Utjecaj nerolidola na nivo unutarstaničnog kalcija kod stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura (TCCSUP)

Grubišić, Antonio Ćiril

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:167:898441

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

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

UTJECAJ NEROLIDOLA NA NIVO UNUTARSTANIČNOG KALCIJA KOD STANIČNE LINIJE KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA (TCCSUP)

ZAVRŠNI RAD

Antonio Ćiril Grubišić

Matični broj: 372

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

UTJECAJ NEROLIDOLA NA NIVO UNUTARSTANIČNOG KALCIJA KOD STANIČNE LINIJE KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA (TCCSUP)

ZAVRŠNI RAD

Antonio Ćiril Grubišić

Matični broj: 372

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

EFFECT OF NEROLIDOL ON THE LEVEL OF INTRACELLULAR CALCIUM IN BLADDER CARCINOMA CELL LINE (TCCSUP)

BACHELOR THESIS

Antonio Ćiril Grubišić

Matični broj: 372

Split, rujan 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet Split
Preddiplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Nastavni predmet: Biokemija I i II
Tema rada: je prihvaćena na XIX. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: doc.dr.sc. Mila Radan
Pomoć pri izradi: prof.dr.sc.Vedrana Čikeš Čulić, mag.chem.Mateo Glumac

UTJECAJ NEROLIDOLA NA NIVO UNUTARSTANIČNOG KALCIJA KOD STANIČNE LINIJE KARCINOMA MOKRAĆNOG MJEHURA (TCCSUP)

Antonio Ćiril Grubišić, 372

Sažetak:

Kalcij je najobilniji mineral u ljudskom tijelu. 99% kalcija u tijelu se nalazi u kostima i zubima dok se ostalih 1% nalazi u krvi i mekom tkivu. Tih 1% ima važnu ulogu u biološkim procesima i njegova koncentracija u stanicama je strogo regulirana paratireoidnim hormonom i kalcitriolom. U stanici se nalazi u većim koncentracijama u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu koji služi kao unutarstanično skladište za tijesnu regulaciju njegove koncentracije. Izvanstanični kalcij služi kao regulator razlike potencijala u staničnim membranama.

Nerolidol je seskviterpenski alkohol prisutan u mnogim eteričnim uljima različitih biljaka cvjetnog mirisa. Zbog njegove prisutnosti u čovjekovoj svakodnevnici znanstvenici su se zainteresirali za ispitivanje njegovih bioloških svojstava. Razni utjecaji nerolidola na tumorske stanice već su ispitani i dali su zanimljive rezultate potičući daljna istraživanja.

Zanimljivo je ispitati utjecaj nerolidola na koncentraciju unutarstaničnog kalcija kod raznih vrsta tumorskih stanica. Poremećaji u regulaciji kalcijem u stanici dovode do slijeda staničnih odgovora koji vode apoptozi, to jest induciranoj programiranoj staničnoj smrti stanica što svakako jest cilj antitumorske terapije. Pozitivnim odgovorom stanica količinom unutarstaničnog kalcija u ovom eksperimentu otvaraju se vrata daljnjim istraživanjima utjecaja nerolidola na zdrave i tumorske stanice.

Podaci su prikupljeni snimanjem fluorescencije kelata kalcija i fluorescentnog reagensa Fluo-3 u stanicama karcinoma mokraćnog mjehura (TCCSUP) tijekom tretiranja različitim koncentracijama nerolidola.

Ključne riječi: kalcij, TCCSUP, nerolidol, protočni citometar, Accuri C6, rak, Fluo-3, apoptoza, fluorescencija

Rad sadrži: 25 stranica, 16 slika, 4 tablice, 24 literalnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu: 1. prof.dr.sc. Mladen Miloš - predsjednik

2. doc.dr.sc. Franko Burčul - član

3. doc.dr.sc. Mila Radan – član -mentor

Datum obrane: 26.09.2019.

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 Split
Undergraduate Chemistry

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

Mentor: doc.dr.sc. Mila Radan
Technical assistance: Vedrana Čikeš Čulić PhD, full prof., mag.chem. Mateo Glumac

EFFECT OF NEROLIDOL ON THE LEVEL OF INTRACELLULAR CALCIUM IN BLADDER CARCINOMA CELL LINE (TCCSUP)

Antonio Ćiril Grubišić, 372

Abstract:

Calcium is the most abundant mineral in human body. 99% of calcium in body is found in bones and teeth while the rest 1% is found in blood and soft tissue. That 1% plays an important role in biological processes and it's concentration is strongly regulated in cells with parathyroid hormone and calcitriol. In cells, it is found in greater concentrations in mitochondrium and endoplasmatic reticulum which serves as intracellular storage for its regulation. Extracellular calcium serves as a regulator of potential difference in cell membranes.

Nerolidol is sesquiterpene alcohol naturaly occuring in many esential oils of different plants with floral odor. Becouse of its presence in human everyday life, scientists became interested in examination of its biological properties. Different effects of nerolidol on tumorigenic cells have been examined and they gave interesting results encourageing further researches.

It is interesting to examine the effect of nerolidol on the amount of intracellular calcium in different types of human cancer cells. Disorders in calcium regulation triggers cascade of cellular events that lead to apoptosis, induced programed cell death which is the goal of every anticancer therapy. With positive cell response in the change of the amount of intracellular calcium in this experiment it opens the doors to furher researches in nerolidol effects on healthy and tumorigenic cells.

Datas were collected filming fluorescence of chelate of calcium and fluorescentic reagent Fluo-3 with flow cytometer Accuri C6 in human bladder carcinoma cells (TCCSUP) while being treated with different concentrations of nerolidol.

Keywords: calcium, TCCSUP, nerolidol, flow cytometry, Accuri C6, cancer, Fluo-3, apoptosis, fluorescence

Thesis contains: 25 pages, 16 figures, 4 tables, 24 references

Original in: Croatian

Defence Committe: 1. Mladen Miloš - PhD, full prof. - chairperson

2. Franko Burčul - PhD, assistant prof. - member

3. Mila Radan - PhD, assistant prof. - supervisor

Defence date: 26.09.2019.

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

Rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju, Kemijsko–tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc.dr.sc. Mile Radan, u razdoblju od veljače do travnja 2019. godine.

Prilikom pisanja ovog rada htio bih se prvenstveno zahvaliti svojoj mentorici doc.dr.sc. Mili Radan koja je prepoznala moje zanimanje za biokemiju te me svojim pristupom i ugodnom osobnosti dodatno motivirala da se posvetim tom području i napišem završni rad iz tog područja. Također bih se zahvalio prof. Vedrani Čikeš Čulić i kolegi Mateu Glumcu što su sudjelovali u eksperimentu i svojim znanjem i vještinama pridonijeli optimalnoj izvedbi istog. Zahvalio bih se roditeljima i obitelji na strpljenju da dočekaju prvu diplomu, prijateljima i kolegama vatrogascima na podršci, a posebno mudrome prijatelju Stipi koji me gurao da napišem ovaj rad na vrijeme.

ZADATAK ZAVRŠOG RADA

Eksperimentom ispitati utjecaj nerolidola u različitim koncentracijama na unutarstaničnu koncentraciju kalcijevih iona kod stanica raka mokraćnog mjehura (TCCSUP stanična linija) i njihovo ponašanje pri različitim koncentracijama.

SAŽETAK:

Kalcij je najobilniji mineral u ljudskom tijelu. 99% kalcija u tijelu se nalazi u kostima i zubima dok se ostalih 1% nalazi u krvi i mekom tkivu. Tih 1% ima važnu ulogu u biološkim procesima i njegova koncentracija u stanicama je strogo regulirana paratireoidnim hormonom i kalcitriolom. U stanici se nalazi u većim koncentracijama u mitohodrijima i endoplazmatskom retikulumu koji služi kao unutarstanično skladište za tijesnu regulaciju njegove koncentracije. Izvanstanični kalcij služi kao regulator razlike potencijala u staničnim membranama.

Nerolidol je seskviterpenski alkohol prisutan u mnogim eteričnim uljima različitih biljaka cvjetnog mirisa. Zbog njegove prisutnosti u čovjekovoj svakodnevnici znanstvenici su se zainteresirali za ispitivanje njegovih bioloških svojstava. Razni utjecaji nerolidola na tumorske stanice već su ispitani i dali su zanimljive rezultate potičući daljnja istraživanja.

Zanimljivo je ispitati utjecaj nerolidola na koncentraciju unutarstaničnog kalcija kod raznih vrsta tumorskih stanica. Poremećaji u regulaciji kalcijem u stanici dovode do slijeda staničnih odgovora koji vode apoptozi, to jest induciranoj programiranoj staničnoj smrti stanica što svakako jest cilj antitumorske terapije. Pozitivnim odgovorom stanica količinom unutarstaničnog kalcija u ovom eksperimentu otvaraju se vrata daljnjim istraživanjima utjecaja nerolidola na zdrave i tumorogene stanice.

Podaci su prikupljeni snimanjem fluorescencije kelata kalcija i fluorescentnog reagensa Fluo-3 u stanicama raka mokraćnog mjehura (TCCSUP) tijekom tretiranja različitim koncentracijama nerolidola.

Ključne riječi: kalcij, TCCSUP, nerolidol, protočni citometar, Accuri C6, rak, Fluo-3, apoptoza, fluorescencija

SUMMARY:

Calcium is the most abundant mineral in human body. 99% of calcium in body is found in bones and teeth while the rest 1% if found in blood and soft tissue. That 1% plays an important role in biological processes and it's concentration is strongly regulated in cells with parathyroid hormone and calcitriol. In cells, it is found in greater concentrations in mitochondrium and endoplasmatic reticulum which serves as intracellular storage for its regulation. Extracellular calcium serves as a regulator of potential difference in cell membranes.

