fluorescein izotiocijanat, derivat je fluoresceina koji ima dosta reaktivnu izotiocijanatnu (-N=C=S) funkcionalnu skupinu na petom ili šestom C-atomu. Tipično se koristi u obliku smjese takvih izomera 5-FITC i 6-FITC. On je jedan od najpoznatijih fluorokroma tj. fluorescentnih obilježivača koji se koriste u modificiranju različitih proteina i biomolekula vezujući se s njihovim amino- i sulfhidril- ostatcima, te s tim biomolekulama tvore specifična fluorescentna antitjela koja se pak vežu na stanične markere apoptoze kao što je na primjer fosfatidilserin. Važno svojstvo FITC-a je njegova fluorescencija, dakle maksimalna eksitacijska valna duljina je na oko 495nm, a maksimalna emisijska valna duljina je na oko 519nm, a to mu daje zelenu boju u analizi protočnom citometrijom (37).



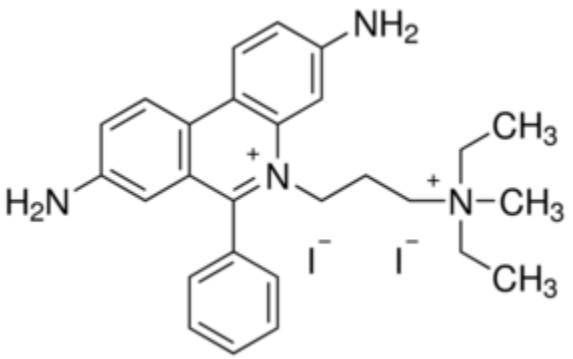
Slika 20. Struktura fluoresceina i njegovog derivate FITC-a



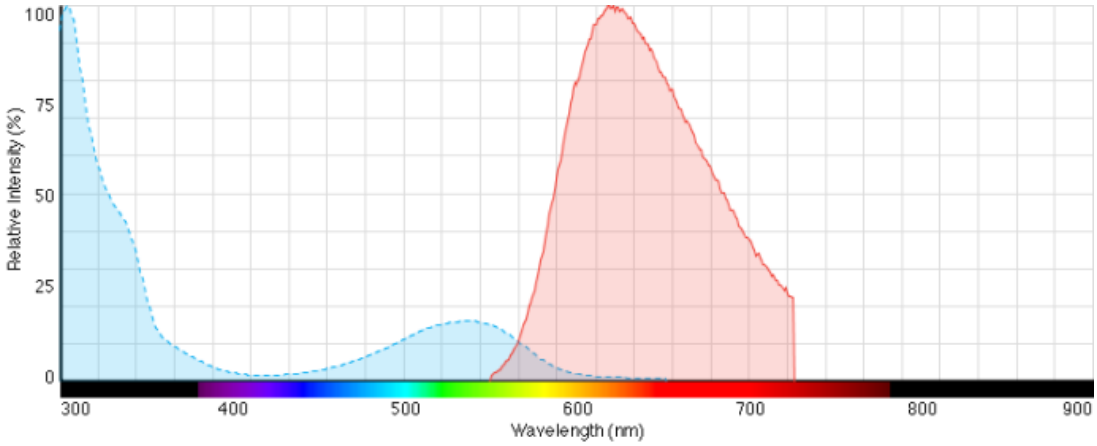
Slika 21. Eksitacijsko-emisijski spektar FITC-a.

2. Propidij - jodid (PI)

Propidij-jodid poznati je fluorokrom, odnosno crveno fluorescentno bojilo, najčešće korišteno u tehnikama kao što su fluorescentna mikroskopija i protočna citometrij, koji se koristi za bojanje stanica koje su u kasnoj apoptozi, ili pak nekrotičan. PI nema mogućnost prolaska kroz staničnu membranu žive stanice. No, kada se radi o stanicama u kasnoj apoptozi i nekrotičnim stanicama, kojima je integritet stanične membrane jako narušen, on je vrlo lako propustan. To ga čini jako dobrim indikatorom zadnjih stadija smrti stanice. Propidij-jodid se specifično veže na DNA interkalacijom tj. vezivanjem u dvostruku uzvojnicu planarno na mjestima između naslaganih parova baza. U vodenoj otopini, bojilo ima eksitacijske/emisijske maksimume u 493 nm/636 nm. Nakon vezivanja fluorescencijski eksitacijski maksimum je pomaknut za 30-40 nm u crveno, a fluorescencijski emisijski maksimum za otprilike 15 nm, u plavo. Tako je fluorescencijski eksitacijski maksimum na 534 nm, a emisijski na 617 nm (38, 39).



Slika 22. Struktura propidij-jodida



Slika 23. Eksitacijsko emisijski spektar propidij-jodida

2.2.3 OPĆENITO O ANEKSIN V-FITC TESTU

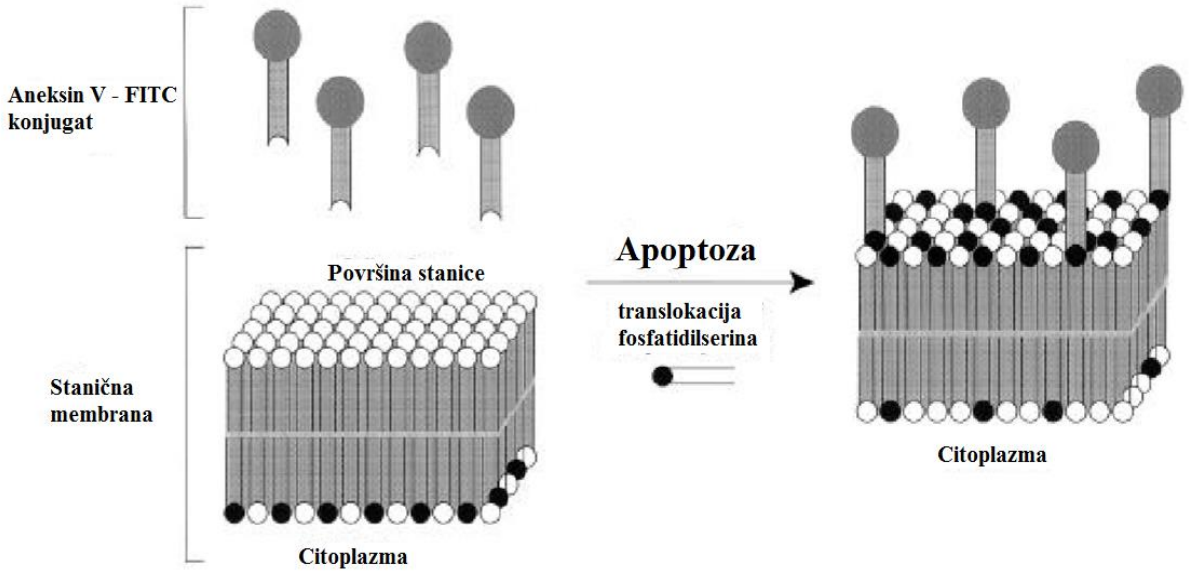
Aneksin V-FITC test tj. esej (engl. *Annexin V-FITC assay*) je test kojim se mogu detektirati i pratiti različiti stadiji inducirane apoptoze određenih stanica. Znamo daje jedan od prvih morfoloških znakova apoptoze bubrenje stanične membrane u kojoj se, kao prethodno rečeno, događa translokacija odnosno premještanje aminofosfolipida (fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin) na vanjski sloj stanične membrane, dok su u fiziološkim uvjetima isti isključivo na unutarnjem sloju stanične membrane. Tako dolazi do narušavanja asimetrije stanične membrane.

