Utjecaj timokinona na unutarstaničnu koncentraciju vodikovog peroksida kod staničnih linija karcinoma mokraćnog mjehura

Peašinović, Tomislav

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:167:296332

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

UTJECAJ TIMOKINONA NA UNUTARSTANIČNU KONCENTRACIJU VODIKOVOG PEROKSIDA KOD STANIČNIH LINIJA KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA

ZAVRŠNI RAD

TOMISLAV PEAŠINOVIĆ

Matični broj: 367

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

THE EFFECT OF THYMOQUINONE ON INTRACELLULAR CONCENTRATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN HUMAN BLADDER CANCER CELL LINES

BACHELOR THESIS

TOMISLAV PEAŠINOVIĆ

Parent number: 367

Split, September 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij kemije
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Nastavni predmet: Biokemija 1 i 2
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.
Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan
Pomoć pri izradi:

Tomislav Peašinović, 367

Sažetak: Timokinon je monoterpen pronađen u sjemenkama crnoga kima (*Nigella sativa* L.). Potječe iz jugoistočne Azije, koristio se u antičkoj Grčkoj, Srednjem istoku i Africi. Učinkovit je za liječenje gastroenteritisa, stanične upale i ima potencijala u liječenju karcinoma. Mnoga novija istraživanja potvrđuju citotoksičnost timokinona na stanične linije karcinoma.

Oksidacijski stres predstavlja stanje prekomjernog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta. Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih bioloških važnih molekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa.

Vodikov peroksid uključen je u različite puteve prijenosa signala. Ovisno o njegovoj unutarstaničnoj koncentraciji i lokalizaciji, H_2O_2 pokazuje pro- ili anti-apoptotičku aktivnost. U usporedbi s normalnim stanicama, stanice karcinoma karakterizirane su povišenom brzinom proizvodnje H_2O_2 i smanjenom redoks ravnotežom, čime se utječe na mikrookruženje kao i na anti-tumorski imuni odgovor.

Cilj ovog rada je ispitati kako timokinon utječe na koncentraciju vodikovog peroksida metodom ROS-Glo. ROS-Glo H_2O_2 je brz i osjetljiv test kojim se mjeri koncentracija vodikovog peroksida direktno u kulturi stanica. Vodikov peroksid je pogodan za ispitivanje jer ima najduži polu život od svih reaktivnih kisikovih spojeva u stanicama. Mjerenjem luminiscencije na spektrofotometru Synergy HTX S1LFA (BioTek, Winooski, VT, USA) mjerena je promjena koncentracije vodikova peroksida na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura T24 i TCCSUP.

Ključne riječi: timokinon, karcinom mokraćnog mjehura, reaktivni kisikovi spojevi, oksidacijski stres

Rad sadrži: 26 stranica, 22 slika, 40 literarnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Tea Bilušić - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Doc. dr. sc. Mila Radan - član-mentor

Datum obrane: 25.09.1019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BECHELOR THESIS

Faculty of Chemistry and Technology
Undergraduate study of chemistry
University of Split, Croatia

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Course title: Biochemistry 1 and 2
Thesis subject was approved by the Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.
Mentor: Mila Radan, assistant professor
Technical assistence:

THE EFFECT OF THYMOQUINONE ON THE CONCENTRATION OF HYDROGEN PEROXIDE ON HUMAN BLADDER CANCER CELL LINES

Tomislav Peašinović, 367

Summary: Thymoquinone is monoterpene found abundantly in black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds. It originated from Southeastern Asia and was also used in ancient Egypt, Greece, Middle East, and Africa. It is effective to treat gastroenteritis and various organs and cell-associated inflammation. Numerous recent studies explored its efficacy to inhibit cancer cells.

Oxidative stress represents the state of excessive formation of reactive oxygen species. Oxidation damage can affect the structure and function of numerous biologically important molecules (polyunsaturated lipids, carbohydrates, proteins, and nucleic acids), which ultimately results in changes in the structure and function of cells, tissues, and organs.

The aim of this study was to examine how thymoquinone affects the concentration of hydrogen peroxide by the method ROS-Glo. The ROS-Glo H_2O_2 assay is a homogeneous, rapid and sensitive luminescent assay that measures the level of hydrogen peroxide (H_2O_2) directly in cell culture. H_2O_2 is convenient assay because it has the longest half-life of all ROS in cultured cells. Luminescence was measured on Synergy HTX S1LFA (BioTek, Winooski, VT, USA) spectrophotometer. The change of hydrogen peroxide concentrations was detected in human bladder cancer cell lines ,T24 and TCCSUP.

Keywords: thymoquinone, bladder cancer, ROS, oxidation stress

Thesis contains: 26 pages, 22 figures, 40 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Tea Bilušić – PhD, full professor - chairperson
2. Franko Burčul – PhD, assistant professor- member
3. Mila Radan – PhD, assistant professor - supervisor

Defence date: 25.09.2019.

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan u vremenskom razdoblju od lipnja do rujna 2019.g.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mili Radan na stručnim savjetima i prenesenom znanju tijekom studiranja.

Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Franku Burčulu na uloženom trudu, razumijevanju i korisnim savjetima koje je nesebično podijelio sa mnom.

Mojoj dragoj obitelji i kolegama zahvaljujem na razumijevanju i moralnoj podršci, te neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.

SAŽETAK

Timokinon je monoterpen pronađen u sjemenkama crnoga kima (*Nigella sativa* L.). Potječe iz jugoistočne Azije, koristio se u antičkoj Grčkoj, Srednjem istoku i Africi. Učinkovit je za liječenje gastroenteritisa, stanične upale i ima potencijala u liječenju karcinoma. Mnoga novija istraživanja potvrđuju citotoksičnost timokinona na stanične linije karcinoma.

Oksidacijski stres predstavlja stanje prekomjernog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta. Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih bioloških važnih molekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa.

Vodikov peroksid uključen je u različite puteve prijenosa signala. Ovisno o njegovoj unutarstaničnoj koncentraciji i lokalizaciji, H_2O_2 pokazuje pro- ili anti-apoptotičku aktivnost. U usporedbi s normalnim stanicama, stanice karcinoma karakterizirane su povišenom brzinom proizvodnje H_2O_2 i smanjenom redoks ravnotežom, čime se utječe na mikrookruženje kao i na anti-tumorski imuni odgovor.

Cilj ovog rada je ispitati kako timokinon utječe na koncentraciju vodikovog peroksida metodom ROS-Glo™. ROS-Glo™ H_2O_2 je brz i osjetljiv test kojim se mjeri koncentracija vodikovog peroksida direktno u kulturi stanica. Vodikov peroksid je pogodan za ispitivanje jer ima najduži polu život od svih reaktivnih kisikovih spojeva u stanicama. Mjerenjem luminiscencije na spektrofotometru Synergy HTX S1LFA (BioTek, Winooski, VT, USA) mjerena je promjena koncentracije vodikova peroksida na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura T24 i TCCSUP.

Ključne riječi: timokinon, karcinom mokraćnog mjehura, reaktivni kisikovi spojevi, oksidacijski stres

SUMMARY

Thymoquinone is monoterpene found abundantly in black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds. It originated from Southeastern Asia and was also used in ancient Egypt, Greece, Middle East, and Africa. It is effective to treat gastroenteritis and various organs and cell-associated inflammation. Numerous recent studies explored its efficacy to inhibit cancer cells.

Oxidative stress represents the state of excessive formation of reactive oxygen species. Oxidation damage can affect the structure and the function of numerous biologically important molecules (polyunsaturated lipids, carbohydrates, proteins, and nucleic acids), which ultimately results in changes in the structure and function of cells, tissues, and organs.

Hydrogen peroxide is involved in various signal transduction pathways and cell fate decisions. Depending on its intracellular concentration and localization, H_2O_2 exhibits either pro- or anti-apoptotic activities. In comparison to normal cells, cancer cells are characterized by an increased H_2O_2 production rate and an impaired redox balance thereby affecting the microenvironment as well as the anti-tumoral immune response.

The aim of this study was to examine how thymoquinone affects the concentration of hydrogen peroxide by the method ROS-GloTM. The ROS-Glo™ H_2O_2 assay is a homogeneous, rapid and sensitive luminescent assay that measures the level of hydrogen peroxide (H_2O_2)directly in cell culture. H_2O_2 is convenient assay because it has the longest half-life of all ROS in cultured cells. Luminescence was measured on Synergy HTX S1LFA (BioTek, Winooski, VT, USA) spectrophotometer. The change of hydrogen peroxide concentrations was detected in human bladder cancer cell lines ,T24 and TCCSUP.