Nerolidol is sesquiterpene alcohol naturaly occuring in many esential oils of different plants with floral odor. Becouse of its presence in human everyday life, scientists became interested in examination of its biological properties. Diferent effects of nerolidol on tumorigenic cells have been examined and they gave interesting results encourageing further researches.

It is interesting to examine the effect of nerolidol on the amount of intracellular calcium in different types of human cancer cells. Disorders in calcium regulation triggers cascade of cellular events that lead to apoptosis, induced programed cell death which is the goal of every anticancer therapy. With positive cell response in the change of the amount of intracellular calcium in this experiment, it opens the doors to furher researches in nerolidol effects on healthy and tumorigenic cells.

Datas were collected filming fluorescence of chelate of calcium and fluorescentic reagent Fluo-3 with flow cytometer Accuri C6 in human bladder cancer cells(TCCSUP) while being treated with different concentrations of nerolidol.

Keywords: calcium, TCCSUP, nerolidol, flow cytometry, Accuri C6, cancer, Fluo-3, apoptosis, fluorescence

Sadržaj

UVOD....1

1. OPĆI DIO....2

1.1. Kalcij....2

1.1.1. Funkcija....2

1.1.2. Homeostaza kalcija....3

1.1.3. Signalizacija u stanici....4

1.1.4. Kalcij u stanicama raka....5

1.2. Nerolidol....6

1.2.1 Kemijska struktura i kemijska svojstva....7

1.2.2 Farmakološka i biološka aktivnost nerolidola....8

1.2.3 Protutumorno djelovanje nerolidola....9

1.3. Tumori....10

2. EKSPERIMENTALNI DIO....12

2.1. TCCSUP stanice....13

2.2. Protočna citometrija....13

2.2.1. Fluo 3....16

2.3. Protokol....17

2.3.1. Probenecid....18

2.4. Tijek protokola....19

3. REZULTATI I RASPRAVA....21

3.1. Rezultati....21

3.2. Rasprava....24

3.3. Posljedice....24

4. ZAKLJUČAK....25

5. LITERATURA....26

UVOD

Kalcij je jedan od najzastupljenijih minerala u tijelu čovjeka. Oko 99% kalcija koji se u tijelu nalazi, sadržan je u kostima i zubima, a ostalih 1% se nalazi u krvi i mekom tkivu. Koncentracija kalcija u krvi i izvanstaničnoj tekućini mora biti strogo regulirana za normalno fiziološko funkcioniranje organizma. Promjena njegove koncentracije u stanicama regulira kontrakciju mišićnog tkiva, provođenje živčanog signala i zgrušavanje krvi. Koncentracija kalcija u tijelu je regulirana paratiroidnim hormonom i vitaminom D. Vezanje kalcija aktivira mnoge enzime gdje djeluje kao kofaktor. Unutarstanični kalcijevi ioni imaju ulogu sekundarnog glasnika za regulaciju transkripcije gena, proliferaciju stanica, migraciju i staničnu smrt. Promjena koncentracije unutarstaničnog Ca^{2+} danas se dovodi u vezu sa drugim parametrima stanice, uključivši analizu staničnog ciklusa i indukciju markera apoptoze posebno kod kancerogenih stanica što je posebno zanimljivo u tom području istraživanja. Istraživanja su pokazala da je kod stanica raka unutarstanična homeostaza Ca^{2+} promijenjena i da je ona uključena u inicijaciju tumora, angiogenezu, progresiju i metastaziranje. Ciljanje kalcijevih signalnih putova u terapijama liječenja raka je postalo novo područje istraživanja. Zbog nedostataka kemoterapije danas se traže alternativni načini liječenja raka poput terapije biljnim fitokemikalijama kao što je nerolidol za kojeg je već dokazano da ima neka protutumorna djelovanja. Interesantno je proučiti kako taj spoj djeluje na unutarstaničnu homeostazu kalcijevih iona kod ljudskih stanica raka mokraćnog mjehura (TCCSUP).

1. OPĆI DIO

1.1. Kalcij

Kalcij je kemijski element smješten u skupinu zemno-alkalijskih metala. Kemijski simbol u periodnom sustavu elemenata mu je Ca. U prirodi je jedan od najrasprostranjenijih elemenata, mekan, sjajan bijelo-srebrni metal koji polako reagira sa vodenom parom, kisikom i dušikom iz zraka. Gorenjem na zraku daje blještavu narančasto-crvenu svjetlost. Kalcijeve soli su često dobro topljive u vodi, no uključene su i iznimke poput hidroksida, sulfata, fosfata i karbonata. (1)

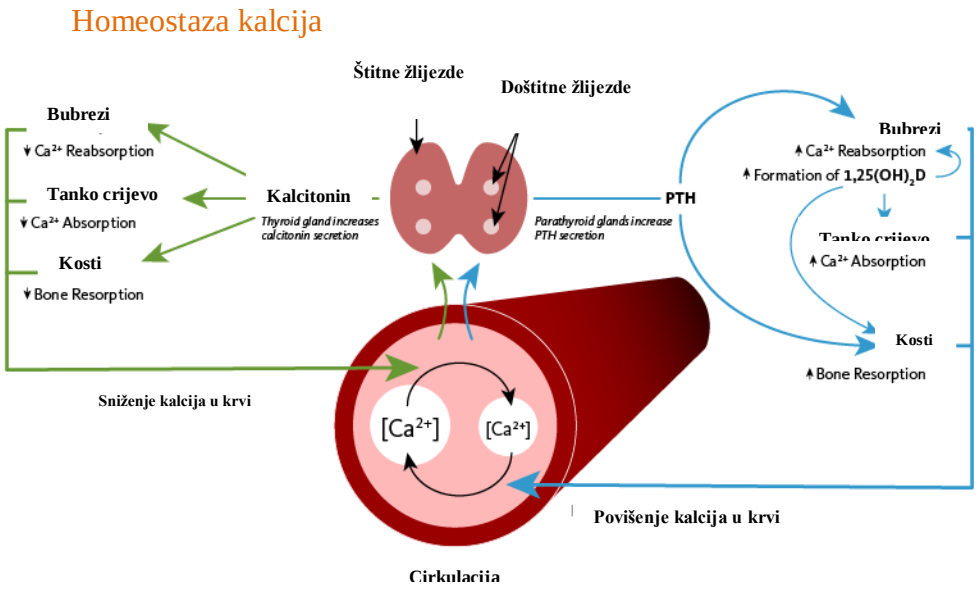
U ljudskom tijelu prema zastupljenosti nalazi se na petom mjestu. Kalcij postoji u 3 fiziokemijska stanja u plazmi: oko 50% je slobodno (ionizirano), 10% je u obliku kompleksa sa malim difuzibilnim organskim i anorganskim anionima, a 40% je vezano za proteine plazme. Biološki najaktivniji oblik je frakcija slobodnog kalcija. Njegova koncentracija u plazmi je regulirana sa kalcij regulirajućim hormonom 1,25 – dihidroksi-vitaminom D3 i paratireoidnim hormonom (PTH).

1.1.1. Funkcija

Kalcij je za organizam esencijalni element potreban u velikim količinama. Ca^{2+}ion služi kao elektrolit i vitalan je za zdravlje mišićnog, krvnog i probavnog sustava. Neophodan je za izgradnju koštanog tkiva i zubi. (2) Mineralna komponenta kostiju se sastoji prvenstveno od kristala hidroksiapatita[Ca10(PO4)6(OH)2] koji sadrži velike količine kalcija, fosfora i kisika. Kosti ujedno služe kao skladište kalcija u organizmu. Kalcij potiče sintezu i funkciju krvnih stanica, regulira kontrakciju mišića, provođenje živčanog signala i zgrušavanje krvi. (3) Zbog toga je njegova koncentracija u tijelu strogo regulirana. Kalcij je pogodan za svoju ulogu zbog toga što Ca^{2+}ion formira stabilne koordinacijske komplekse s mnogo organskih komponenti, posebno proteinima te stvara spojeve s širokim spektrom topivih tvari što omogućava stvaranje kostura. U putovima provođenja signal služi kao sekundarni glasnik.

1.1.2. Homeostaza kalcija

Koncentracije kalcija u krvi i izvanstaničnoj tekućini su strogo kontrolirane da bi se sačuvale normalne fiziološke funkcije. Doštitne žlijezde osjete lagani pad koncentracije kalcija u krvi, rezultirajući povišenim izlučivanjem paratiroidnog hormona (PTH). U bubrezima , PTH stimulira pretvorbu vitamina D u svoju aktivnu formu (1,25-dihidroksikolekalciferol;kalcitriol), koji ubrzano smanjuje urinarno izlučivanje kalcija, a povećava urinarno izlučivanje fosfora. (2) Porast PTH ujedno potiče resorpciju kostiju, rezultirajući otpuštanjem koštanih mineral što dovodi do obnavljanja koncentracije kalcija u serumu. Povišena koncentracija kalcitriola također potiče crijevnu apsorpciju kalcija i fosfora. Poput PTH, kalcitriol stimulira otpuštanje kalcija iz kostiju aktivirajući osteoklaste (stanice koje služe za resorpciju kostiju). Kada koncentracija kalcija u krvi postigne normalnu razinu, doštitne žlijezde prestanu lučiti PTH. Lagani porast koncentracije kalcija u krvi stimulira proizvodnju i lučenje peptidnog hormona kalcitonina iz štitnih žlijezda. Kalcitonin inhibira lučenje PTH, smanjuje resorpciju kostiju i crijevnu apsorpciju kalcija te povećava urinarno lučenje kalcija.