Detekcija fosfatidilserina pomoću FITC-om obilježenog 36 kDa velikog antikoagulacijskog proteina Aneksin-a V, omogućava preciznu procjenu učestalosti apoptoze. Ovaj protein se reverzibilno veže na ostatke fosfatidilserina samo u prisutnosti mM koncentracije dvovalentnih kalcijevih iona. Aneksin V konjugiran s fluorescein izotiocijanatom (FTIC-om) detektira i spaja se dakle sa fosfatidilserinom na površini stanice u prisustvu Ca^{2+} iona, te na taj se način određuje broj stanica u ranoj i kasnoj apoptozi. Premještanje odnosno translokacija PS uvijek prethodi gubljenju integriteta stanične membrane što je obilježje kasnijeg stadija apoptoze. Zbog toga, za precizniju procjenu učestalosti apoptoze potrebno nam je i sekundarno specifično fluorescentno bojilo (fluorokrom) kao npr. propidij-jodid. To bojilo u normalnim uvjetima žive stanice je potpuno nepropusno kroz njenu membranu, te tek kada u kasnijem stadiju apoptoze, integritet stanične membrane postane narušen PI može proći kroz membranu jer ona u tom stadiju postane propusna. Onda odlazi do jezgre gdje se interkalacijom veže za DNA i potom fluorescira crvenom bojom, kontrastno zelenoj FITC-a nošenog aneksinom V.

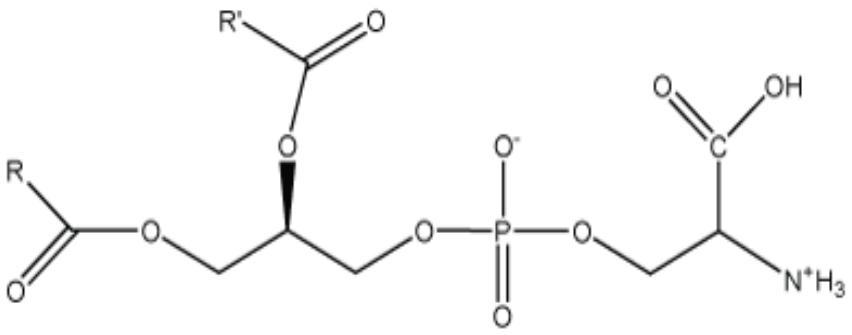
Žive stanice su aneksin V-FITC i PI negativne odnosno nema vezivanja, ni fluorescencije. Stanice u ranom stadiju apoptoze su pozitivne na aneksin V-FITC, jer se vezuje na PS čime zapažamo fluorescenciju zelene boje na staničnoj membrane, dok su PI negativne. Kada govorimo o kasnom stadiju apoptoze podrazumijeva se da je integritet stanične membrane narušen, a to podrazumijeva da su vezani i aneksin V-FITC i propidij-jodid (40).



Slika 24. Shematski prikaz stadija apoptoze, te načina vezanja Aneksina V-FITC i propidij-jodida



Slika 25. Shematski prikaz translokacije fosfatidilserina, te vezanje aneksin V-FITC konjugata.



Slika 26. Strukturna formula fosfatidilserina, R i R' označavaju ugljikovodične lance masnih kiselina.

2.2.4 STANIČNA LINIJA TCCSUP

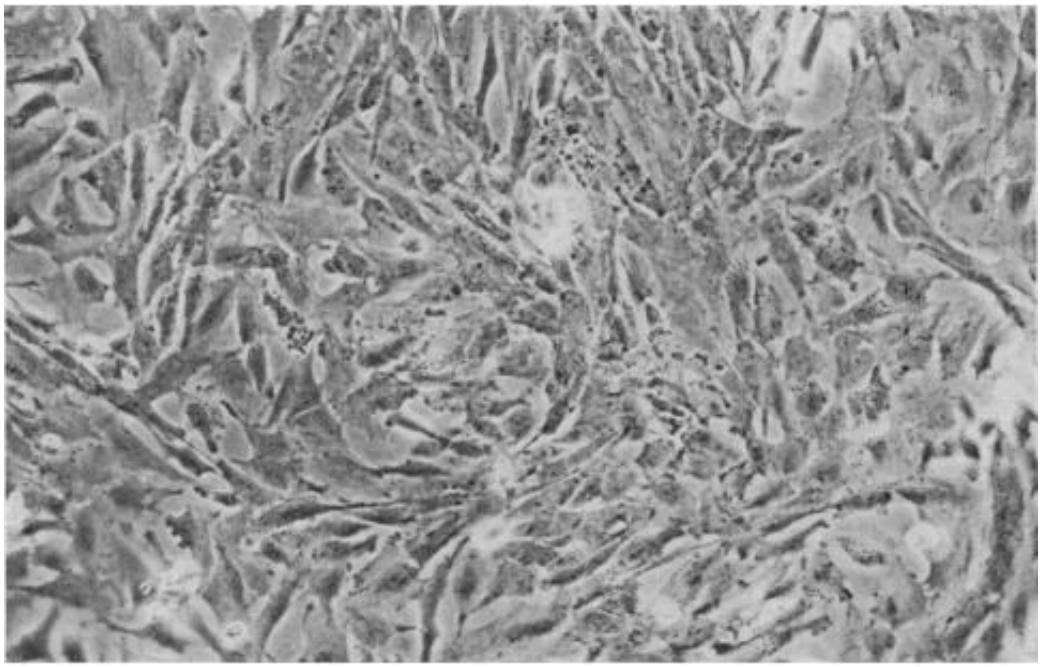
Eksperimentalni dio ovoga rada je rađen na humanom karcinomu mokraćnog mjehura, stanične linije TCCSUP. Na toj, TCCSUP staničnoj liniji izvršen je pokušaj induciranja apoptoze, prije opisanim biološki aktivnim spojevima u svrhu dokazivanja njihovog antiproliferativnog djelovanja.

Stanična linija TCCSUP uzgojena je iz mokraćnog mjehura oboljelog od G4 karcinoma prijelaznih epitelnih stanica. Iako su ove stanice nastale iz epitelnih stanica izgubile su morfološke značajke koje karakteriziraju epitelne stanice.