Key words: thymoquinone, bladder cancer, ROS, oxidation stress

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 2
2.1. Karcinomi – nekontrolirane promjene u stanici 2
2.2. Karcinom mokraćnog mjehura 2
2.2.1. Epidemiologija karcinoma mokraćnog mjehura u RH 5
2.2.2. Etiologija karcinoma mokraćnog mjehura 6
2.3. Stanične linije karcinoma 6
2.3.1. T24 6
2.3.2. TCCSUP 8
2.4. Biološki aktivni spojevi - terpeni 9
2.5. Timokinon 11
2.6. Oksidacijski stres 12
2.7. Slobodni radikali 12
2.8. Antioksidansi 16
3. EKSPERIMENTALNI DIO 18
4. REZULTATI 20
5. RASPRAVA 22
6. ZAKLJUČAK 23
7. LITERATURA 24

1. UVOD

Tijekom cijelog života zdrave stanice u našem organizmu kontrolirano se dijele i obnavljaju. Karcinom počinje kad se neka stanica izmjeni tako da se počne nekontrolirano umnožavati. Karcinom obuhvaća više od 100 bolesti kod koje dolazi do promjene na DNK. Temeljni uzrok svih vrsta karcinoma je promjena ili mutacija u staničnoj jezgri. Tumor je nakupina abnormalnih stanica, ali nisu svi tumori kancerozni. Dobroćudni, benigni poput pjegica ili madeža prestanu rasti, odnosno ne šire se na druge dijelove tijela i ne stvaraju nove tumore. Zloćudni, maligni tumori istisnu zdrave stanice, ometaju tjelesne funkcije i crpe hranjive tvari iz tjelesnih tkiva. Karcinom nastavlja rasti i širi se procesom zvanim metastaziranje. Tumori pokazuju nepravilan i progresivan rast. Nastajanje tumora ne događa se odjednom, već je to proces koji se sastoji od genotipskih i fenotipskih promjena. Tumori mogu biti benigni ili maligni. Razlika između njih je u agresivnosti rasta tj. u tome da maligni tumori metastaziraju šireći se u okolna zdrava tkiva preko krvožilnog sustava, dok benigni tumori ne stvaraju metastaze.

Karcinom mokraćnog mjehura čini oko 3% svih zloćudnih tumora, a muškarci obolijevaju 3 do 4 puta češće. Jedan od glavnih uzroka karcinoma je pušenje. Pušači obolijevaju 3 puta češće od nepušača. Kronične infekcije mjehura i izloženost štetnim tvarima također su jedni od uzročnika karcinoma mjehura. Proces nastanka karcinoma događa se na molekularnoj razini i obuhvaća oštećenje gena koje nastaje kao posljedica vanjskih kancerogenih faktora ili kao posljedica spontanih mutacija u organizmu. Tumorske stanice razlikuju se od normalnih stanica strukturno i funkcionalno. Tumorska masa stanica potječe od jedne jedine stanice u kojoj su se godinama nagomilavale razne genske mutacije odgovorne za reprodukciju i regulaciju rasta stanica. Klinička slika u 90 % bolesnika je bezbolna hematurija, a dijagnostika se vrši cistoskopom u nekim slučajevima i magnetskom rezonancom.[1]

2. OPĆI DIO

2.1. Karcinom

Izraz karcinom obuhvaća više od 100 bolesti koje pogađaju gotovo svaki dio organizma. Bolesti se razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji, kliničkoj slici i po načinu liječenja. Četiri glavne vrste raka su karcinomi, limfomi, sarkomi i leukemija. Svim vrstama karcinoma je zajedničko da nastaju od zdravih stanica.[1]

Zloćudne stanice nastaju zbog neadekvatnog odgovora zdrave stanice na razne signalne putove u organizmu. Promjena koja je odgovorna za zloćudnu pretvorbu stanica je genska mutacija. Mutacije povezane s nastankom karcinoma mogu se naslijediti, ali najčešće nastaju u somatskim stanicama kao posljedica djelovanja raznih mutagena. Biološki se stanica bori protiv mutacija tako da nastoji popraviti mutaciju. Ako stanica ne može popraviti mutaciju dolazi do programske smrti, odnosno apoptoze.[2]

Nastanak i progresija karcinoma povezani su i s epigenetskim promjenama, kao što je metilacija DNK. To su nasljedne promjene ekspresije gena koje nisu povezane s promjenama u slijedu baza DNK. Ulogu u nastanku i progresiji karcinoma imaju mikro-RNK (miRNK), koje sudjeluju u regulaciji ekspresije gena. Razvoj karcinoma povezan je i sa skraćivanjem kromosoma, telomera. Pokazalo se da je u 85-90% svih analiziranih stanica karcinoma, za razliku od većine zdravih stanica, aktivan enzim telomeraza koji omogućuje produljenje telomera, što stanicama karcinoma osigurava neograničen broj dioba.

Smatra se da samo matične stanice karcinoma mogu potaknuti razvoj novog karcinoma kad ih se presadi u novog domaćina. Otkriće matičnih stanica ima važne implikacije za liječenje karcinoma jer se smatra da samo lijek koji uništi sve matične stanice karcinoma može dovesti do izlječenja, čak i ako veliki broj drugih stanica karcinoma preživi.[3]

2.2. Karcinom mokraćnog mjehura

Mokraćni mjehur je vreća u mokraćnom traktu u koju se sprema mokraća nakon što je proizvedu bubrezi. Mjehur je obložen specijaliziranim prijelaznim stanicama i kad je nadražen stvaraju se dodatni slojevi prijelaznih stanica. Ovaj proces povećava vjerojatnost da prijelazna stanica postane kancerozna, a zatim se razmnožava da bi stvorila zloćudni tumor. Zloćudni

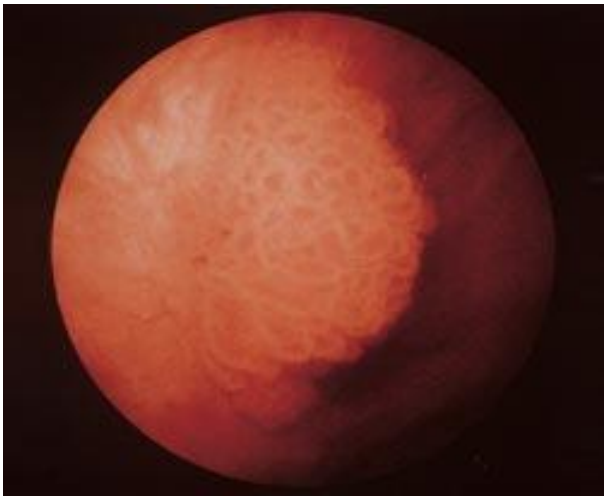
tumori započinju kao male površinske kvržice na unutrašnjoj stjenki mokraćnog mjehura. Karcinom se širi prodiranjem u mišić mjehura, uvlačeći se u okolno salo i tkivo. Ako se ne liječi napada krvotok i limfni sustav.[4]

Karcinom mokraćnog mjehura nastaje u urotelu. Urotel je prijelazni epitel koji oblaže iznutra gotovo cijeli urotrakt, sastoji se od 3 do 7 slojeva stanica sluznice na mišićnom mjehuru. Četvrti je najčešći tumor u muškaraca nakon karcinoma prostate, pluća i kolorektalnog karcinoma. Karcinom mokraćnog mjehura najzastupljeniji je između 67. i 70. godine starosti, a može biti prisutan u bilo kojoj životnoj dobi pa čak i u djece.[5]

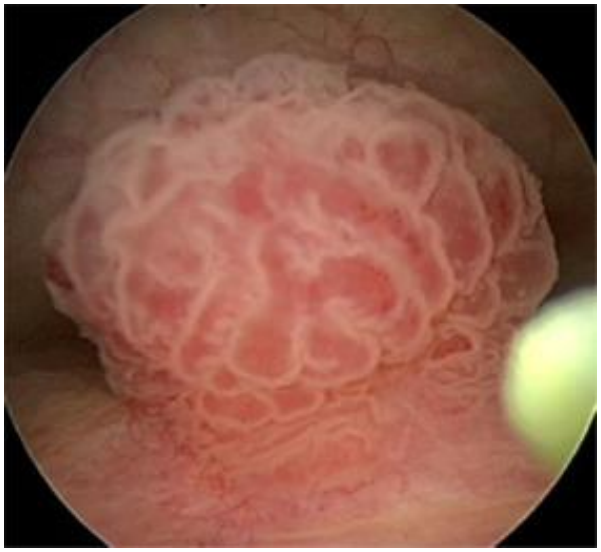
Pojava karcinoma mokraćnog mjehura je četiri puta veća kod muškarca nego kod žena. Kod muškaraca zauzima četvrto mjesto po pojavnosti. Klinička slika je u 90% bolesnika bezbolna hematurija. Učestalo mokrenje, urinoinfekcija i krvava mokraća jedni su od ranih simptoma bolesti. [4]

Liječenje se temelji na stupnju proširenosti bolesti. Razlikuje se pristup kod neinvazivnog i invazivnog karcinoma mokraćnog mjehura ili metastatske bolesti. Kod neinvazivnog oblika primjenjuje se Bacillus Calmette-Guerin (BCG) cjepivo ili mitomicin C.