Slika 1: Homeostaza kalcija (2)

1.1.3. Signalizacija u stanici

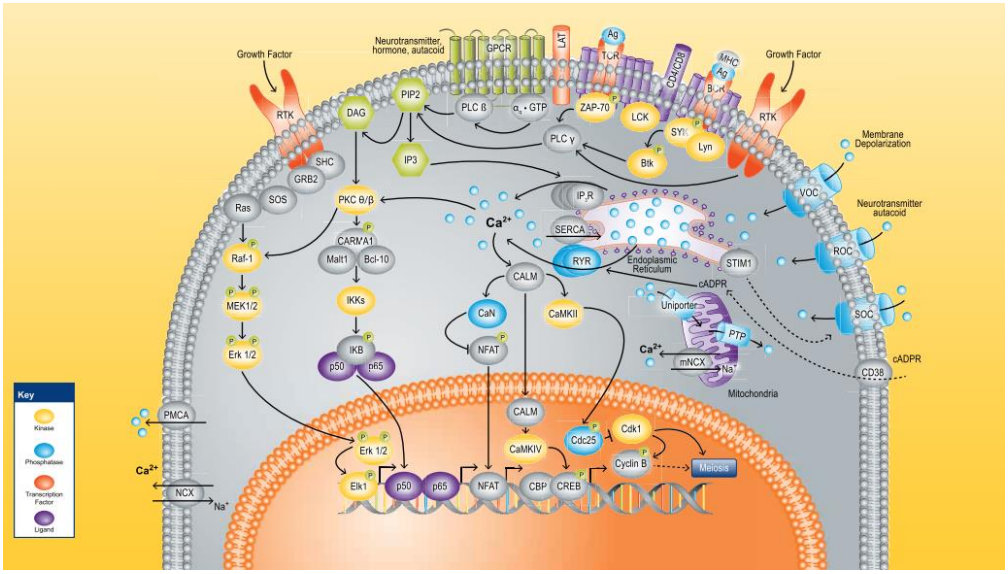
Ca^{2+} ion je svestrani unutarstanični sekundarni glasnik uključen u regulaciju mnogo različitih staničnih procesa. Strogo regulirani Ca^{2+} signali u obliku valova, šiljaka i oscilacija reguliraju široki spektar staničnih procesa. Njegova distribucija izvan i unutar stanice zahtjeva specijalne pumpe i kanale potrebne za njegovo funkcioniranje i distribuciju kao i utjecaj na staničnu depolarizaciju i repolarizaciju. Nadalje, količina i duljina protoka kalcija određuje tip i duljinu svog učinka na unutarstaničnu signalizaciju. (3)

Endoplazmatski retikulum služi kao unutarstanično skladište Ca^{2+}. Djelovanjem signalnih molekula na IP_3R (inozitol trifosfat receptor), RyR (riadoninski receptor) i SERCA (sarko/endoplazmatski reticulum Ca^{2+} ATP-aza) receptore, stanica manipulira njegovim tokom.

Kalmodulin je unutarstanični protein koji veže kalcij. On je posrednik u djelovanju kalcija jer mu omogućava gibanje iz jednog dijela stanice u drugi. Pripada porodici proteina konfiguracije EF šake koja se sastoji od uzvojnice, petlje te još jedne uzvojnice i sadrži 4 vezna mjesta za kalcij. Klamodulin se aktivira nakon što se koncentracija kalcija poveća na približno 0,5 µM. Kompleks kalcija i kalmodulina se zatim veže na ciljne protein uključujući protein kinaze. CaM-kinaze zatim fosforiliraju metaboličke enzime, ionske kanale i transkripcijske faktore. (4,5)

Kalcij također ima utjecaj na pukotinski spoj koji služi kao kanal za komunikaciju stanica-stanica. Koncentracijom kalcijevih iona se regulira otvaranje zatvaranje pukotinskog spoja

Provođenje signala počinje na površini stanične membrane gdje receptor prima signal izvan stanice te mijenja svoju strukturu. Vezno mjesto na receptoru specifično prepoznaje signalne molekule. Signal se na receptoru višestruko povećava te prenosi na druge glasnike unutar stanice koji nastavljaju prijenos signala. Sekundarni glasnici poput Ca^{2+} imaju daljnji učinak poticanja pumpi i enzima. Nakon završetka staničnog odgovora stanični signal se prekida. (6)



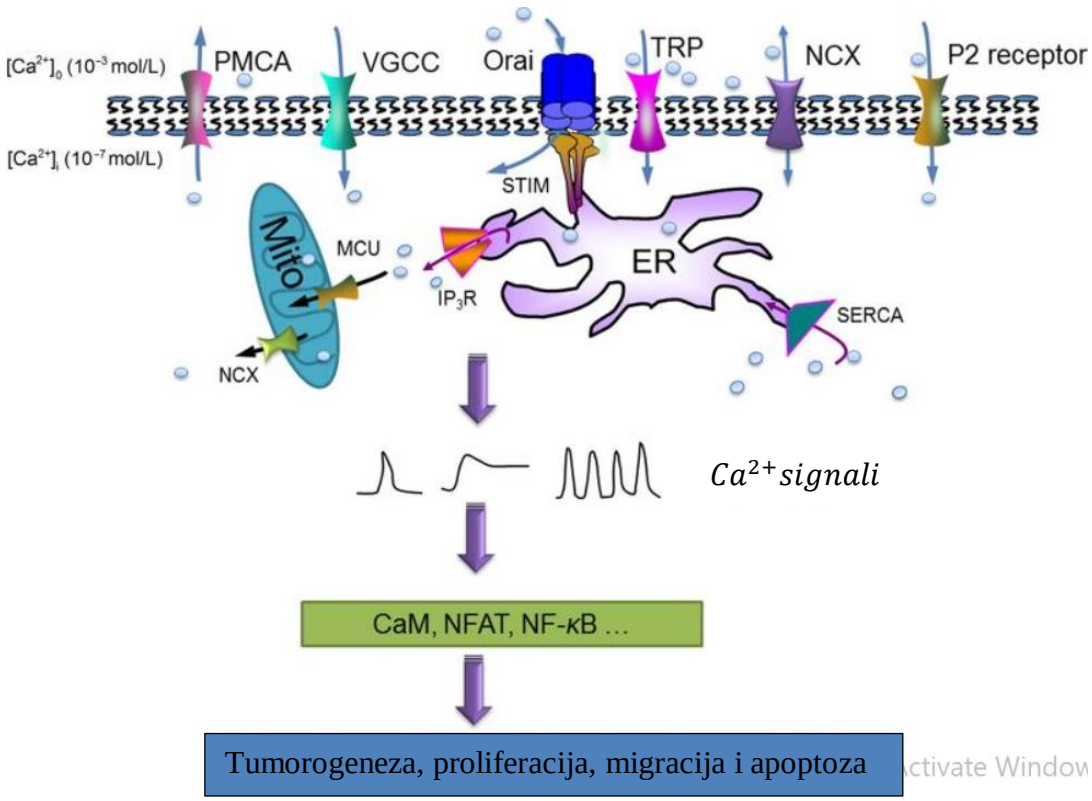
Slika 2: Put provođenja signal

1.1.4. Kalcij u stanicama raka

Homeostaza unutarstaničnog kalcija je promijenjena kod stanica raka i ta promjena je uključena u inicijaciji tumora, angiogenezi, progresiji i metastaziranju. Kod stanica raka dolazi do promjena važnih Ca^{2+} kanala, transportera i Ca^{2+} ATP-aza. Ciljanje tih promijenjenih kanala, pumpi i transportera daje potencijal za kemoterapijsko liječenje. (5)Unutarstanična homeostaza Ca^{2+} je održavana mrežom sastavljenom od raznih Ca^{2+} kanala i transportera od kojih su najvažniji:

I. **IP_3R** ili rijadoninski receptor (**RyR**) koji posreduje otpuštanje Ca2+ iz endoplazmatskog/sarkoplasmatskog retikuluma (ER/SR)
II. Ca^{2+}-ATP-aza koja pumpa Ca^{2+} iz citosola natrag u ER/SR ili izvanstanični prostor
III. Ca^{2+} kanali ili transporteri koji dozvoljavaju ulazak Ca^{2+} kroz plazmatsku membranu iz izvanstaničnog Ca^{2+} rezervoara, poput naponom kontroliranog Ca^{2+} kanala (eng. *voltage-gated Ca^{2+} channel*, **VGCC**), kanala prolaznih potencijala receptora (eng. *transient receptor potential channes*, **TRP**), kalcijevog kanala kontroliranog otpuštanjem Ca^{2+} (eng. *Ca^{2+}release-activated Ca^{2+} channel*, **CRAC**), Na^{+}/Ca^{2+} izmjenjivača-antiportera (eng. *Na^{+}/Ca^{2+} exchanger*, ***NCX***) i purinskog receptora (eng. *purinergic receptor*)
IV. mitohondrijski Ca^{2+} uniporter (**MCU**) koji regulira ulazak Ca^{2+} u mitohondrije

Naime, ovi prijenosnici kalcijevih iona najčešće budu izmijenjeni kod stanica raka.