Adherentna je stanična linija treba podloga. Generacijsko vrijeme im je od 30 do 40 sati. Čuva se u hranjivoj podlozi koja sadrži 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijevog piruvata i 1500 mg/L natrijevog bikarbonata te 10% fetalnog goveđeg seruma, te u atmosferi s oko 5 % CO_2 na 37 °C. Precjepljivanje se radi u omjerima od 1:2 do 1:3, a hranjiva podloga se mora zamijeniti 2-3 puta tjedno. Uklanjanje hranjivog medija, te ispiranje sloja stanica otopinom 0,25 % tripsina i 0,53 mM EDTA je precjepljivanje. Radi se na način da se doda 2 do 3 mL otopine tripsin-EDTA da se stanice odvoje od podloge. Nakon toga stavi se hranjiva podloga i prenesu stanice u novu posudu te stave u inkubator.

Tablica 2.1. Neka obilježja TCCSUP stanične linije (41)

ORGANIZAM	**HOMO SAPIENS, HUMAN**
TKIVO	MOKRAĆNI MJEHUR
MORFOLOGIJA	EPITELIJALNE
SVOJSTVA KULTURE	ADHERENTNA
FORMAT PROIZVODA	ZAMRZNUT



Slika 27. Mikroskopska slika stanične linije TCCSUP

2.3 PRIPREMA OTOPINA REAGENSA

2.3.1 OPIS PRIPREME OTOPINA

Sve su standardne otopine korištenih spojeva (timokinon, fitol, tujopsen, farnezol, nerolidol) pripremljene od stok otopine koncentracije 20 mg/ml. Sve se otopine prvo razrjeđuju sa dimetilsulfoksidom (DMSO) do određene koncentracije, a konačne otopine za svaki spoj pripremljene su razrijeđivanjem s medijem (engl. *Dulbecco's modiffied eagle medium; DMEM)* na 6 ml. Kod pripreme otopina trebalo se voditi računa da konačni volumni udio DMSO u otopini bude manj ili jednak 1% ($\phi_{DMSO} \leq 1\%$).

Za timokinon priređuje se otopina s krajnjom koncentracijom 0,003125 μg/μl, a za fitol otopina krajnje koncentracije 0,0125 μg/μl. Otopine tujopsena i farnezola moraju biti koncentracije 0,035 μg/μl, te otopina nerolidola koncentracije 0,05 μg/μl. Tim se otopinama tretira TCCSUP stanična linija karcinoma mokraćnog mjehura.

2.3.1.1 PRIMJER PRORAČUNA PRIPREME OTOPINE FITOLA

Ovaj primjer proračuna pokazuje pripremu otopine fitola, te volumene za pripravu točnih koncentracija otopina.

Fitol

c(standard.) = 20 mg/ml = 20 μg/μl

c_1 = 5 mg/ml = 5 μg/μl

V_1 = 1 ml = 1000 μl V_1 = V(standard.) + V(DMSO)

c(standard.) * V(standard.) = c_1 * V_1

20 μg/μl * x = 5 μg/μl * 1000 μl

x = 250 μl V(DMSO) = 1000 μl – 250 μl = 750 μl

c_2 = 0,0125 μg/μl

V_2 = 6000 μl V_2 = V_1 + V(DMEM)

c_1 * V_1 = c_2 * V_2

5 μg/μl * x = 0,0125 μg/μl * 6000 μl

x =15 μl V(DMEM) = 6000 μl–15 μl = 5985 μl

2.4 POSTUPAK

2.4.1 PROTOKOL ZA ANEKSIN V - FITC TEST

Nakon odmrzavanja, TCCSUP stanična linija je uzgojena u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO_2, u DMEM mediju. Nakon priprave otopina biološki aktivnih spojeva na prethodno opisan način, , stari se medij ukloni, te se u svaku jažicu doda po 2 ml otopine uzorka. Ta 2 ml otopine, sadrže pojedini biološki aktivni spoj i medij za uzgoj kultura stanica, kao što je DMEM. Tako tretirane stanice inkubiraju se na 37°C u 5% CO_2 24-48 sati.

Tablica 2.2. Prikaz punjenja jažica reagensima

PLOČICA 1.	Timokinon 1	Timokinon 2	Timokinon 3
	Farnezol 1	Farnezol 2	Farnezol 3
PLOČICA 2.	Tujopsen 1	Tujopsen 2	Tujopsen 3
	Fitol 1	Fitol 2	Fitol 3
PLOČICA 3.	Nerolidol 1	Nerolidol 2	-
	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3

Nakon 48 sati, medij se ukloni i stanice se isperu s 750 µl PBS-a (engl. *Phosphate - buffered saline*) odnosno fosfatnog pufera (pH = 7,4) i tripsina, te se fizički odvoje od jažica i resuspendiraju. U kivete se uzme 150 µl takve homogenizirane suspenzije stanica. Zatim slijedi centrifuga na 5 min, potom se odvoje stanice od supernatanta, kojeg odbacujemo, te se u kivete doda 195 µl pufera za vezivanje koji sadrži kalcijeve dvovalentne ione. Relativna gustoća stanica u kiveti bi trebala biti 2-5x10^5/ml.

Takva suspenzija se zatim boja s 5 µl Annexin V-FITC (Annexin V FITC-Apoptoza Detection Kit I, BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Novonastale obojane suspenzije se miješaju i inkubiraju 10 minuta na sobnoj temperature, a zatim se suspenzija centrifugira, dekantira te supernatant odbaci. Stanice se isperu sa novih 200 µl pufera za vezivanje, te se ponovi centrifugiranje i dekantiranje. Na posljetku, stanice se resuspendiraju u 195 µl novog pufera za vezivanje. Cijela se suspenzija boja s 5 µl propidij-jodida (20 µg/ml). Analizu provodimo na protočnom citometru (BD Accuri C6, BD Biosciences), te rezultate bilježimo i čitamo u obliku postotaka živih (aneksin V- / PI-), rano apoptotskih (aneksin V+ / PI-), kasno apoptotskih (annexin V+ / PI+), te nekrotičnih stanica (aneksin V- / PI+). Na temelju tih podataka zaključujemo kako i na koji način pojedini biološki aktivni spoj inducira programiranu smrt stanica.