U invazivnom obliku karcinoma osnovni oblik liječenja je radikalna cistektomija s neoadjuvantom kemoterapijom temeljenom na cisplatinu uz adjuvantnu kemoterapiju, ovisno o patohistološkoj slici, statusu limfnih čvorova i stadiju bolesti. Adjuvantna kemoterapija se primjenjuje nakon što se kirurškim putem odstrani primarni tumor s lokoregionalnim limfnim čvorovima. Neoadjuvantna kemoterapija se primjenjuje kao početni način liječenja sa osnovnom svrhom smanjenja tumora i prevođenja inicijalno neoparabilnog tumora u operabilno stanje. Metastatska bolest liječi se kemoterapijom i to prvom linijom gemcitabinom i cisplatinom, U slučaju prisutnih koštanih presadnica primjenjuju se i bifosfonati.[6,7] Na slikama 1. i 2. nalazi se spektroskopski i citoskopski prikaz karcinoma mokraćnog mjehura.



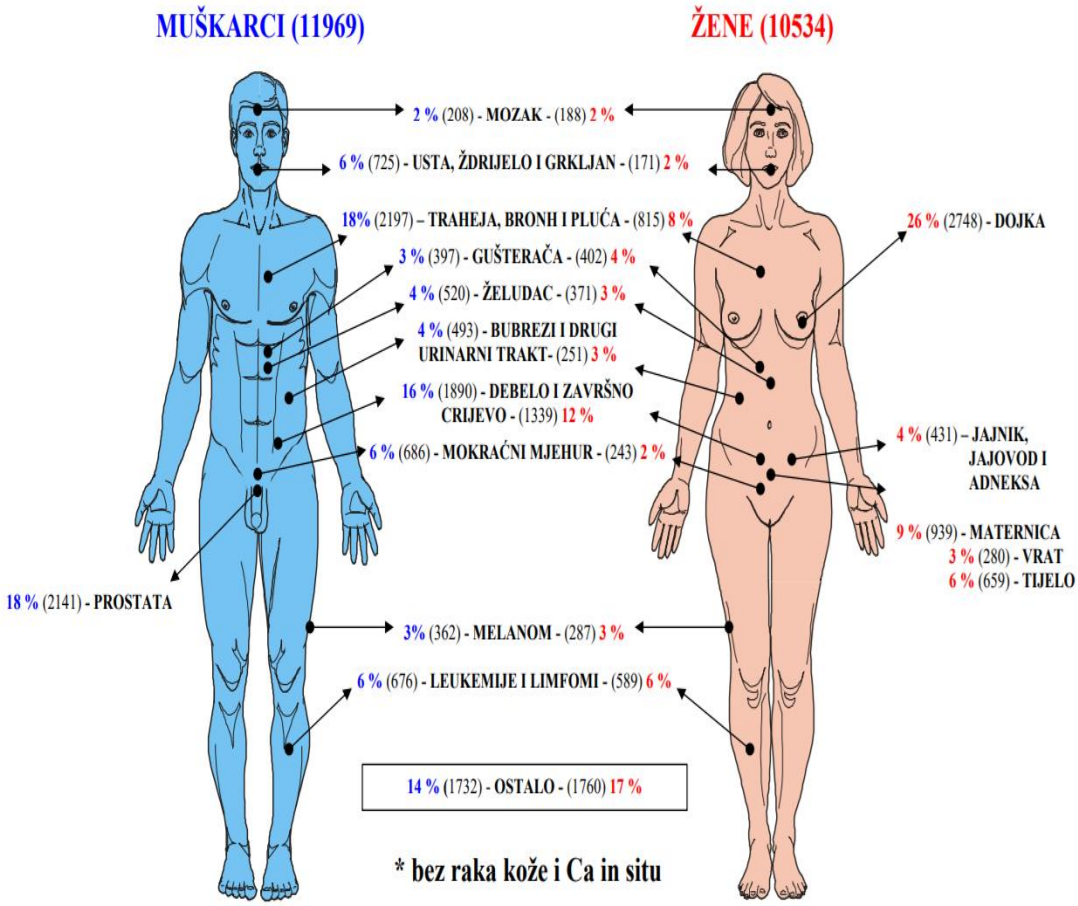
Slika 1. Spektroskopska detekcija karcinoma mokraćnog mjehura.[8]



Slika 2. Citoskopski prikaz karcinoma mokraćnog mjehura.[9]

2.2.1. Epidemiologija karcinoma mokraćnog mjehura u RH

Prema istraživanju i podacima iz Registra za rak, u Hrvatskoj 2015. godine, karcinom mokraćnog mjehura je 5. najčešći tumor kod muškaraca i zauzima 6% svih zloćudnih tumora (slika 3.). Prosječna dob bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura iznosi između 75-79 godina.[9] Na slici 3. je prikaz raspodjele novooboljenih od karcinoma prema sijelima u 2015. godini. Većina karcinoma je nazvana prema organu ili tipu stanice u kojoj su nastali, odnosno prema njihovom primarnom sijelu.[10]



Slika 3. Raspodjela novooboljenih od karcinoma prema sijelima u 2015. godini.[10]

2.2.2. Etiologija karcinoma mokraćnog mjehura

Pušenje je zaslužno za oko 50% tumora mokraćnog mjehura.[11] Osim pušenja, značajni faktori su izloženost različitim kemikalijama na radnom mjestu, kao što su aromatski amini, policiklički i klorirani ugljikovodici. Radnici koji su izloženi radu u industrijskim postrojenjima obrade boja, metala i nafte češće obolijevaju.[12] Područja pogođena industrijskim zagađenjem također pospješuju rast karcinoma.[13] Rizik za razvoj karcinoma uzrokuje i terapija ciklofosfamidom, ifosfamidom i radioterapija zdjelice.[14]

Za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura odgovorna su tri osnovna mehanizma:

- Mehanizam indukcije onkogena. Onkogen je izmijenjen gen koji normalnu stanicu transferira u maligni fenotip.
- Mehanizam inaktivacije supresorskog gena. Supresorski gen je gen koji regulira normalni stanični rast i diferencijaciju stanica, te sprečava nekontroliranu staničnu proliferaciju karakterističnu za tumorske stanice.
- Mehanizam prekomjerne aktivnosti gena koji regulira receptore čimbenika rasta. Prekomjerna aktivnost gena rezultira kroničnom staničnom proliferacijom koja uzrokuje karcinom.[15]

2.3. STANIČNE LINIJE KARCINOMA

2.3.1. T24

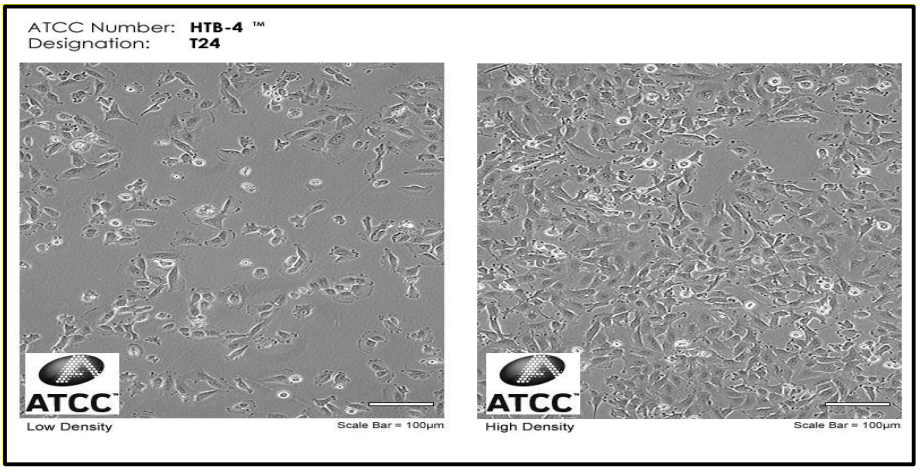
Besmrtna stanična linija koja je uzgojena iz tkiva mokraćnog mjehura oboljelog od karcinoma prijelaznih stanica.[16] Morfološki prijelazne stanice se nalaze na površini mjehura i čine izolacijski sloj koji odjeljuje mjehur od urina. Stanična linija T24 je adherentna linija te zahtijeva površinu na koju se može vezati za rast i razvoj.