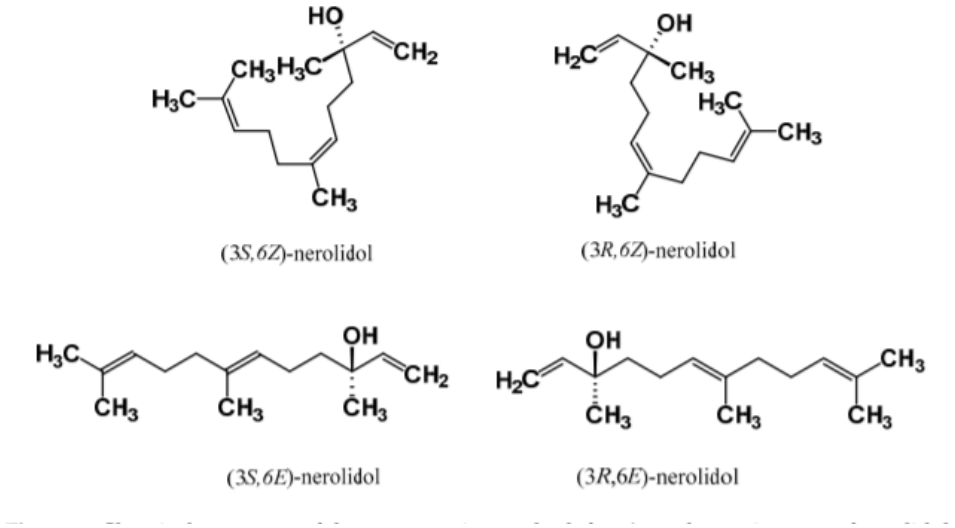
Slika 3: Važni kanali/transporteri/pumpe kod stanica raka (5)

1.2. Nerolidol

Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol), poznat kao i peruviol je prirodno rasprostranjen seskviterpenski alkohol koji se nalazi u raznim biljkama cvjetnog mirisa. Sintetiziran je kao međuprodukt u sintezi (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatriena (DMNT), hlapljivog spoja koja štiti biljku od štete nanesene biljojedima. Nerolidol postoji u dva izomera, trans i cis oblik i koristi se u raznim industrijama. Posebno se koristi u kozmetičkoj industriji (šamponi, parfemi, deterdženti). Činjenica da je čest sastojak mnogih proizvoda, privukla je mnoge istraživače da istraže medicinska svojstva nerolidola koja bi mogla imati korisne učinke na ljudsko zdravlje. (7)

1.2.1 Kemijska struktura i kemijska svojstva

Nerolidol ima četiri izomera, dva enantiomera i dva geometrijska izomera. Postojanje tih izomera je zbog duple veze na poziciji C-6 i asimetričnog centra na poziciji C-3. Izometrične forme *cis*- i *trans*- nerolidola prikazani sun a slici 4. Sinonimi za *cis*- i *trans*- nerolidol su prikazani na tablici 1. (7)



Slika 4: Kemijske strukture *cis*- i *trans*- izomera nerolidola

Tablica 1: Sinonimi za *cis*- i *trans*- nerolidol

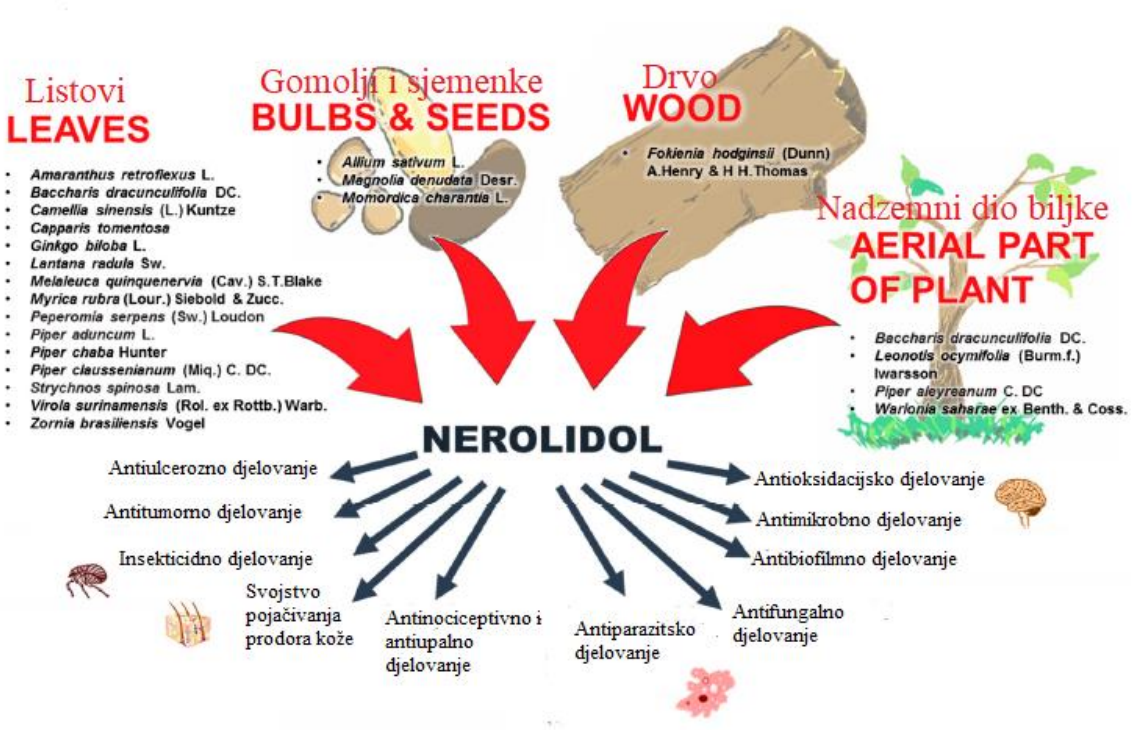
***Cis*-Nerolidol**	***Trans*-Nerolidol**
(+,-)-*cis*-nerolidol	(+,-)-*cis*-nerolidol
(6Z)-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol	(6Z)-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol
(6Z)-3,7,11-trimetildodeka-1,6,10-trien-3-ol	(6Z)-3,7,11-trimetildodeka-1,6,10-trien-3-ol
(6Z)-nerolidol	*(6Z)-nerolidol*
1,6,10-dodekatrien-3-ol,3,7,11-trimetil-,(6Z)-	*1,6,10-dodekatrien-3-ol,3,7,11-trimetil-,(6Z)-*
(Z)-nerolidol	*(Z)-nerolidol*

Poput ostalih seskviterpenskih molekula, nerolidol je vrlo hidrofoban što znači da se teško otapa u vodi i sličnim polarnim otapalima. Ova svojstva omogućavaju lakše penetriranje hidrofobne plazmatske membrane i interakciju s unutarstaničnim proteinima i organelima. Fizikalna svojstva nerolidola su opisana po Lapczynskom kako je navedeno: (7)

(i) Fizikalni opis: Prozirno blijedo žuta do žuta tekućina s nježnim cvjetnim mirisom koji podsjeća na ruže i jabuke.
(ii) Kemijska formula: $C_{15}H_{26}O$
(iii) Temperatura paljenja: >100 °C
(iv) Temperatura vrenja: 276 °C.
(v) Konstanta razdjeljenja: 5.68.
(vi) Tlak para: 0.1 mm Hg 20 °C.
(vii) Relativna gustoća: 0.8744.
(viii) Topljivost u vodi: 1.532 mg/L pri 25 °C

1.2.2 Farmakološka i biološka aktivnost nerolidola

Sa saznanjem da nerolidol igra važnu ulogu u obrambenom sustavu nekih biljaka, istraživači su se zainteresirali za istraživanjem i drugih farmakoloških i bioloških aktivnosti. Do danas, razna farmakološka i biološka djelovanja nerolidola su istraženo. Pokazano je da ima antimikrobno, antioksidativno, antibiofilmno, antiparazitsko, antinoceciptivno i protuupalno djelovanje. Djeluje zaštitno na kožu, pomaže prijenosu tvari kroz kožu i pokazano je da ima antitumorno djelovanje. Slika 5 prikazuje farmakološka i biološka djelovanja nerolidola te izvore dobivanja nerolidola ekstrakcijom iz različitih dijelova biljnog tkiva. (7)



Slika 5: Prirodni izvori za ekstrakciju nerolidola i pogled na farmakološka i biološka djelovanja nerolidola (7)

1.2.3 Protutumorno djelovanje nerolidola

Danas je rak jedan od vodećih uzročnika smrti u svijetu. Godišnje umre više od 6 milijuna ljudi od te bolesti.(8)To je višefaktorijalna bolest koja vodi do nekontroliranog rasta i invazije abnormalnih stanica. Kemoterapija, radiokirurgija i kirurgija su neke od uspješnih metoda liječenja raznih vrsta tumora. Unatoč tome, javljaju se i negativne nuspojave koje vode do akutnih i kroničnih oštećenja organa poput smanjenja koštane srži, jetrenih, plućnih, srčanih, bubrežnih i probavnih oštećenja. (7) Štoviše, razvoj otpornosti tumora na lijekove se uočio tijekom primjene kemoterapije. To može biti zbog mutacija u kancerogenim stanicama koje prekidaju put apoptoze tijekom liječenja raka. Ove negativne strane kemoterapije su potakle istraživače da nađu alternativne načine liječenja koji ne bi oštećivali zdrave stanice i poticali otpornost na antitumorne lijekove. Među alternativnim pristupima, fitokemikalije poput nerolidola se sve više istražuju zbog svojih potencijalnih pogodnih učinaka na stanice raka u *in vitro* i *in vivo*

modelima. Utjecaj nerolidola na ljudske stanice, zdrave i kancerogene, je eksperimentalno dokazan, predstavljajući nerolidol kao važan spoj za daljnja istraživanja. (9-12) Činjenica da su stanice raka podložnije utjecaju nerolidola od zdravih stanica, daje mu važnu ulogu u antitumornim istraživanjima. (7)

1.3. Tumori

Tumor označava skup izmjenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast tkiva. Riječ tumor znači oteklina, a drugi naziv mu je novotvorina odnosno neoplazma. Tumori nastaju kad se izgubi normalna fiziološka regulacija kontrolnih mehanizama rasta stanica pa se tkivo nastavi nekontrolirano širiti. Tumori ili novotvorine se dijele na maligne (zloćudne) i benigne (dobrotvorne). Razlikuju se u agresivnosti rasta te po tome što maligni metastaziraju u okolno zdravo tkivo dok benigni rastu ekspanzivno potiskujući ga. Zloćudni (maligni) tumor se naziva rak. Onkologija je interdisciplinarna znanost o uzrocima, faktorima, prevenciji, općoj prirodi pojave, rasta i liječenja tumora.