Slika 28. BD Accuri C6 protočni citometar

3 REZULTATI

REZULTATI MJERENJA ZA TIMOKINON

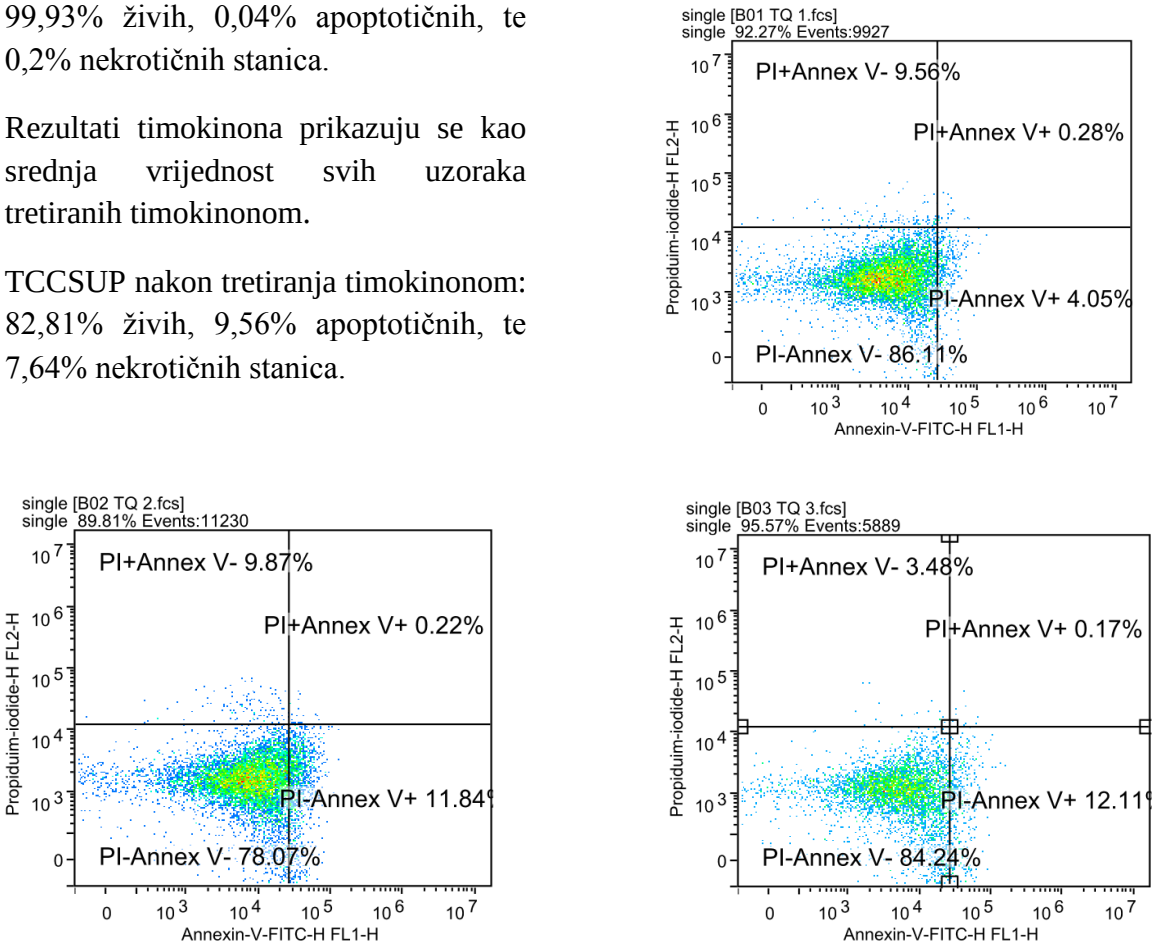
Tablica 3.1. Učinak timokinona (TQ) na apoptozu stanične linije TCCSUP, u odnosu na kontrolu neobojanu

SKUPINA	Žive stanice PI-/Aneks V- (%)	Rana apoptoza PI-/Aneks V+ (%)	Kasna apoptoza PI+/Aneks V+ (%)	Mrtve stanice PI+/Aneks V- (%)
Kontrola (blank)	**99,93**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
Timokinon br. 1	**86,11**	**4,05**	**0,28**	**9,56**
Timokinon br. 2	**78,07**	**11,84**	**0,22**	**9,87**
Timokinon br. 3	**84,24**	**12,11**	**0,17**	**3,48**

Neobojana i netretirana kontrola sadrži 99,93% živih, 0,04% apoptotičnih, te 0,2% nekrotičnih stanica.

Rezultati timokinona prikazuju se kao srednja vrijednost svih uzoraka tretiranih timokinonom.

TCCSUP nakon tretiranja timokinonom: 82,81% živih, 9,56% apoptotičnih, te 7,64% nekrotičnih stanica.



Slika 3.1. Citogrami dobiveni mjernjem (triplikat) apoptoze za timokinon pomoću aneksin V-FITC testa na protočnom citometru.

REZULTATI ZA FARNEZOL

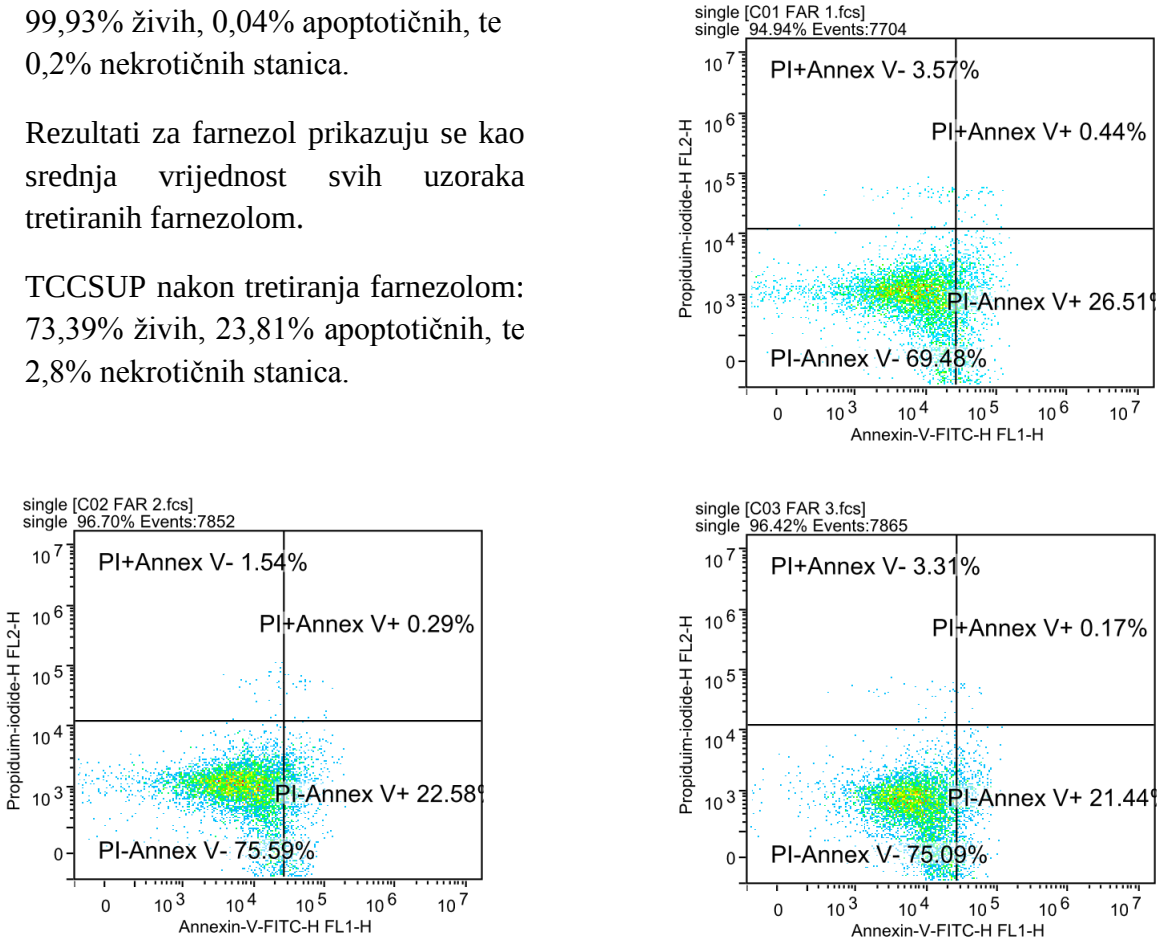
Tablica 3.2. Učinak farnezola (FAR) na apoptozu stanične linije TCCSUP, u odnosu na kontrolu neobojanu