Čuva se u 1,5 mM L-glutamina i 2200 mg/L natrijevog bikarbonata u kojeg je dodano 10% fetalnog goveđeg seruma. Generacijsko vrijeme za stanice ove linije je 19 sati. Čuvaju se pri temperaturi od 37°C i koncentraciji CO_2 od oko 5%. Mijenjanje hranjive podloge mora se vršiti 2 do 3 puta na tjedan. Precjepljivanje se vrši odsisavanjem medija te ispiranjem posude na koju su stanice učvršćene s otopinom 0,25% tripsina, 0,03% EDTA. Zatim se dodaje 1 do 2 mL

otopine tripsin-EDTA. Stanice se odvajaju od podloge pri sobnoj temperaturi. Dodaje se svježa hranjiva podloga nakon čega se stanice prenesu u novu posudicu gdje se one ponovno vežu za stijenke posude.[17] U tablici 1. se nalaze karakteristike T24 stanične linije. Mikroskopski prikaz stanične linije nalazi se slici 4.

Tablica 1. Karakteristike T24 stanične linije.

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	mokraćni mjehur
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznih stanica
Etnitet	Europeidi
Dob i spol	81., žena



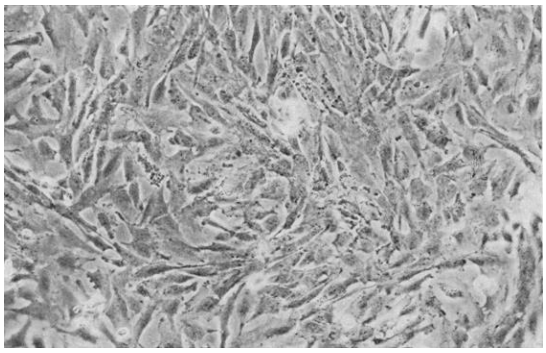
Slika 4. Stanice stanične linije T24.

2.3.2. TCCSUP

Uzgojena iz mokraćnog mjehura oboljelog od G4 karcinoma prijelaznih stanica. Adherentna je stanična linija pa im je za rast i razvoj potrebna podloga. Generacijsko vrijeme im je od 30 do 40 sati. Čuvaju 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. Rastu u atmosferi s oko 5% CO_2 i na temperaturi od 37 °C. Hranjiva podloga se mora zamijeniti 2 do 3 puta na tjedan. Precjepljivanje se vrši odsisavanjem hranjivog medija nakon čega se sloj stanica ispere otopinom 0,25% tripsina i 0,53 mM EDTA. Dodaje se 2 do 3 mL otopine tripsin-EDTA da se stanice odvoje od podloge. Nakon odvajanja stavlja se hranjiva podlogu. Stanice se prenose u novu posudu i stavljaju u inkubator. U tablici 2. se nalaze karakteristike TCCSUP stanične linije. Mikroskopski prikaz stanične linije nalazi se slici 5.

Tablica 2. Karakteristike TCCSUP stanične linije.

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	mokraćni mjehur
Forma proizvoda	Parna faza tekućeg dušika
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	4, stupanj karcinoma prijelaznih stanica
Dob i spol	67., žena



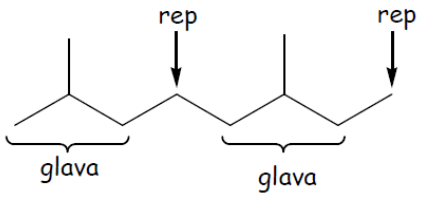
Slika 5. Stanice stanične linije TCCSUP.

2.4. Biološki aktivni spojevi - Terpeni

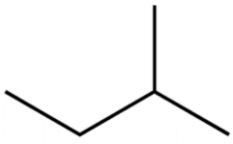
Terpeni su vrsta prirodnih hlapljivih spojeva od kojih uglavnom potječe miris biljaka. Opća formula je $(C_5H_8)_n$. Danas je poznato oko 30000 različitih terpena. Naziv „terpeni“ dobili su spojevi izolirani iz terpentina-hlapljive tekućine iz borova drveta. U vodi su netopljivi, dobivaju se kao destilat pri zagrijavanju biljnog materijala. Često se koriste u aditivima za hranu, parfumeriji i aromaterapiji. Za neke se misli da imaju ljekovita svojstva i pomažu u borbi protiv bakterija, gljivica i stresnog okoliša.

Izoprensko pravilo

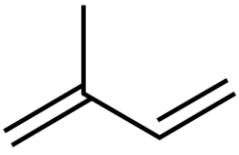
Većina terpenoida sastoji se od izoprenskih jedinica (slika 6.) povezanih po načelu „glava na rep" (slika 7.) tj. razgranati se završetak jedne terpenske jedinice veže za nerazgranati završetak druge. Lavoslav Ružička je utvrdio strukturnu jedinicu zajedničku svim terpenima. Pet ugljikovih atoma nađeni unutar spoja mogu se povezati sa strukturom molekule izoprena (slika 8.). (Nobelova nagrada u kemiji, 1939.g.).[19]



slika 6. Prikaz povezivanja načinom „glava na rep“



slika 7. Izoprenska strukturna jedinica



slika 8. Izopren

Biosinteza terpenoida

Terpenoidi su produkti mevalonskog biosintetskog puta, puta čiji je središnji međuprodukt mevalonska kiselina (MVA). Prekursor mevalonskog biosintetskog puta je acetil-koenzim A (MVA nastaje iz 3 molekule acetil-CoA). Izopren nije uključen u biosintezu terpenoida već biokemijski aktivna izoprenska jedinica - njegov pirofosfatni (difosfatni) ester, izopentenil-pirofosfat, (IPP).[17] U tablici 3. nalazi se podjela, odnosno klasifikacija terpenoida.

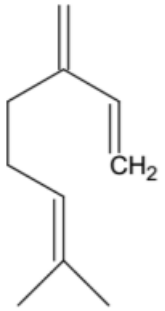
Tablica 3. Klasifikacija terpenoida

Naziv	**Broj C atoma**	**Broj izoprenskih jedinica**
Semiterpenoidi	C_5	1
Monoterpenoidi	C_{10}	2
Seskviterpenoidi	C_{15}	3
Diterpenoidi	C_{20}	4
Sesterterpenoidi	C_{25}	5
Triterpenoidi	C_{30}	6
Tetraterpenoidi	C_{40}	7
Politerpenoidi	$(C_5)_n$	n

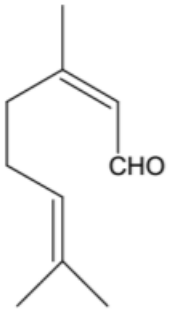
Monoterpeni

Monoterpeni su glavni sastojci eteričnih ulja koja se izoliraju iz aromatičnog i ljekovitog biljnog materijala. Hlapljivi su spojevi, male molekulske mase.[17]

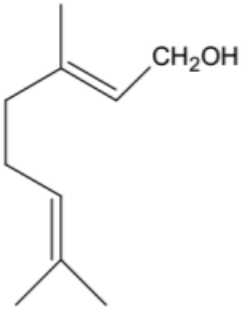
Ispod vidimo primjere monoterpena.