TUMORSKE KVALIFIKACIJE

Tumore možemo podijeliti po karakteru i tkivu iz kojeg se razvijaju.

i) Klasična klasifikacija

Tumori se u osnovi dijele na maligne i benigne. U tablici 2 su prikazane osnovne karakteristike zloćudnih i dobroćudnih tumora.

Tablica 2: Osnovne razlike dobroćudnih i zloćudnih tumora

	DOBROĆUDNI	ZLOĆUDNI
RAST	Ekspanzivan Polagan Nema lokalne invazije ni metastaza	Infiltrativan Brži rast Lokalna invazija Metastaze (širenje krv/limfa)
MAKRO	Oštro ograničen Dobro opskrbljen krvlju	Nepravilna oblika Česte nekroze
MIKRO	Diferencirane stanice (nalikuju zrelim stanicama) Kromatin raspršen Jezgrice neuočljive	Atipične stanice Pleomorfne jezgre Hiperkromatični kromatin Uočljive jezgrice i mitoze

ii) Histogenska kvalifikacija tumora

Histogenska kvalifikacija na govori o tkivnom podrijetlu tumora.

- Epitelni
- Mezenhimalni
- Tumori limfocita i hematopetskih stanica
- Neurani tumori i srodne novotvorine
- Tumori potpornih stanica živčanog tkiva
- Tumori spolnih stanica

Glavne karakteristike progresije tumorskog rasta

- Stalni poticaj na staničnu proliferaciju
- Izbjegavanje usporavanja proliferacije
- Izbjegavanje apoptoze
- Gubitak ograničenja proliferacije
- Neoangiogeneza
- Invazija, metastaziranje i kolonizacija

Stupnjevi razvoja tumorskih stanica

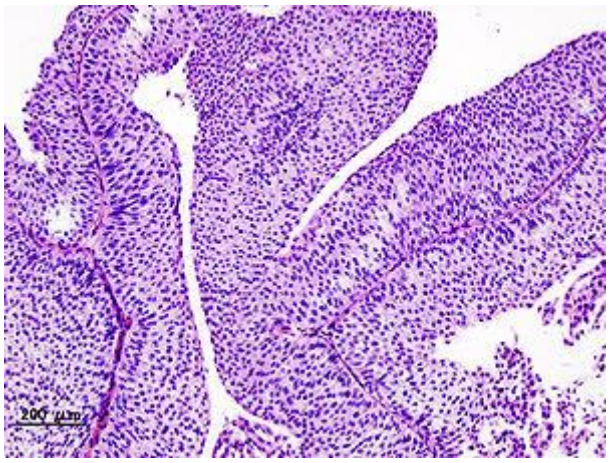
I. Inicijacija
II. Promocija
III. Konverzija
IV. Progresija
V. Kolonalna ekspazija
VI. Kolonalna selekcija

2. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio rada se izvodio u biokemijskom laboratoriju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Cilj eksperimenta je bio uočiti ponašanje i promjenu unutarstaničnog Ca^{2+} kod TCCSUP stanične linije nakon dodavanja malih količina prirodnog organskog spoja nerolidola. Eksperiment se izvodio na protočnom citometru Accuri C6, citometru novije generacije koji nudi tehnički naprednije mogućnosti u mjerenju brzih staničnih procesa poput promjene unutarstaničnog kalcija.

2.1. TCCSUP stanice

Stanična linija TCCSUP je uzgojena iz G4 stanica raka mokraćnog mjehura ženske osobe dobi 67 godina. TCC kratica dolazi od eng. *transitional cell carcinoma* što u prijevodu znači rak stanica prijelaznog epitela kod organa mokraćnog sustava. Iako stanična linija ima tkivno podrijetlo u epitelnim stanicama, izgubila je skoro sva svoja morfološka obilježja koja ih s njima povezuju. Uzgojene su Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) dopunjenom s 10%-tnim fetal bovine serum (FBS) na temperaturi od 37 °C u ovlaženoj atmosferi s 5% CO_2, 95% zraka u inkubatoru. Stanice su uzgojene kao monosloj adhezivnih stanica u petrijevim zdjelicama.



Slika 6: Mikroskopska snimka presjeka tkiva koje sadržava TCC stanice

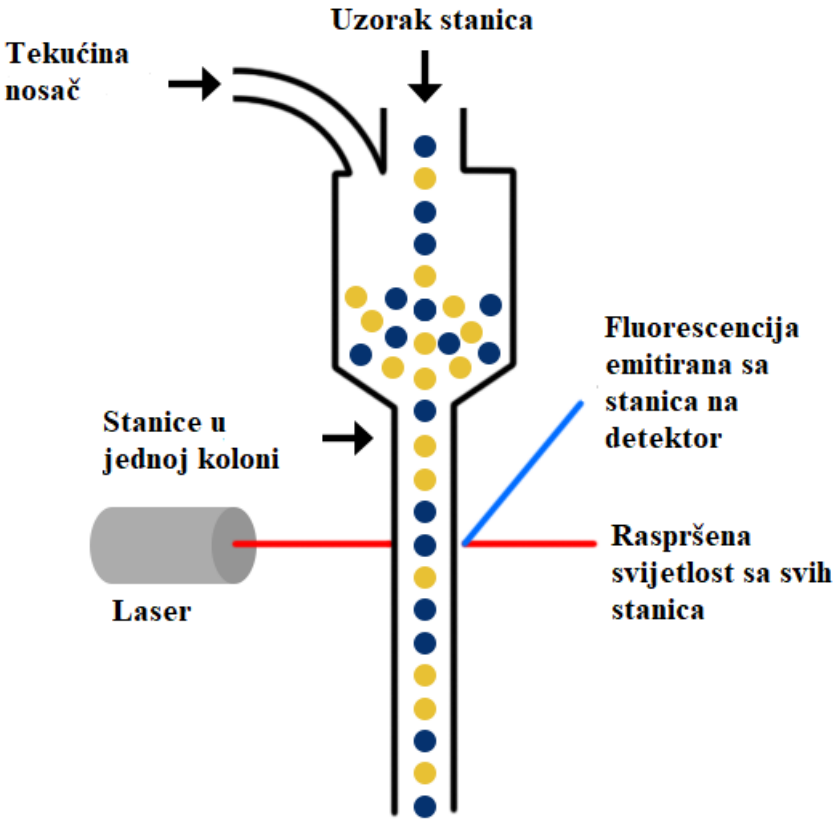
2.2. Protočna citometrija

Promjene u unutarstaničnim koncentracijama kalcija su među najbržim odgovorima na razne poticaje u stanicama sisavaca. Posebno u živčanom sustavu gdje odgovor dolazi u nanosekundama. Veliki izazov u analizi unutarstaničnog kalcija je kako obaviti mjerenja u tom kratkom vremenskom okviru. Do danas, dinamičke koncentracije unutarstaničnog kalcija promatrane su konfokalnom mikroskopijom,

„plate-based" protokolima, spektrofluorometrijom i protočnom citometrijom. U tim tehnikama su imali problema s brojem stanica za analizu i rupama u snimkama zbog dodavanja sastojaka sa značajnim gubitkom detalja brze promjene kalcija. Protočna citometrija nove generacije rješava te problem i nudi brojne prednosti nad tradicionalnim tehnikama za mjerenje unutarstaničnog Ca^{2+}. Eksperiment se izvodio na protočnom citometru Accuri C6, citometru nove generacije koji rješava problem rupa u snimkama zbog dodavanja sastojaka na način da koristi peristaltičku pumpu koja dozvoljava korištenje otvorenih posuda u koje se mogu dodavati drugi sastojci izravno. Na taj način omogućeno je kontinuirano mjerenje na tisuće stanica i dobivena je metoda za dinamičko mjerenje kalcija cijele populacije. (13,14)

Tablica 3: Prednosti i ograničenja protočne citometrije

PREDNOSTI	OGRANIČENJA
Definiranje heterogenosti	Teža kontrola koncentracije izvanstaničnog Ca^{2+}
Definiranje ciljane populacije stanice	Teže pružanje kinetičke analize
Kombinacija sa drugim bojama i indikatorima	Nemogućnost praćenja stanice sa vremenom
	Ograničen raspon valnih duljina
	Teža kalibracija