SKUPINA	Žive stanice PI-/Aneks V- (%)	Rana apoptoza PI-/Aneks V+ (%)	Kasna apoptoza PI+/Aneks V+ (%)	Mrtve stanice PI+/Aneks V- (%)
Kontrola (blank)	**99,93**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
Farnezol br. 1	**69,48**	**26,51**	**0,44**	**3,57**
Farnezol br. 2	**75,59**	**22,58**	**0,29**	**1,54**
Farnezol br. 3	**75,09**	**21,44**	**0,17**	**3,31**

Neobojana i netretirana kontrola sadrži 99,93% živih, 0,04% apoptotičnih, te 0,2% nekrotičnih stanica.

Rezultati za farnezol prikazuju se kao srednja vrijednost svih uzoraka tretiranih farnezolom.

TCCSUP nakon tretiranja farnezolom: 73,39% živih, 23,81% apoptotičnih, te 2,8% nekrotičnih stanica.



Slika 3.2. Citogrami dobiveni mjernjem (triplikat) apoptoze za farnezol pomoću aneksin V-FITC testa na protočnom citometru.

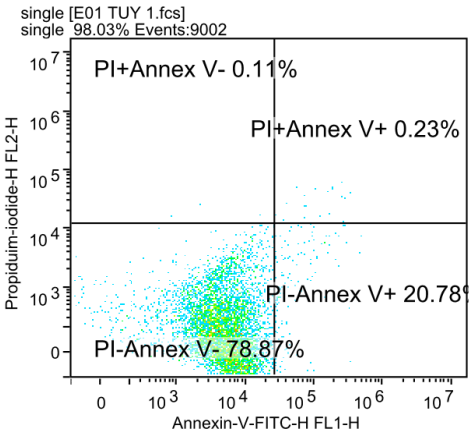
REZULTATI ZA TUJOPSEN

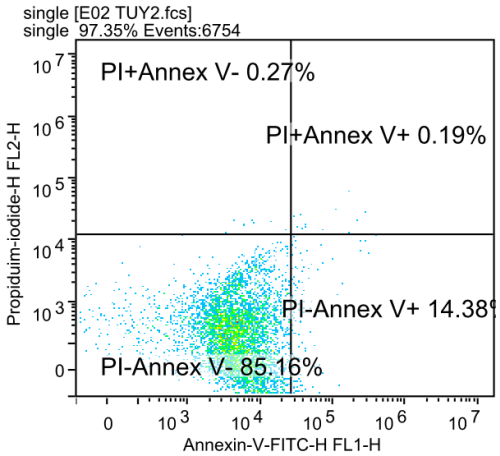
Tablica 3.3. Učinak tujopsena (TUJ) na apoptozu stanične linije TCCSUP, u odnosu na kontrolu neobojanu

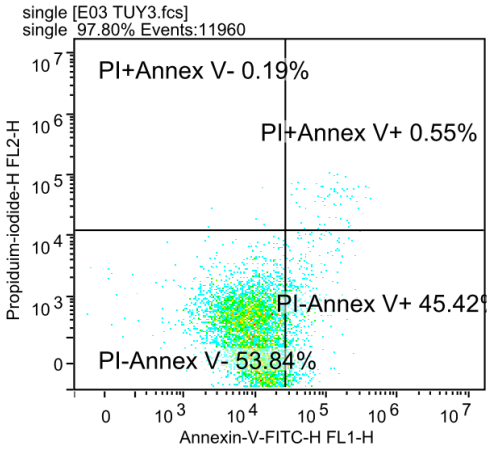
SKUPINA	Žive stanice PI-/Aneks V- (%)	Rana apoptoza PI-/Aneks V+ (%)	Kasna apoptoza PI+/Aneks V+ (%)	Mrtve stanice PI+/Aneks V- (%)
Kontrola (blank)	**99,93**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
Tujopsen br. 1	**78,87**	**20,78**	**0,23**	**0,11**
Tujopsen br. 2	**85,16**	**14,38**	**0,19**	**0,27**
Tujopsen br. 3	**53,84**	**45,42**	**0,55**	**0,19**

Rezultati za tujopsen prikazuju se kao srednja vrijednost samo uzoraka 1. i 2. tretiranih tujopsenom. Zbog moguće velike eksperimentalne pogreške za uzorak 3.

TCCSUP nakon tretiranja tujopsenom: 82,02% živih, 17,19% apoptotičnih, te 0,19% nekrotičnih stanica.







Slika 3.3. Citogrami dobiveni mjernjem (trplikat) apoptoze za tujopen pomoću aneksin V-FITC testa na protočnom citometru.

REZULTAITI ZA FITOL

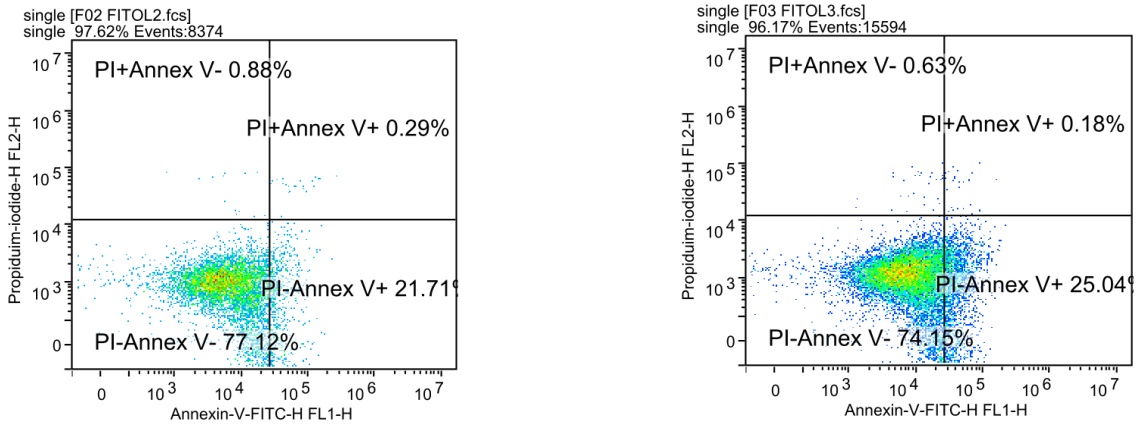
Tablica 3.4. Učinak fitola (FIT) na apoptozu stanične linije TCCSUP, u odnosu na kontrolu neobojanu

SKUPINA	Žive stanice PI-/Aneks V- (%)	Rana apoptoza PI-/Aneks V+ (%)	Kasna apoptoza PI+/Aneks V+ (%)	Mrtve stanice PI+/Aneks V- (%)
Kontrola (blank)	**99,93**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
Fitol br. 1	**82,17**	**15,43**	**0,18**	**2,22**
Fitol br. 2	**77,12**	**21,71**	**0,29**	**0,88**
Fitol br. 3	**74,15**	**25,04**	**0,18**	**0,64**

Neobojana i netretirana kontrola sadrži 99,93% živih, 0,04% apoptotičnih, te 0,2% nekrotičnih stanica.