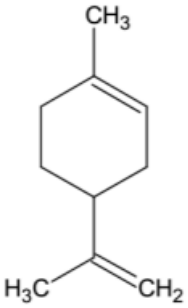
Slika 9. mircen



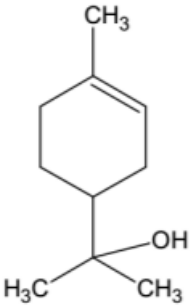
Slika 10. citral



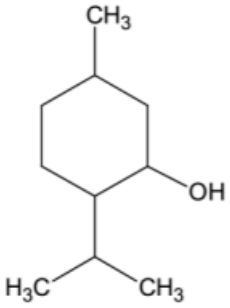
Slika 11. geraniol



Slika 12. limonen



Slika 13. terpineol

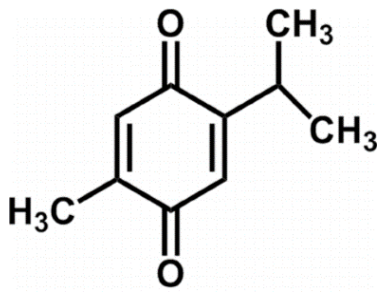


Slika 14. mentol

2.5. Timokinon (2-metil-5-izopropil-1, 4-benzokinon)

Timokinon je benzokinon pronađen u sjemenkama crnoga kima (*Nigella sativa* L.) koji raste u istočnoj i zapadnoj Aziji i istočnoj Africi. Pripada skupini monoterpena. Učinkovit je za liječenje gastroenteritisa, ima potencijala kod liječenja karcinoma te sprječava slabljenje imunološkog sustava. [18,19] Istraživanja su otkrila njegovu učinkovitost za ubijanje stanica karcinoma putem indukcije mehanizma apoptoze te da ima potencijal za smanjenje volumena karcinoma dojke, debelog crijeva, prostate, usta, kostiju, jetre i pluća i želuca upotrebom *in vivo* modela. [20,21] Sjemenke crnog kima koriste se i kod tretmana Alzheimerove bolesti i epilepsije.

Timokinon u kombinaciji s X-vezujućim inhibitorom apoptoze proteinom (XIAP) kod karcinoma dojke inducira apoptotske kaspaze-3, -7, -9. Apoptozu prati aktivacija skupine proteaza zvanih kaspaze, a signal za pokretanje kaskadne reakcije kaspaza može doći izvana ili iz same stanice. Apoptotske kaspaze su zaslužne za uništenje stanice u procesu programirane stanične smrti. Postoji ukupno 15 kaspaza. Njih 7 sudjeluje u apoptozi, dok ostale imaju uloge u upalnim i ostalim procesima.[22] Na slici 15. je strukturni prikaz molekule timokinona.



Slika 15. Timokinon

2.6. Oksidacijski stres

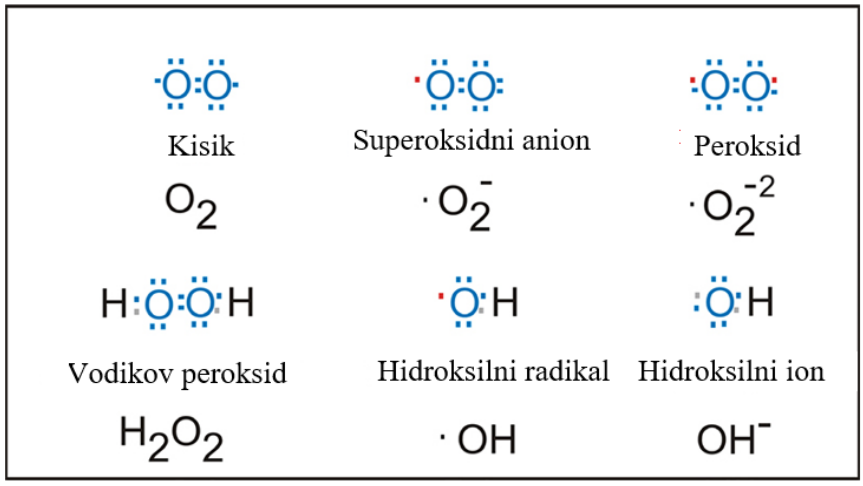
Reaktivni kisikovi spojevi (*engl*. reactive oxygen species, ROS) nastaju aerobnim metaboličkim procesima poput respiracije u mitohondrijima te fotosintezom u kloroplastima. Povećane koncentracije ROS-a u organizmu mogu dovesti do oštećenja staničnih struktura, poremećaja u staničnom metabolizmu te njegovoj regulaciji.[22]

Prekomjerno stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (slika 16.) nazivamo oksidacijski stres, pri čemu dolazi do narušavanja ravnoteže između antioksidansa i ROS.

Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih bioloških važnih molekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja. Oksidacijski stres povezuje se sa starenjem i bolestima, uključujući karcinom, multiplu sklerozu, Parkinsovu bolest i Alzheimerovu bolest kao i autoimune bolesti.[23]

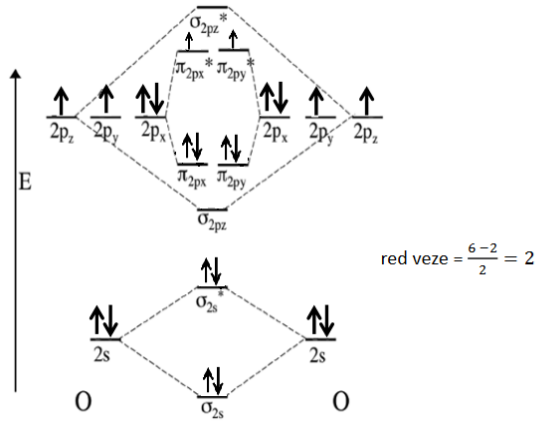
2.7. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona koji su odgovorni za nestabilnost i reaktivnost radikala. Mogu nastati u stanici putem endogene prirode kao što je upala, stres, ishemija, različite vrste infekcija, kancerogeneza te starenje. Također ROS se u organizmu može generirati djelovanjem lijekova (ciklosporin, takrolimus), teških metala, opijata, različitih tipova zračenja te zagađenja.[24]



Slika 16. Reaktivni kisikovi spojevi.

Kisik je podložan stvaranju slobodnih radikala zbog elektronske konfiguracije. Crtajući dijagram molekulskih orbitala vidimo da kisiku preostaju po dva nesparena elektrona u protuveznim π orbitalama (slika10.).[25]



Slika 17. Prikaz molekulskih orbitala kisika.

Male količine ROS-a svakodnevno se stvaraju u organizmu. Najveća količina nastaje u mitohondrijskom respiracijskom lancu. Koenzim Q i kompleks III najvjerojatnije su glavna mjesta gdje elektroni „pobjegnu“ i dolaze u interakciju s molekularnim kisikom dajući superoksidni anion. Reakcija gdje se događa redukcija molekularnog kisika u superoksid je nastajanje ubisemikinona iz ubikinona.[26] Drugi po redu najvažniji izvor ROS-a je lanac transporta elektrona u endoplazmatskom retikulumu i peroksisomima.[27] Nakupljanju ROS-a pridonosi i oksidacija dopamina, odnosno propadanje dopaminergičkih neurona, osobito kod Parkinsonove bolesti.[28]

Slobodni radikali imaju i pozitivne uloge kao što su važnost u imunološkom odgovoru, proliferaciji stanica, metabolizmu prostaglandina, aktivaciji staničnih receptora, regulaciji vaskularnog tonusa, kontroli oksigenacije te utjecaj na eritropoezu. Produkcija ROS-a događa se i uz nefagocitnu NADPH oksidazu te ima ulogu u kaskadi stanične signalizacije u fibroblastima, endotelnim stanicama, miocitima, stanicama glatkih mišića te tiroidnom tkivu.[29]

Ako se reakcijskih kisikovih spojeva stvara u prekomjernim količinama, a njihovo uklanjanje nije dovoljno učinkovito, može doći do oksidacije i oštećenja svake organske molekule. Oštećenje DNA uzrokuje mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji.[30]

Vodikov peroksid

Kisik je snažno oksidacijsko sredstvo. Reakcija potpune redukcije kisika ima veliki redukcijski potencijal (približno 0,8 V), premda je za nju potrebna i velika energija aktivacije. Stoga je reakciju poput one u respiratornom lancu u mitohondrijima relativno teško postići:

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$$

Molekula kisika u osnovnom stanju ima dva nesparena elektrona. Primanjem jednog elektrona nastaje superoksidni radikal (O_2^-), a primanjem sljedećeg elektrona nastaje O_2^{2-} koji protoniranjem prelazi u vodikov peroksid (H_2O_2):