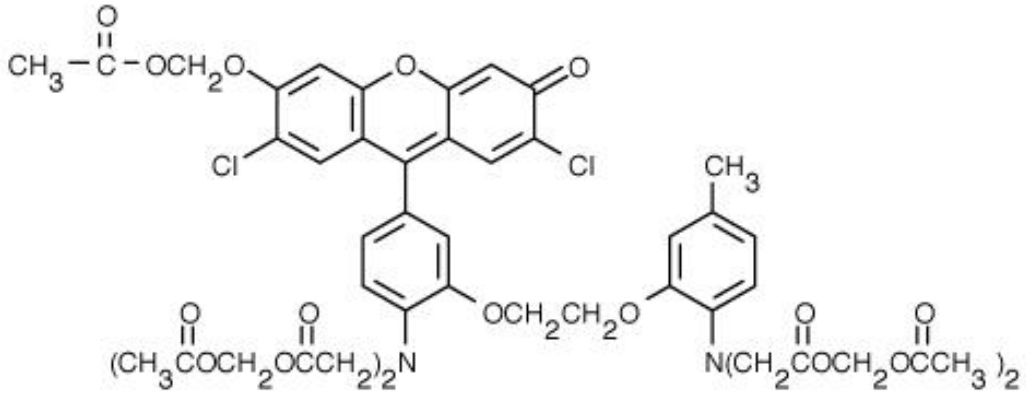
Slika 7: Shema protočnog citometra

Slika 8: Accuri C6 protočni citometar

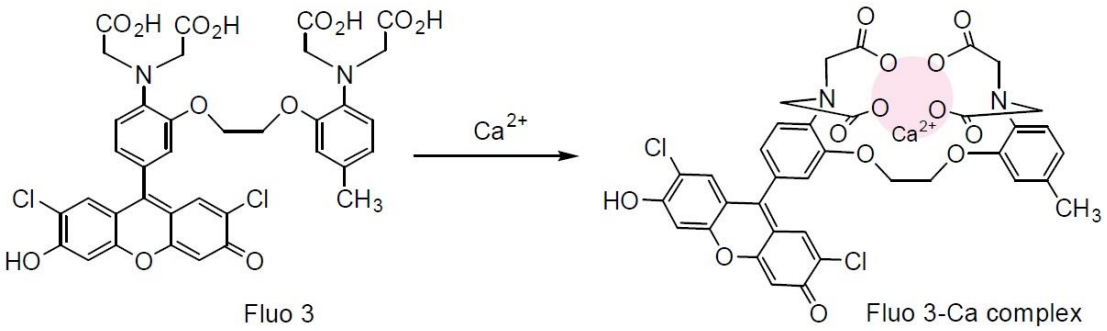
Slika 9: Dodavanje stanica ili reagensa tijekom analize uzorka u Accuri C6 protočnom citometru (14)

2.2.1. Fluo 3

Fluo 3 je fluorescentni indikator koji se koristi kod protočne citometrije za mjerenje unutarstaničnog kalcija kod živih stanica. Fluo-3 je u suštini nefluorescentna molekula, ali se vezanjem na kalcijeve ione u kompleks njegova fluorescentnost naglo poveća oko 40 puta s emisijskim maksimumom na 506 nm pogodnim za pobuđivanje argon-ionskim laserom. Zbog toga što soli Fluo-3 nisu u mogućnosti penetrirati membranu stanice, unosi se u obliku acetoksimetil (AM) estera (Fluo-3 AM). Kada uđe u stanicu, nespecifične esteraze katalitički razbijaju ester ostavljajući Fluo-3 zarobljen u stanici.(15-17)



Slika 9: Fluo-3 AM ester



Slika 11: Vezanje kalcija na Fluo-3 u fluorescentni kompleks

2.3. Protokol

Protokol za izvedbu ovog rada preuzet je iz znanstvenog rada ‘A Flow-Cytometric Method for Continuous Measurement of Intracellular Ca^{2+}Concentration’ koji je izrađen na protočnom citometru Accuri C6. (14) U radu se analogno našem eksperimentu promatra promjena koncentracije unutarstaničnog kalcija u C6

glioblastoma stanicama nakon dodatka poznatih inhibitora i aktivatora pumpi/kanala/transportera kalcija u unutarstaničnim organelima i membrani. Stanice su tretirane Tapsigargin-om (TG) koji inhibira SERCA pumpu čime blokira ulazak kalcija u endoplazmatski reticulum(ER) rezultirajući povišenom koncentracijom kalcija u stanici zbog pražnjenja ER praćenom ulaskom Ca^{2+} kroz SOCC (store-operated Ca^{2+}channels) kanale na površini plazmatske membrane. Dodatkom 2-aminoetoksidifenil borata (2-APB) inhibira se SOCC tako da se povišenje kalcija promatra kao otpuštanje iz endoplazmatskog reikuluma. Za usporedbu, kalcij ionofor, A23187 je korišten kao pozitivna kontrola ulaska izvanstaničnog kalcija. U našem protokolu umjesto Fluo-4 AM indikatora korišten je Fluo-3 AM. Za razliku od postupka u preuzrtom protokolu stanice su tretirane probenecidom, blokerom kanala stanične membrane kako bi zadržali Fluo-3 unutar stanice. Na protočnom citometru promatrana je promjena unutarstaničnog kalcija nakon dodataka nerolidola. Zbog utvrđivanja valjanosti protokola napravljena su 3 testna protokola s različitim spojevima da bi se na kraju došlo do optimalnog načina izvedbe i najvjerodostojnijih rezultata.

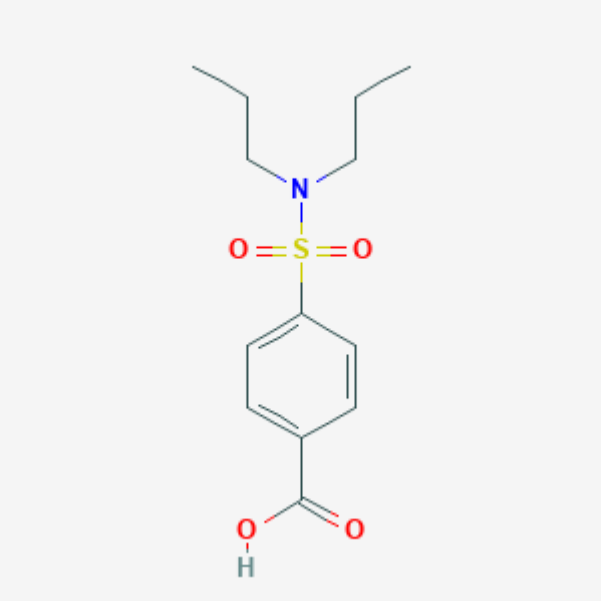
2.3.1. Probenecid

Pobenecid je organska kiselina, derivat je benzojeve kiseline. On je urikozurik, tj. povećava izlučivanje mokraćne kiseline iz krvi u urin. Probenecid je lijek korišten za liječenje gihta, često u kombinaciji s drugim lijekovima koji dolazi na tržište pod imenom Probalan. Često se koristi i kao maskirni spoj, supstanca koja maskira ilegalne supstance u tijelu na doping testu. (18) Za probenecid se smatra da blokira paneksine, velike transmembranske kanale koji služe za prijenos iona i malih molekula između unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora.(19) U eksperimentu je korišten pod pretpostavkom da blokira sve ionske kanale na staničnoj membrani. Upravo zbog te karakteristike je uključen u ovaj eksperiment, da bi sačuvali Fluo-3 i kalcijeve ione u unutarstaničnom prostoru nakon djelovanja nerolidolom.

Nakon nekoliko testnih pokušaja s probenecidom odlučeno ga je koristiti kao otopinu 2mM u Rynger puferu za ispiranje i centrifugiranje nakon inkubacije s Fluo-3 AM kod jednog uzorka. Pretpostavilo se da bi na taj način probenecid inhibirao sve izlaze i ulaze iz stanice kroz membranu, a višak bi se uklonio. Tretiranje nerolidolom bi se vršilo

neovisno o tome što su kanali blokirani zbog njegovog svojstva da penetrira membranu ili dijeluje preko membranskih receptora.

Dokaz njegove sinergije s drugim lijekovima vidimo na primjeru da se tijekom II. Svjetskog rata koristio u kombinaciji s malim dozama penicilina da bi produžio njegovo djelovanje zbog nedostupnosti lijeka u to vrijeme. Probenecid bi inhibirao njegovo izlučivanje te bi ga duže zadržao u stanici. (20)



Slika 12: Struktura probenecida

4-((N,N-dipropil)sulfonil)benzojeva kiselina

2.4. Tijek protokola

TCCSUP stanice su pripremljene u biokemijskom laboratoriju Medicinskog fakulteta u Splitu. Stanice su tretirane s tripsinom da bi se odvojile od podloge. Isprane su od medija u kojem su rasle sa svježim Rynger puferom i ostavljene da se inkubiraju oko 20 minuta. Stanice su prebrojane, razrijeđene na koncentraciju od 1 x 10^6/mL i prebačene u dvije testne tube po 0,5 mL stanica. U uzorak je dodano 3,4 µL otopine Fluo-3-AM u 3%-tnom dimetilsulfoksidu (DMSO) tako da mu konačna koncentracija bude 3 µM.

Testne tube sa stanicama su ostavljene na dodatnu inkubaciju minimalno 20 minuta da bi boja što bolje ušla u stanice i tamo se zadržala u obliku Fluo-3. Zatim su uzorci centrifugirani i isprani po 3 puta s Rynger puferom od kojih je jedna tuba ispirana s Rynger puferom koji je bio 2 mM otopina probenecida. Nakon ispiranja uzorci su ostavljeni u čistom Rynger puferu za analizu. Svježe su pripravljene 3 otopine nerolidola od 5 mg/mL, 12,5 mg/mL te 25 mg/mL koje su dodavane u uzorak pipetom od 10 µL u 3 vremenska razmaka. Paralelno sa stanicama TCCSUP linije, istovjetno su pripremljene i stanice stanične linije LN229 radi usporedbe.

Uzorci su postavljeni na protočni citometar jedan po jedan te su dodavani alikvoti otopine nerolidola od manje prema većoj koncentraciji. Najprije minutu i pol nakon početka, a zatim nakon dvije minute svaki.