Rezultati za fitol prikazuju se kao srednja vrijednost svih uzoraka tretiranih fitolom.

TCCSUP nakon tretiranja fitolom: 77,81% živih, 20,95% apoptotičnih, te 1,25% nekrotičnih stanica.



Slika 3.4. Citogrami dobiveni mjernjem (triplikat) apoptoze za fitol pomoću aneksin V-FITC testa na protočnom citometru.

REZULTATI ZA NEROLIDOL

Tablica 3.5. Učinak nerolidola (NER) na apoptozu stanične linije TCCSUP, u odnosu na kontrolu neobojanu

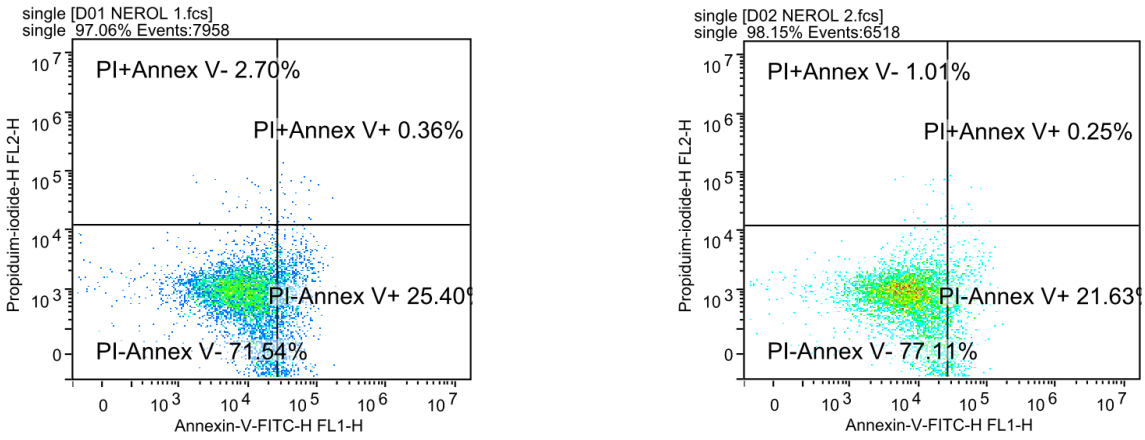
SKUPINA	Žive stanice PI-/Aneks V- (%)	Rana apoptoza PI-/Aneks V+ (%)	Kasna apoptoza PI+/Aneks V+ (%)	Mrtve stanice PI+/Aneks V- (%)
Kontrola (blank)	**99,93**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
Nerolidol br. 1	**71,54**	**25,40**	**0,36**	**2,70**
Nerolidol br. 2	**77,11**	**21,63**	**0,25**	**1,01**

Neobojana i netretirana kontrola sadrži 99,93% živih, 0,04% apoptotičnih, te 0,2% nekrotičnih stanica.

Rezultati za nerolidol prikazuju se kao srednja vrijednost svih uzoraka tretiranih nerolidolom.

TCCSUP nakon tretiranja fitolom:

74,33% živih, 23,82% apoptotičnih, te 1,86% nekrotićnih



Slika 3.5. Citogrami dobiveni mjernjem (duplikat) apoptoze za nerolidol pomoću aneksin V-FITC testa na protočnom citometru.

KONTROLE

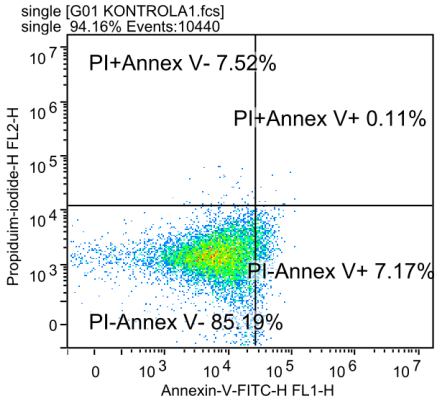
Tablica 3.6. Prikaz triju ne tretiranih, ali obojanih kontrola, u odnosu na kontrolu neobojanu..

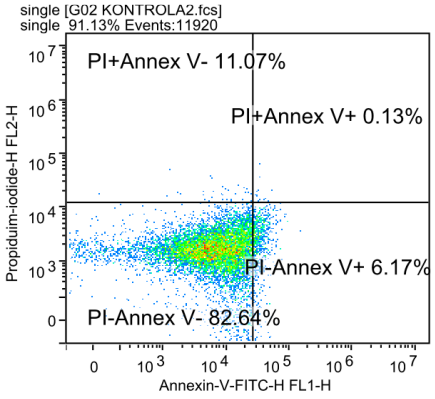
SKUPINA	Žive stanice PI-/Aneks V- (%)	Rana apoptoza PI-/Aneks V+ (%)	Kasna apoptoza PI+/Aneks V+ (%)	Mrtve stanice PI+/Aneks V- (%)
Kontrola (blank)	**99,93**	**0,02**	**0,02**	**0,02**
Kontrola br. 1	**85,19**	**7,17**	**0,11**	**7,52**
Kontrola br. 2	**82,64**	**6,17**	**0,13**	**11,07**
Kontrola br. 3	**90,74**	**6,13**	**0,08**	**3,05**

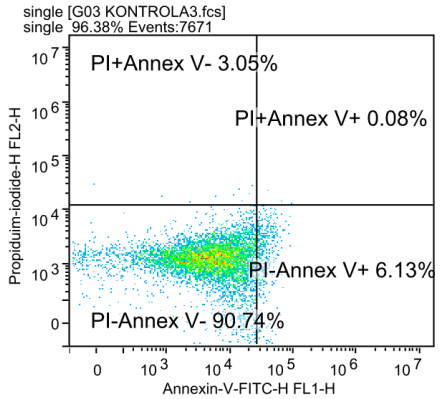
Neobojana i netretirana kontrola sadrži 99,93% živih, 0,04% apoptotičnih, te 0,2% nekrotičnih stanica.