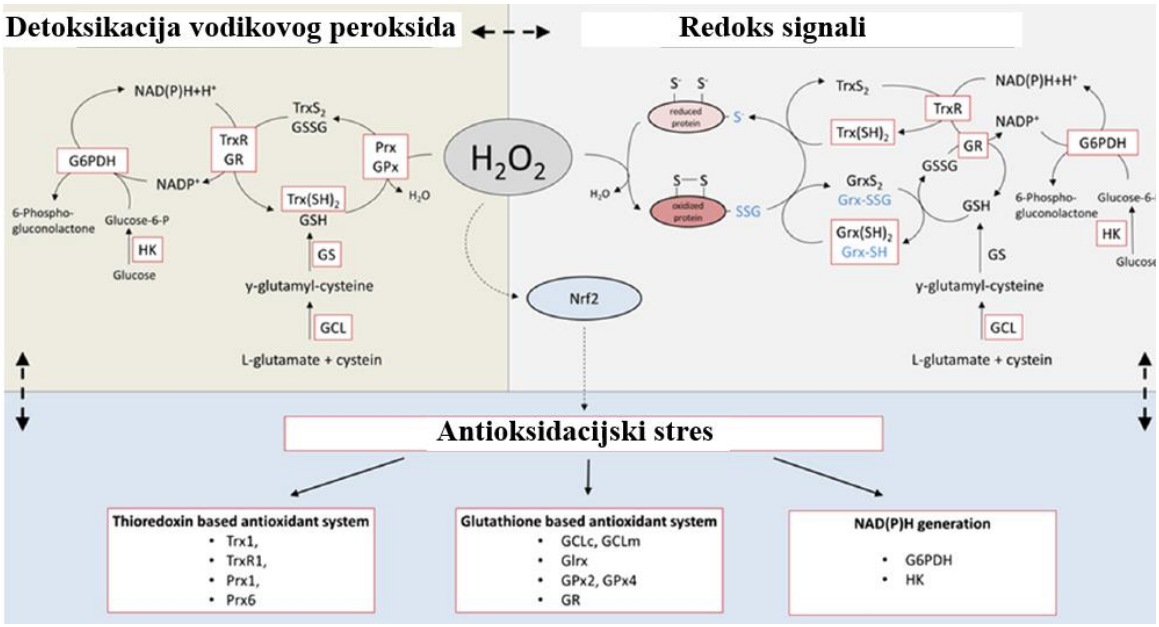
$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$$
$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Vodikov peroksid uključen je u različite puteve prijenosa signala, proliferaciju i odluke stanične sudbine. Time se vodikov peroksid više ne smatra nepoželjnim toksičnim bioproduktom te može inducirati apoptozu. Ovisno o njegovoj intrastaničnoj koncentraciji i lokalizaciji, H_2O_2 pokazuje bilo pro- ili anti-apoptotičke aktivnosti. Povećana razina ROS-a može promicati preživljavanje i proliferacijske puteve kao i metaboličke prilagodbe tumorskih stanica u tumorsku okolinu. U usporedbi s normalnim stanicama, stanice karcinoma karakterizirane su povišenom brzinom. proizvodnje H_2O_2 i smanjenom redoksnom ravnotežom, čime se utječe na mikrookruženje kao i na anti-tumoralni imuni odgovor.[31] Na slici 18. je prikaz signalnih puteva vodikovog peroksida, njegova detoksikacija i redoks signali.

Superoksidni radikal u vodenim je medijima poput citoplazme slabi oksidans, a snažnije je redukcijsko sredstvo koje može reducirati željezne komplekse poput citokroma c.
Vodikov peroksid nastaje kao proizvod djelovanja urat oksidaze, glukoza oksidaze, D-aminokiselinske oksidaze, ili superoksid dismutaze (SOD). Vodikov peroksid lako može prolaziti kroz staničnu membranu, a u prisutnosti iona prijelaznih metala stvara vrlo reaktivne slobodne radikale. Unutar stanice slobodni kisikovi radikali mogu nastati tijekom uobičajenih staničnih procesa, ili mogu biti inducirani određenim egzogenim tvarima. Stoga izvore superoksidnog radikala možemo podijeliti na enzimske (tijekom katalitičkih reakcija NADPH oksidaze, NADPH-P450 reduktaze, ksantin oksidaze, superoksid dismutaze), stanične (radom makrofaga, leukocita, u respiratornom lancu, djelovanjem mikrosomalne oksigenaze), te na izvore nastale djelovanjem okruženja (UV-svjetlo, X-zrake, toksične kemikalije, aromatski nitro spojevi i drugo).[32] U tablici 4. nalaze se reaktivni kisikovi spojevi.

Tablica 4. Reaktivni kisikovi spojevi

Slobodni radikali	**Čestice koje nisu slobodni radikali**
superoksidni, O_2^-	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroksilni, OH•	hipokloritna kiselina, HClO
peroksilni, ROO•	ozon, O_3
alkoksilni, RO•	singletni kisik, O_2
hidroperoksilni, HO_2•	



Slika 18. Signalni putevi vodikovog peroksida.[31]

2.8. Antioksidansi

Antioksidans je kemijska tvar koja usporava ili sprječava oksidaciju nekog supstrata. Pri tome je njezina koncentracija značajno manja od koncentracije supstrata.[33]

Razlikujemo dva glavna mehanizma koji opisuju djelovanje antioksidansa:

Prvi mehanizam je sprječavanje stvaranja slobodnih radikala iz drugih molekula ili pretvaranje postojećih u manje štetne čestice, prije nego one započnu svoje djelovanje.

Antioksidansi koji djeluju po tom mehanizmu nazivaju se primarni antioksidansi. primarni antioksidansi djeluju tako da predaju radikal vodika (H•) peroksil- i alkoksil- radikalima, koji su nastali u fazi propagacije reakcije autooksidacije.[34,35]

Slobodni radikal koji nastaje ne može odcijepiti radikal vodika i započeti autooksidaciju. On može reagirati s drugim peroksil- i alkoksil radikalima pri čemu nastaju stabilni produkti.[36]

Mehanizam djelovanja antioksidansa je sljedeći:

$$AH + ROO\bullet \rightarrow ROOH + A\bullet$$

$$AH + RO\bullet \rightarrow ROH + A\bullet$$

$$A\bullet + RO\bullet \rightarrow ROA$$

$$A\bullet + ROO\bullet \rightarrow ROOA$$

Drugi mehanizam djelovanja antioksidansa uključuje hvatanje slobodnih radikala koji sprječavaju lančanu reakciju. Hvatanje slobodnih radikala postiže se vezivanjem iona metala, uklanjanjem O_2 iz sustava regeneracijom primarnog antioksidansa ili pak deaktiviranjem vrsta s visokim sadržajem energije. Antioksidansi koji djeluju to tom mehanizmu nazivaju se sekundarni antioksidansi. U toj skupini nalaze se vitamin E, vitamin C, β-karoten, mokraćna kiselina, bilirubin i albumin.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

ROS-Glo™ test

Vodikov peroksid je pogodan za ispitivanje jer ima najduži poluživot od svih reaktivnih kisikovih spojeva u stanicama. Mnogi reaktivni kisikovi spojevi prelaze u H_2O_2. Superoksid dismutaza pretvara superoksid u O_2 i H_2O_2. Medij se iskoristi da direktno reagira s H_2O_2 koji generira luciferin u prekursor. Enzim luciferin reagira s otopinom za detekciju i stvara signal svjetlosti koji je proporcionalan koncentraciji H_2O_2. Luminiscencija je količina svjetlosti koju zrači neko tijelo. Intenzitet luminiscencije izražava se u kandelama po kvadratnom metru (cd/m2).

Prednosti ROS ispitivanja

- Ispitivanje se može provesti na raznim staničnim linijama
- Trajanje cijelog postupka može trajati manje od 2 sata
- Ispitivanje se može temeljiti na stanicama i enzimskim formatima

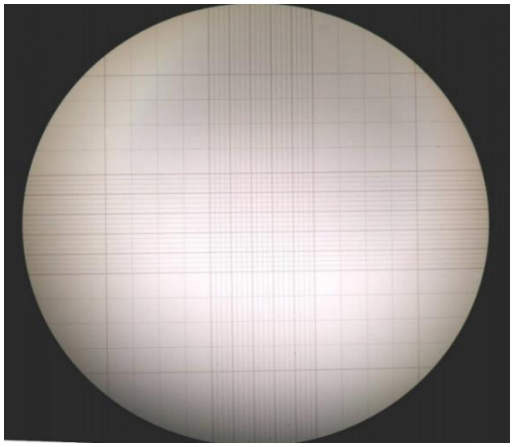
Opis rada

Nakon odmrzavanja, stanične linije su uzgojene u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 95% zraka i 5% CO_2, u posebnoj sredini ili mediju (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) mediju (slika 19.). DMEM medij sadrži potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline, minerali te goveđi serum. Optimalna temperatura za uzgoj stanica ovisi o temperaturi izvornog organizma čije se stanice koriste za uzgoj. Preporučena temperatura za uzgoj staničnih linija toplokrvnih ogranizama je 37 °C. Optimalni pH za rast većine stanica je 7,4. Većina stanica prestaje rasti kad se pH spusti na 6,5, a stanice gube sposobnost za život između pH vrijednosti 6,5 i 6,0. Povišenje temperature uzrokovat će denaturaciju proteina i potencirati staničnu smrt, dok sniženje temperature neće uzrokovati oštećenje stanica, ali će utjecati negativno na razmnožavanje. Postupak započinje uklanjanjem medija za uzgoj iz jažica. Gornji sloj se odsisava pipetom. Mrtve stanice ne ostaju priljubljene uz zdjelicu te tako radimo odvajanje mrtvih stanica od živih stanica koje ostaju prilijepljene uz samu zdjelicu. Živim stanicama dodaje se fosfatni pufer (eng. *Phosphate-Buffered Saline*, pH=7.4). Stanice koje su adherirale na podlogu, nakon uklanjanja DMEM-a, tretiraju se tripsinom, enzimom koji cijepanjem