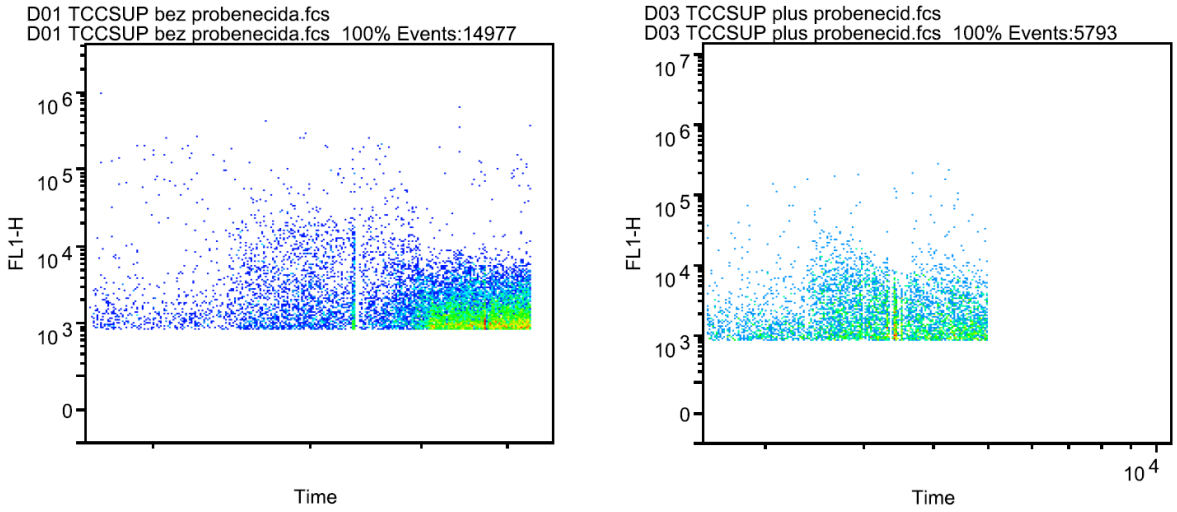
Tablica 4: Koncentracije i intervali dodavanja otopine nerolidola u uzorak stanica

Lokacija rezultata	Stanična linija(500uL)	C(Nerolidol)(mg/mL)(V=10uL)	t/s
D1	TCCSUP	5	90
		12.5	210
		25	330
D2	LN-229	5	100
		12.5	215
		25	335
D3	TCCSUP(probenecid)	5	90
		12.5	210
		25	330
D4	LN229(probenecid)	5	90
		12.5	210
		25	330

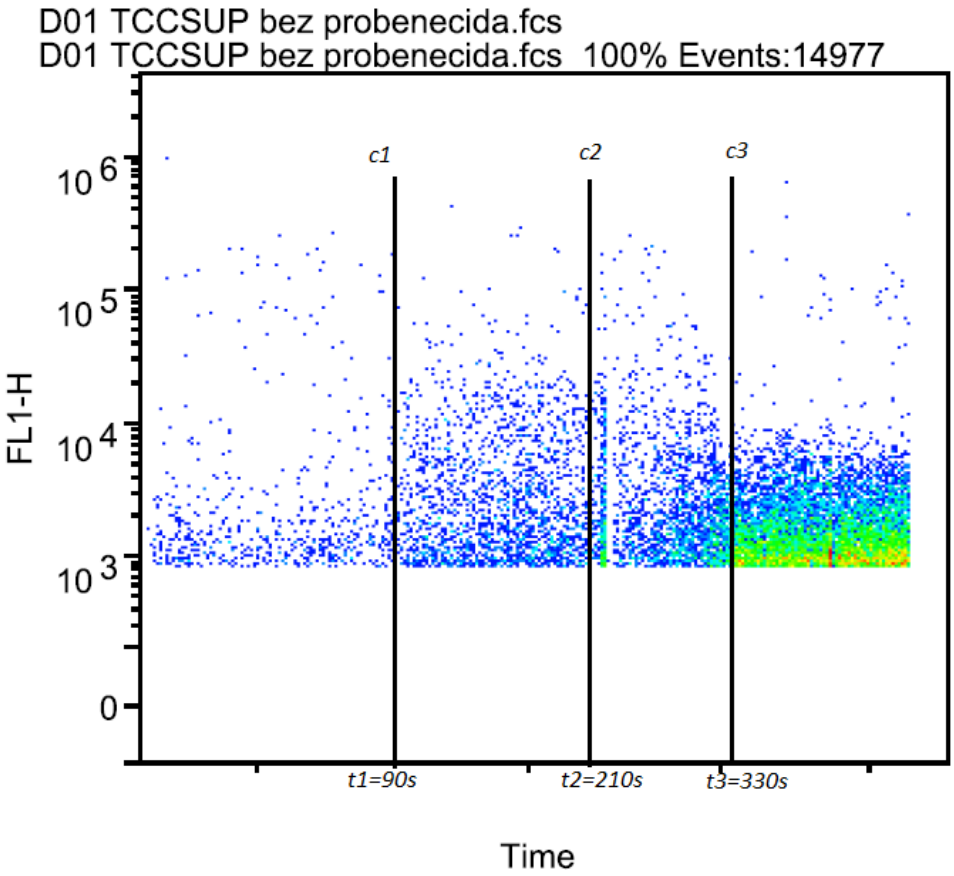
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati

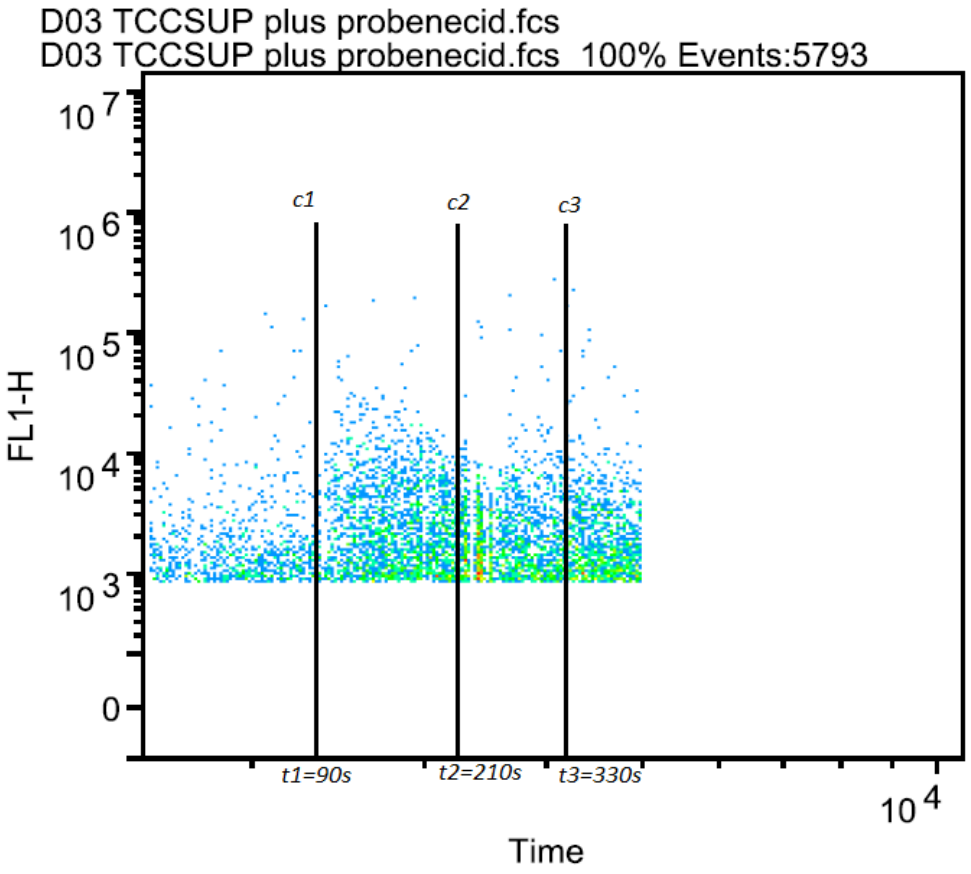
Očitavanje na protočnom citometru pokazalo je povećanje fluorescencije nakon svakog dodavanja otopine nerolidola s malim zakašnjenjem pripisanim vremenu da nerolidol utječe na stanične procese. Povećanje fluorescencije označava povećanje unutarstaničnog Ca^{2+} koji se izlučuje iz endoplazmatskog retikuluma koji služi kao skladište Ca^{2+} za unutarstaničnu regulaciju homeostaze tog iona. Prvih 90 sekundi fluorescentne signalizacije je snimljeno bez nerolidola za referentnu granicu. Nakon 90 sekundi primijenjena je prva doza od 10 µL otopine nerolidola masene koncentracije 5 mg/mL dajući koncentraciju od 0,098 mg/mL u testnoj tubi s TCCSUP stanicama. Nakon primjene na citogramu dolazi do značajnog porasta fluorescencije što označava značajan porast Ca^{2+} iona u citosolu koji se vežu u fluorescentni kompleks s Fuo-3 zarobljenim u stanici. Sljedeće dodavanje nerolidola je izvršeno 120 sekundi nakon prvog injektiranja. Dodan je također alikvot od 10µL otopine nerolidola, ovoga puta koncentracije 12.5 mg/mL dajući konačnu koncentraciju od 0,3384 mg/mL u uzorku. Na citogramu se vidi lagan porast fluorescencije, ali mnogo manji od prvog pretpostavljajuću da je tretiranje stanica prvom koncentracijom ispraznilo većinu kalcija iz endoplazmatskog retikuluma. Nakon 120 sekundi, to jest 330 sekundi nakon početka mjerenja dodano je još 10µL otopine koncentracije 25 mg/mL povećavajući koncentraciju nerolidola unutar uzorka na 0,8101 mg/mL. Na grafu se ponovno vidi mali pik označavajući dodatno povećanje unutarstaničnog kalcija.