Rezultati za obojane netretirane konrole prikazuju se kao srednja vrijednost svih obojanih netretiranih kontrola.

TCCSUP obojane kontrole sadrže: 86,2% živih, 6,6% apoptotičnih, te 7,2% nekrotičnih stanica.







Slika 3.6. Citogrami dobiveni mjernjem (triplikat) apoptoze za netretirane kontrole pomoću aneksin V-FITC testa na protočnom citometru.

4 RASPRAVA

Tijekom apoptoze dolazi do bubrenja stanične membrane, pa time i do translokacije fosfatifilserina (PS), sa unutarnjeg sloja na vanjski sloj stanične membrane. Apoptozu možemo pratiti direktno pomoću protočne citometrije. Za takvo praćenje apoptoze odnosno programirane smti stanice u ovom radu se koristio aneksin V-FITC test.

Za izradu eksperimentalnog dijela ovoga rada korištena je TCCSUP stanična linija karcinoma mokraćnog mjehura. Detekcija apoptoze praćena je nakon što su stanice tretirane otopinama određenih biološki aktivnih spojeva (timokinona, farnezola, nerolidola, tujopsena i fitola). Timokinon spada u benzenoidne diketone, tujopsen u seskviterpene, fitol je pak diterpenski alkohol, a nerolidol i fitol su seskviterpenski alkoholi. Stanice su bojane na prije objašnjen način aneksin V-FTIC-om i propidij-jodidom, te analizirane protočnim citometrom (BD Accuri C6).

Rezultati analize prikazani su u postotcima, tablično, kao srednje vrijednost broja živih stanica, stanica u ranoj apoptozi, stanica u kasnoj apoptozi, te mrtvih tj. nekrotičnih stanica. Uzorak TCCSUP stanične linije tretiran timokinonom ima 82,81 % živih, 9,56 % apoptotičnih, te 7,64 % nekrotičnih stanica. Uzorak tretiran farnezolom ima 73,39 % živih, 23,81 % apoptotičnih, te 2,8 % nekrotičnih stanica Rezultati za nerolidol daju 74,33 % živih, 23,82 % apoptotičnih, te 1,86 % nekrotićnih. Tujopsen pokazuje 82,02 % živih, 17,19 % apoptotičnih, te 0,19 % nekrotičnih stanica, a fitol 77,81 % živih, 20,95 % apoptotičnih, te 1,25 % nekrotičnih stanica. Uz tablične rezultate, priloženi su i točkasti grafovi dobiveni protočnom citometrijom za svaki uzorak.

5 ZAKLJUČAK

- Apoptoza tj. programirana smrt stanice jako je važan stanični proces za održavanje homeostaze.
- Apoptoza može biti pokrenuta različitim čimbenicima, a može ići vanjskim ili unutarnjim mehanizmom.
- Protočna citometrija je sofisticirana metoda analize koja se koristi za istraživanja u biokemiji, molekularnoj biologiji, mikrobiologiji i ostalim znanstvenim disciplinama.
- Stanična linija TCCSUP je uzgojena iz G4 stanica raka mokraćnog mjehura.
- Aneksin V-FITC veže se na apoptotski marker fosfatidilserin u prisutnosti Ca^{2+}, a PI se veže na DNA u jezgri.
- Za induciranje apoptoze i inhibiciju proliferacije tumorskih stanica TCCSUP linije korišteni su biološki aktivni spojevi: timokinon (TQ), farnzol (FAR), nerolidol (NER), tujopsen (TUJ), fitol (FIT).
- Svi navedeni spojevi pokazuju antiproliferativna i proapoptotska svojstva
- Iz rezultata se da zaključiti da nerolidol i farnezol i imaju najjače proapoptotsko djelovanje s gotovo identičnim postotkom preživjelih, apoptotičnih i nekrotičnih stanica.
- Nerolidol i farnezol su seskviterpenski alkoholi slične strukture pa je i njihovo apoptotičko djelovanje slično
- Od pet odabranih biološki aktivnih spojeva farnezol i nerolidol pokazuju najbolju apoptotičku aktivnost (FAR: *73,39 %, 23,81 % , 2,8 %* ; NER: *74,33 %, 23,82 %, 1,86 %).*

6 LITERATURA

1. R. Jerinčić, *Djelovanje oleuropeina iz ekstrakta lista divlje masline na apoptozu različitih staničnih linija humanih karcinoma*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, rujan 2017.
2. V. Žlender, *Apoptoza – programirana smrt stanice*, *Arh Hig Rada Toksikol*, 2003;53:267-274.
3. Z. Hongmei, *Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review*, *Apoptosis and Medicine*. 2012 .
4. C. K. Zimmerman, R. D. Green, *How cell die: apoptosis pathways*, *J allergy clin immunol* 2000;108:99-103
5. C. Köhler, O. Sten, Z. Boris, *Evaluation of caspase activity in apoptotic cells*, *J imminol methods* 2002;265:97111.
6. K. L. Miller, *An exegesis of iaps: salvation and surprises from bir motifs*, *Trends cell biol* 1999;9:323-8.
7. A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, V. M. Dixit, *FADD, a novel death domain containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis*, *Cell* 1995;81:505-12
8. W. Faubion, G. Gores, *Death receptors in liver biology and pathobiology*, *Hepatology* 1999;29:1-4.
9. D. L. Vaux, *Apoptosis and toxicology-what relevance*, *Toxicology* 2002;181-182: 3-7
10. L. E. Sánchez-Torres, F. D. Vargas, *Apoptosis: the phenomenon and its determination*, *Téc pecu méx* 2003;41(1):49-62.
11. A. R. Clarke, C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, C. C. Bird, M. L. Hooper, i sur. *Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways*, *Nature* 1993;362:849-52.
12. A. E. Komarov, V. A. Gudkov. *Chemoprotection from p53dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors*, *Biochem pharmacol* 2001;62:657-67.
13. J. Adams, S. Cory, *The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*, *Science* 1998;281:1322-6.
14. P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinvasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, i sur. *Cytochrome c and datpdependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*, *Cell* 1997;91: 479-89.
15. Y. Zhang, B. Herman, *Ageing and apoptosis*, *Mech aeing dev*, 2002;123:245-60.