peptidnih veza omogućuje odvajanje stanica od podloge. Stanice je prije eksperimenta potrebno prebrojati kako bi se znao broj stanica s kojima se raspolaže, odnosno kako bi se mogao od ukupnog broja stanica preračunati i uzeti broj stanica koji je potreban u eksperimentu. Nakon homogenizacije uzorak se pomiješa se s tripan-plavom otopinom te se tako pripremljen uzorak nanosi na Neubauerovu komoricu za brojanje. Pod mikroskopom se određuje broj živih stanica dok se mrtve stanice zbog oštećene membrane oboje u plavo. Komorica je podijeljena na 4 velika kvadrata, a u svakom velikom kvadratu nalazi se 16 malih kvadratića u kojima se broje stanice (slika 20.). Žive stanice vide se kao bijele točkice. Nakon izračunavanja broja stanica u uzorku, stanice se razrjeđuju te popunjavamo jažice. U svakoj jažici je po 10 000 stanica sa 100µL MEM medija s 10% FBS-a. Pločica se inkubira 3 sata pri 37°C uz 95% zraka i 5% CO_2. Nakon inkubacije medij se ukloni. 80 µL MEM medija, 0,5 mM piruvata, 20 µL H_2O_2 puferske otopine koja sadrži 125 µM H_2O_2 medija, bez timokinona ili s 20 µM timokinona, dodaje je se u jažice sa stanicama. Jažice se vraćaju u inkubator na 2 sata. Zatim se u jažice dodaje 100 µL otopine za detekciju. Pločicu ostavljamo na sobnoj temperaturi 20 min prije nego se mjeri luminiscencija na spektrofotometru Synergy HTX S1LFA (BioTek, Winooski, VT, USA).



Slika 19**.** Uvjeti rada inkubatora.



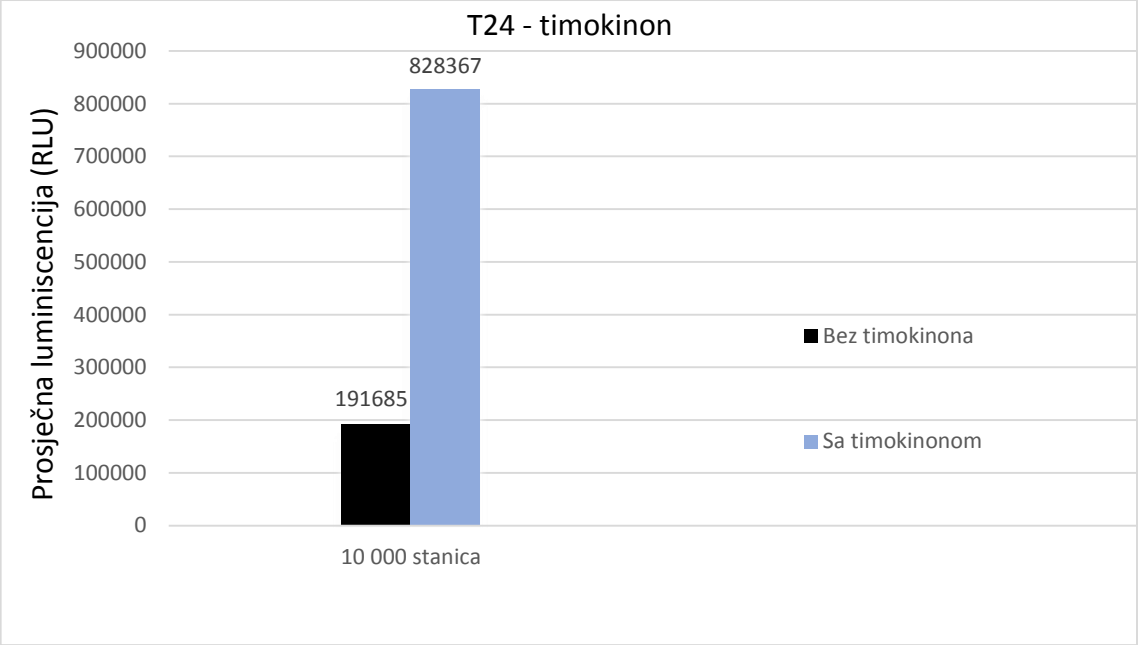
Slika 20. Ugravirana mrežica za brojanje.

Priprema otopine za detekciju

Broj jažica	Luciferin – detekcija	D-cistein	Pojačivač signala
10	1 mL	10 µL	10 µL

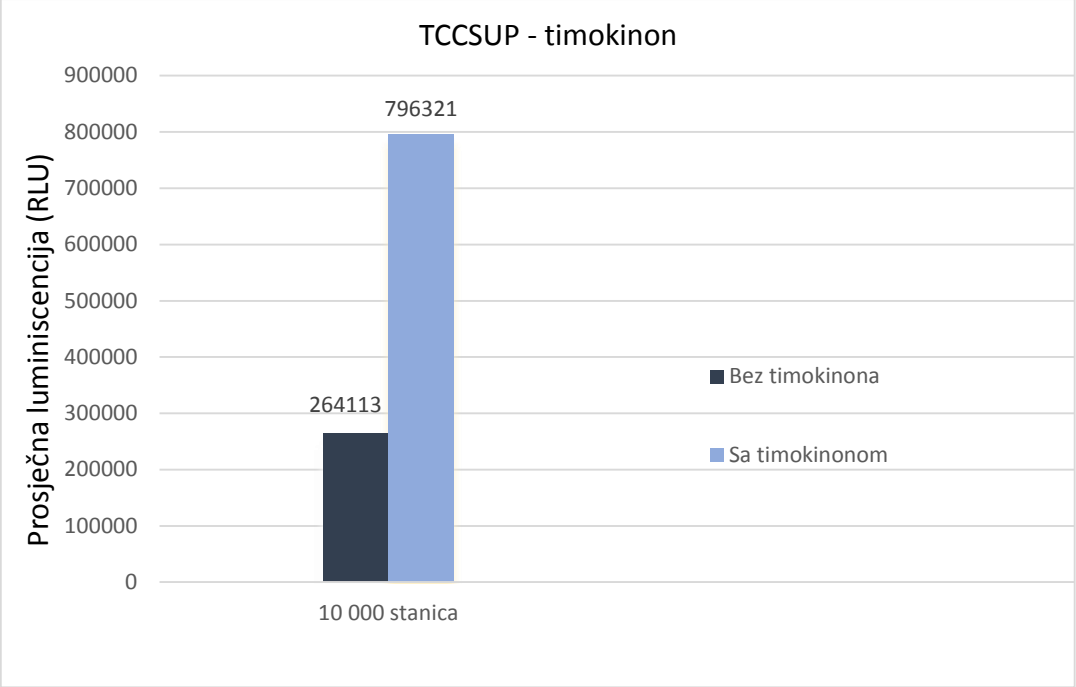
4. REZULTATI

Rezultati mjerenja utjecaja timokinona na nastanak vodikovog peroksida kod stanica karcinoma mokraćnog mjehura T24 i TCCSUP prikazani su na slikama 21. i 22.



Slika 21. Utjecaj timokinona na nastanak vodikovog peroksida kod stanične linije T24.

Iz grafičkog prikaza vidljivo je da timokinon uzrokuje oksidacijski stres kod stanične linije T24 porastom koncentracije vodikovog peroksida. Povećanje vodikovog peroksida izmjereno je pomoću luminiscencije. Kod stanične linije T24 koncentracija vodikovog peroksida četiri je puta viša u odnosu na kontrolu (uzorak bez timokinona).



Slika 22. Utjecaj timokinona na nastanak vodikovog peroksida kod stanične linije T24.

Iz grafičkog prikaza vidljivo je da timokinon uzrokuje oksidacijski stres kod stanične linije TCCSUP te povećava koncentraciju vodikovog peroksida. Povećanje vodikovog peroksida izmjereno je pomoću luminiscencije. Kod stanične linije TCCSUP koncentracija vodikovog peroksida četiri je puta viša u odnosu na kontrolu (uzorak bez timokinona).