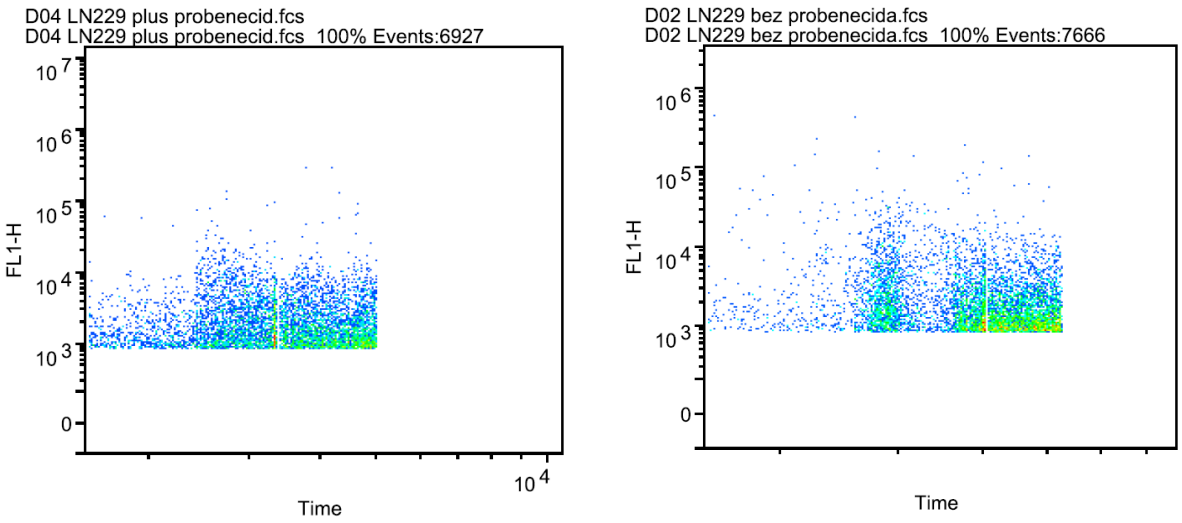
Slika 13: Citogram prikazuje povišenje unutarstanične razine Ca^{2+}preko povišenja flurescencije u stanicama uzorka na protočnom citometru Accuri C6. Podaci s drugog citograma dobiveni su na stanicama koje su tretirane probenecidom, blokatorom ionskih kanala koji je pomogao zarobiti boju Fluo-3 AM unutar stanice za vrijeme eksperimenta da bi dobili vjerodostojnije rezultate



Slika 14: Prikaz skokova s vremenima primjene odgovarajućih koncentracija nerolidola



Slika 15: Prikaz skokova s vremenima primjene odgovarajućih koncentracija nerolidola kod uzorka tretiranim probenecidom



Slika 16: Prikaz citograma LN229 stanične linije koje smo proveli kroz isti postupak radi usporedbe rezultata

3.2. Rasprava

Ovim eksperimentom je dokazano da se koncentracija unutarstaničnog kalcija povećava djelovanjem prirodnog organskog spoja seskviterpena nerolidola. Primjena prve koncentracije od 5 mg/mL u 10µL na 0,5 mL stanica rezultirajući konačnom koncentracijom od 0,098 mg po mL uzorka dala je najveći skok što ukazuje da je koncentracija nerolidola bila dovoljna da isprazni gotovo cijeli endoplazmatski retkulum. Daljnji skokovi ukazuju na dodatno pražnjenje ER potvrđujući njegov utjecaj na taj organel. Nije poznato da li nerolidol djeluje direktno na IP_3R i RyR receptore koji služe za pražnjenje Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma ili se veže na neki vanjski receptor koji potiče kaskadu signalnih reakcija do aktivacije tih receptora na endoplazmatskom retikulumu. Da bi smo se uvjerili, potrebno bi bilo izmjeriti unutarstanični cAMP TCCSUP stanične linije nakon primjene nerolidola. Ukoliko bi se primjenom nerolidola koncentracija cAMP-a mijenjala, to bi ukazivalo na njegovu aktivaciju kao sekundarnog glasnika u prenošenju signala sa stanične membrane na receptore endoplazmatskog retikuluma.

3.3. Posljedice

Povećana razina unutarstaničnog kalcija pražnjenjem endoplazmatskog retikuluma narušava njegovu homeostazu kao važne signalne molekule i kofaktora mnogih enzima rezultirajući staničnim stresom. Mitohondriji koriste Ca^{2+} za proizvodnju ATP-a pa se on konstantno pumpa unutar i van pomocu mitohondrijskog kalcij uniportera (MCU) i natrij kalcij izmjenjivača (NCX). Povećana koncentracija kalcija u stanici dovodi do povećanog unosa kalcija u mitohondrije narušavajući njegovu homeostazu. (21) Visoka koncentracija kalcija dovodi do depolarizacije mitohondrija između pozitivno nabijenog međumembranskog prostora i negativno nabijenog matriksa što pogoduje otpuštanju citokroma c. (22) Kada citokrom c dođe u citoplazmu, aktivira signalni put kaspaza koji vodi do apoptoze, dobro opisan ciklus programirane smrti stanice. Taj mehanizam je demonstriran u mnogim radovima raznih autora. (23,24)

4. ZAKLJUČAK

Nerolidol značajno potiče unutarstanično pražnjenje zaliha Ca^{2+}iz endoplazmatskog retikuluma pri koncentraciji od 0,098 mg/mL na 10^6 stanica te se pražnjenje povećava s koncentracijama od 0,3384 mg/mL i 0,8101 mg/mL. Nerolidol direktno ili indirektno preko membranskih proteina djeluje na RyR i IP_3R receptore na endoplazmatskom retikulumu aktivirajući pupanje kalcija u unutarstanični prostor. Unutarstanično povećanje razine kacija remeti njegovu homeostazu i potiče put apoptoze kako je navedeno u znanstvenim radovima pa možemo smatrati da ovaj rad daje prostora za daljnja ispitivanja utjecaja nerolidola na ovu staničnu liniju.

5. LITERATURA

1. *I. Filipović, S. Lipanović* **,** Opća i anorganska kemija, **IX**., Zagreb, ŠKOLSKA KNJIGA, (1995.)

2. *Lius Pauling Institute***,** Calcium, Oregon State University. Corvallis, Oregon, (2017.)

3. *Brini, Marisa, Call, Tito, Ottolini, Denis, Carafoli, Ernesto,* Chapter 5 Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling, (2013.)

4. *A. Cooper,* Biophysical Chemistry, RSC PUBLISHING, (2004.)

5. *Chaochu Cuia, Robert Merritt, Liwu Fua, Zui Pan,* Targeting Calcium Signaling in Cancer Therapy. China, (2016.)

6. *L. Stryer, J.M. Berg, J.L. Tymoczko,* Biokemija, **VI**., Školska Knjiga, (2013.)

7. *Weng-Keong Chan, Loh Teng-Hern Tan, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee and Bey-Hing Goh,* Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faced Pharmacological and Biological Activities. Asia, (2016.)

8. *International Agency for Research on Cancer.* Cancer statistics, World Health Organization.

9. *Ryabchenko***,** Cytotoxic properties of Selected Sesquiterpene Alcohols on Human Cervix Carcinoma Cell Lines, Journal of Essential Oil Bearing Plants, (2011.), 14(3), (316–319.)

10. *Ryabchenko***,** Volatile isoprenoid constituens of fruits, vegetables and herbs comulativly suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **X** ., Cancer letters, (2002.)

11. E. *Costa, L. Menezes, S. Rocha, I. Baliza, R. Dias, C. Rocha, M. Soares, D. Bezerra,* Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of Zornia Brasiliensis, Planta medica, **81**(07), (2015.), (563–567.)

12. *Hanušova,* The effect of Myrica rubra essential oil and its components α-humulene and trans-nerolidol on adhesion and apoptosis of colorectal cancer cells, Can. Cell Microenviron, (2.) (2015.)

13. *A. Assinger, I. Volf, D. Schmid,* A Novel, Rapid Method to Quantify Intraplatelet Calcium Dynamics by Ratiometric flow Cytometry., Vienna, Austria : Institute of Physiology, Center of Physiology and Pharmacology, Medical University of Vienna.

14. *A. Vines, Gethin J. McBean, A. Blanco-Fernandez.* A Flow-Cytometric Method for Continuous Measurement of Intracellular Ca^{2+} Concetracion. Dublin, Ireland, University College Dublin.

15. *Lambert, DG.* Calcium Signaling Protocols, Humana Press, (2006.)

16. *T. Gamsjäger* Flow Cytometry of Intracellular Calcium in Platelets, Grin, (2012.)

17. *Haugland, RP.* Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, (2010.)

18. *V. Morra, P. Davit, P. Capra, M. Vincenti, A. Di Stilo, F.Botrè,* Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine: Development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis. (1136), J Chromatogr A., (2006.)

19. *W.Silverman, S. Locovei, G. Dahl,* Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels, (2008.)

20. *D. Butler.,* Wartime tactic doubles power of scarce bird-flu drug. **(438)**, Nature, (2005.)

21. *D.E.Clapham,* Calcium Signaling. **80(2)**, Cell, (1995.), (259-268)

22. *Mengzhao Zhang, Hongxia Du, Zhixin Huang, Pu Zhang, Yangyang Yue, Weiyi Wang, Wei Liu, Jin Zeng, Jianbin Ma, Guanqiu Chen, Xinyang Wang, Jinhai Fan.* Thymoquinone induces apoptosis in bladder cancer cell via endoplasmic reticulum stress-dependent mitochondrial pathway. (65-75), Chemico-Biological Interactions, (2018.) (292.)

23. *L. Tantral, K. Malathi, S. Kohyama, M. Silane, A. Berenstein, T. Jayaraman,* Intracellular calcium release is required for caspaze-3 and -9 activation. 22(1), (35-40), Cell Biocemistry and function, (2003.), (35-40.)

24. *R.V. Rao, E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L.M. Ellerby, H.M. Ellerby, D.E. Bredesen,* Coupling Endoplasmatic Reticulum Stress to the Cell Death Program. 276(36), Journal of Biological Chemistry, (2001.) (33869-33874.)