16. P. Widlak P, Y. L. Li, X. Wang, T. W. Garrard, *Action of recombinant human apoptotic endonuclease g on naked dna and chromatin substrates*, *J biol chem*, 2001;276:48404-09.
17. A. S. Susin, E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, i sur. *Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis*, *J Exp med*, 2000;192: 571-9.
18. L. E. Sánchez-Torres, F. D. Vargas, *APOPTOSIS: The phenomenon and its determination*, *Téc pecu méx* 2003;41(1):49-62.
19. Cooper, M. G. Her. *Stanični ciklus: Regulacija programirane stanične smrti, In: Gordan Lauc*, Medicinska naklada; 2004;3:580–2.
20. Y. J. Lim, J. A. Choi, H. H. Choi, S. N. Cho, H. J. Kim, E. K. Jo, *Endoplasmic reticulum stress Pathway-Mediated apoptosis in macrophages contributes to the survival of Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS One*, 2011;14:6-12.
21. Y. H. Kang, M. J. Yi, M. J. Kim, M. T. Park, S. Bae, C. M. Kang, *Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: Reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerise-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria*, *Cancer Res.* 2004;64(24):8960–7.
22. S. Y. Proskuryakov, A. G. Konoplyannikov, V. L. Gabai, *Necrosis: a specific form of programmed cell death?*, *Exp. Cell Res.*, 2003;283(1):1–16.
23. D. Green, *Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
24. J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*, *British Journal of Cancer*,1972;26 (4):239–57.
25. Čikeš-Čulić V., *Metode određivanja apoptoze u kulturi karcinomskih stanica*, MS Powerpoint prezentacija, svibanj 2017.
26. V. Žlender, *Detection of apoptosis*, *Arh Hig Rada Toksikol*, 2006;57:229–36.
27. Bhanushree Gupta, Kallol K. Ghosh, Ramesh C. Gupta, *Thymoquinone, Nutraceuticals Efficacy*, Safety and Toxicity, 2016, chapter 39, pp. 541-550
28. M. Khader and P. M. Eckl, *Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications*, *Iran J Basic Med Sci*, 2014;17(12):950–957.
29. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Farnesol
30. Y. Y. Jung, S. T. Hwang, G. Sethi, L. Fan, F. Arfuso, K. S. Ahn, *Potential anti-inflammatory and anti-cancer properties of farnesol*, *MDPI, Molecules*, 2018;23(11):2827

31. J. Runeburg, T. Gramstad, L. Larsson, R. M. Dodson, *The Chemistry of the Natural Order Cupressales, Constituents of Juniperus cedrus L., Acta Chemica Scandinavica.* 1960;14:1991–1994.
32. R. Tisserand, R. Young PhD, *Essential Oil Safety (Second Edition) A Guide for Health Care*, Professionals, 2014, Pages 483-647
33. W. K. Chan, L. T. Tan, K. G. Chan, L. H. Lee, B. H. Goh, *Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities*, *Molecules*, 2016;21(5):529.
34. YeonWoo Song and Somi Kim Cho, Song and Cho, *Phytol Induces Apoptosis and ROS-Mediated Protective Autophagy in Human Gastric Adenocarcinoma AGS Cells*, *Biochem Anal Biochem* 2015;4:4
35. P. Thakor, R. B. Subramanian, S. S. Thakkar, A. Ray, V. R. Thakkar, *Phytol induces ROS mediated apoptosis by induction of caspase 9 and 3 through activation of TRAIL, FAS and TNF receptors and inhibits tumor progression factor Glucose 6 phosphate dehydrogenase in lung carcinoma cell line (A549)*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017;92:491-500
36. R. Huber, J. Romisch and E. P. Paques, *The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes*, *The EMBO Journal*, 1990;9(12):3867-3874
37. T. H. The, T. E. W. Feltkamp, *Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies: II. A reproducible method*, *Immunology*, 1970;18(6):875–881
38. H. Lecoeur, *Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases*, *Exp. Cell Res.*, 2002;277(1):1–14
39. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP?SID=srch-srp-P1304MP
40. R. Hingorani, J. Deng, J. Elia, C. McIntyre, D. Mittar, *Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System*, Application note, BD Biosciences, August 2011
41. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-5.aspx?geo_country=hr
42. M. Glumac, *Određivanje utjecaja farnezola i nerolidola na p38 MAPK stanični signalni put*, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, listopad 2018.

SLIKE PREUZETE SA:

Slika 1. https://www.rcsb.org/structure/1tnf (Preuzeto: 2. lipnja, 2019.)

Slika 2. https://hrcak.srce.hr/344 (Preuzeto: 7. kolovoza, 2019.)

Slika 3. https://www.researchgate.net/figure/Structural-comparison-of-initiator-and-effector-caspase-zymogens-A-procaspase-1-PDB_fig2_23715155
(Preuzeto: 3. rujna, 2019.)

Slika 4. https://www.researchgate.net/figure/The-crystal-structure-of-caspase-3-Positions-of-the-Met-residues-are-denoted-in-the_fig1_229074715
(Preuzeto: 17. lipnja, 2019.)

Slika 5. http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review
(Preuzeto: 21. lipnja 2019.)

Slika 6. http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/extrinsic-and-intrinsic-apoptosis-signal-pathway-review
(Preuzeto: 21. lipnja, 2019.)

Slik 7-10. Metode određivanja apoptoze u kulturi karcinomskih stanica, prof.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić
(Preuzeto: 2. kolovoza, 2019.)

Slika 11.
https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Accuri_C6Flow_Cyto_Instrument_Manual.pdf
(Preuzeto: 13. srpnja, 2019.)

Slika 12.
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/274666?lang=en&region=HR
(Preuzeto: 12. srpnja, 2019.)

Slika 13. https://www.researchgate.net/figure/Farnesol-structure-a-and-its-supplementation-effects with-different-doses-for-5-weeks_fig2_275725591 (Preuzeto: 19. lipnja, 2019.)

Slika 14. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30384444
(Preuzeto: 17. lipnja, 2019.)

Slika 15. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/89235?lang=en&region=HR
(Preuzeto: 21. lipnja, 2019.)

Slika 16. https://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/529/htm (Peruzeto: 2. kolovoza, 2019.)

Slika 17. http://www.chemfaces.com/natural/Phytol-CFN99630.html
(Preuzeto: 9. kolovoza, 2019.)

Slika 18. https://www.semanticscholar.org/paper/Phytol-induces-ROS-mediated-apoptosis-by induction-Thakor-Subramanian/437895a091bd3075f1c10c1ebfcce75e6660e505
(Preuzeto: 22. kolovoza, 2019.)

Slika 19. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC552154/ (Preuzeto: 30. srpnja, 2019.)

Slika 20. https://www.biologicscorp.com/fitc-labeling.html/#.XXnNbGtMTDc
(Preuzeto: 3. rujna, 2019.)

Slika 21. https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-fluorescence.html
(Preuzeto: 7. rujna, 2019.)

Slika 22. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4170?lang=en&region=HR (Preuzeto: 2. lipnja, 2019.)

Slika 23. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP?SID=srch-srp-P1304MP (Preuzeto: 19. kolovoza, 2019.)

Slika 24. R. Hingorani, J. Deng, J. Elia, C. McIntyre, D. Mittar, *Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System*, Application note, BD Biosciences, August 2011

Slika 25. Guohong Zhang, Vanessa Gurtu, Steven R. Kain and Guochen Yan, *Early Detection of Apoptosis Using a Fluorescent Conjugate of Annexin*, *BioTechniques*, 1997;23:525-531

Slika 27. S. K. Nayak, C. O´Toole, Z. H. Price, *A cell line from an anaplastic transitional cell carcinoma of human urinary bladder*, *Br. J. Cancer* 1977;35:142