Iz rezultata je vidljivo da je kod stanične linije T24 nastalo nešto više vodikovog peroksida nego kod stanične linije TCCSUP.

5. RASPRAVA

MTT-testom je potvrđeno da timokinon posjeduje dobro antiproliferacijsko djelovanje te se ovim radom nastojala utvrditi njegova uloga u nastajanju vodikovog peroksida u stanici.Uloga ROS-a u zaštiti od karcinoma polako ulazi u središte pozornosti. Istraživanja su naglasila važnost slobodnih radikala u upravljanju različitim vrstama onkogenih procesa. Iz literature je poznato da timokinon inducira apoptozu koristeći mitohondrijski put te ubrzava oksidacijski stres.[37] U malignim stanica proizvodi reaktivne kisikove spojeve, povećava cijepanje DNK, vrši indukciju autofagije. ROS spojevi tako utječu na ERK i JNK fosforilaciju u ljudskim staničnim linijama karcinoma debelog crijeva.[38] Pokazuje antikancerogenu aktivnost u akutne limfatične leukemije (CEMss) putem višestrukih mehanizama kao što je apoptoza mitohondrijske disfunkcije.Timokinon je pokazao citotoksično djelovanje i sprječava proliferaciju staničnih linija karcinoma prostate PC-3 putem manganove superoksid dismutaze i glutation *S*-transferaze (GSTp1).[39] Pokusi supresije gena su pokazali da glavnu ulogu ima kaspaza-3, u slučaju njene supresije apoptoza nije moguća. Prihvatljiva doza unosa timokinona za ljude je 0.6 mg/kg/dan, no neka istraživanja kažu da nema nuspojava niti kod konzumacije 10–100 mg/kg/dan.[40] Pri malim koncentracijama postaje antioksidans, a pri velikim koncentracijama potiče ROS. Da bi bolje razumjeli diferencijalne stanične učinke timokinona, *in vitro*, *in vivo* i *in silico* proučavanje treba provoditi na proteomskoj i genomskoj razini. Daljnja istraživanja trebala bi se fokusirati na pronalazak što boljih derivata timokinona. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da timokinon zavrjeđuje daljnja istraživanja kako bi se došlo do spojeva koji su odgovorni za antiproliferativno djelovanje, posebno u liječenju karcinoma mokraćnog mjehura.

6. ZAKLJUČAK

- Mnoge stanice karcinoma karakterizirane su unutrašnjim povećanjem ROS-a koji je rezulat procesa maligne transformacije.
- Vodikov peroksid pri višim koncentracijama može potaknuti rast novih tumorskih stanica, odnosno tumorigenezu. Međutim, prostorno lokalizirane razine vodikovog peroksida potiču citotoksičnost koja dovodi do stanične smrti.
- Timokinon generira vodikov peroksid kod stanične linije T24 i TCCSUP.
- Kod stanične linije T24 izmjerena je veća koncentracija vodikovog peroksida nego kod stanične linije TCCSUP.
- Timokinon inducira apoptozu tako što uzrokuje oksidacijski stres pokrenut od reakcijskih kisikovih spojeva. Pokazuje citotoksično djelovanje i dobru antiproliferativnu aktivnost.

7. LITERATURA

1. Vrdoljak E., Šamija M., Kusić Z., Petković M., Gugić D., Krajina Z., *Biologija raka: Genska osnova raka.* In: Raič A, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. p. 1–2.
2. Bešlija S., Vrbanec D.; Medicinska/internistička onkologija*; Karcinogeneza ili nastanak raka;* Medicinki fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, 2014. 7-9
3. Vrdoljak E., Šamija M., Kusić Z., Petković M., Gugić D., Krajina Z.; Klinička onkologija; Biologija raka; Medicinska naklada, Zagreb, 2013. 1-13
4. American Cancer Society. *American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016.* 2016.
5. *Vrdoljak E., Šamija M., Kusić Z., Petković M., Gugić D., Krajina Z.; Klinička onkologija; Tumori mokraćnog sustava*; Medicinska naklada, Zagreb, 2013. 143-149
6. Vrdoljak E., Šamija M., Kusić Z., Petković M., Gugić D., Krajina Z. *Tumori mokraćnog sustava. Tumori bubrežne nakapnice, mokraćovoda i mokraćnog mjehura.* In: Anđa Raič, editor. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. 146–8.
7. URL: https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/27160/Kemoterapija-u-lijecenju-zlocudnih-bolesti.html
8. URL: https://www.photonics.com/Articles/Raman_spectroscopy_detects_bladder_cancer/a42778) (24.9.2018)
9. URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128099391000072 (24.9.2018)
10. Šekerija M, Bubanović L, Novak P. *Registar za rak.* 2016. In: Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2016 godinu [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 283-5.
11. URL: https://www.hzjhttps://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2014_final.pdfz.hr)
12. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. Jama. 2011;306(7):737-45. 32
13. Westhoff E, Maria de Oliveira-Neumayer J, Aben KK, Vrieling A, Kiemeney LA. *Low awareness of risk factors among bladder cancer survivors: New evidence and a literature overview. European journal of cancer* (Oxford, England : 1990). 2016;60:136-45.
14. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. *Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. European urology*. 2013;63(2):234-41.

15. Fernandez MI, Lopez JF, Vivaldi B, Coz F. *Long-term impact of arsenic in drinking water on bladder cancer health care and mortality rates 20 years after end of exposure. The Journal of urology*. 2012;187(3):856-61.

16. Ferris J, Berbel O, Alonso-Lopez J, Garcia J, Ortega JA. *Environmental non-occupational risk factors associated with bladder cancer. Actas urologicas espanolas.* 2013;37(9):579-86.

17. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Transitional_cell_carcinoma (24.9.2018)

18. URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-4.aspx?geo_country=hr#generalinformation (24.9.2018)

19. URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-5.aspx?geo_country=hr#culturemethod

20. Stanley H. Pine. *Organska kemija*; Školska knjiga, Zagreb, 1994. 866-870

21. Radonić A., *Prirodni organski spojevi*, prezentacija, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2014.

22. Muhammad Imrana, Abdur Raufb, Imtiaz Ali Khanc, Muhammad Shahbazd, Tahira Batool Qaisranie, Sri Fatmawatif, Tareq Abu-Izneidg, Ali Imranh, Khaliq Ur Rahmanb, Tanweer Aslam Gondali. *Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review*

23. Salomi MJ, Nair SC and Panikkar KR: *Inhibitory effects of Nigella sativa and saffron (Crocus sativus) on chemical carcino- genesis in mice. Nutr Cancer* 16: 67-72, 1991.

24. Tiruppur Venkatachallam SK, Pattekhan H, Divakar S and Kadimi US: *Chemical composition of Nigella sativa L. seed extracts obtained by supercritical carbon dioxide*. J Food Sci Technol 47: 598-605, 2010.

25. Lei X, Lv X, Liu M, Yang Z, Ji M, Guo X and Dong W: *Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracilinduced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun* 417: 864-868, 2012.

26. Gali-Muhtasib H, Roessner A and Schneider-Stock R: *Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources. Int J Biochem Cell Biol* 38: 1249-1253, 2006

27. Held P. An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in cells. BioTek Instruments Inc., Application Guide. 2012; 1-2.

28. Lushchak VI. *Enviromentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology.* 2011; 101: 13-30.

29. Apel K, Hirt H. *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology*. 2004; **55**: 373-399.

30. Lushchak VI. Enviromentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology. 2011; **101**: 13-30.

31. Dröge W. *Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews.* 2002; **82**: 47-95.

32. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. *Regulation of gene expression by reactive oxygen. Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1999; **39**: 67-101.

33. Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. *Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2000; **20**: 2175-2183.

34. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*. 2000; 108: 652-659.

35. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. *The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review*. Stem Cells and Development. 2015; 24: 1150-1163.

36. Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Ludger A. Wessjohann2 and Seliger B. *Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells*

37. Štefan L., Tepšić T., Zavidić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R.; *Lipidina peroksidacija – uzroci i posljedice*

38. Malhotra JD, Kaufman RJ. *Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?. Antioxidants & Redox Signaling*. 2007; 9(12): 2277-2294.

39. Luo Y, Roth GS. *The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration. Antioxidants and Redox Signaling*. 2000; **2**: 449-460.

40. Sies H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*, PMID 9129943, Exp Physiol 82 (2), 1997., 291 – 5.