Antiproliferacijski utjecaj valencena na dvije stanične linije karcinoma

Perović, Dorotea

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:167:793793

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

ANTIPROLIFERACIJSKI UTJECAJ VALENCENA NA DVIJE STANIČNE LINIJE KARCINOMA

ZAVRŠNI RAD

DOROTEA PEROVIĆ

Matični broj : 411

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

KEMIJA

ANTIPROLIFERACIJSKI UTJECAJ VALENCENA NA DVIJE STANIČNE LINIJE KARCINOMA

ZAVRŠNI RAD

DOROTEA PEROVIĆ

Matični broj: 411

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF VALENCENE ON TWO CARCINOMA CELL LINES

BACHELOR THESIS

DOROTEA PEROVIĆ

Parent number: 411

Split, September 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Prediplomski studij kemije

Znanstveno područje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc. dr. sc. Mila Radan

ANTIPROLIFERACIJSKI UTJECAJ VALENCENA NA DVIJE STANIČNE LINIJE KARCINOMA

Dorotea Perović, 411

Sažetak:
Tumor je naziv za abnormalnu nakupinu tkiva koja može biti maligna ili benigna. Maligni oblik tumora epitelnog podrijetla naziva se karcinom. Rak pluća i mokraćnog mjehura jedni su od najčešćih oblika tumora u svijetu i Hrvatskoj. Češće se javljaju kod muškaraca, ali i žene oboljevaju od njih. Javljaju se u osoba starijih od 60 godina i ukoliko se dijagnosticiraju u ranoj fazi, postoji šansa za izlječenje. Terpenoidi su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodna mirisa. Karakteristični su sastojci većine prirodnih i umjetnih mirisnih tvari. Osobito su zanimljivi seskviterpenoidi, terpenoidi izvedeni iz tri izoprenske jedinice koji sadrže 15 ugljikovih atoma. U ovom radu koristili smo seskviterpenoid valencen, karakterističan za aromucitrusa.
Odabrani seskviterpenoid koristio se radi ispitivanja njegovog antiproliferacijskog učinka na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura i staničnu liniju A549 karcinoma pluća. Antiproliferacijsko djelovanje ispitano je MTT-testom. Dobiveni rezultati pokazuju jače antiproloferacijsko djelovanje valencena na staničnu liniju T24 i to osobito pri koncentraciji 0,5 mM. Pri nižim koncentracijama u obje stanične linije antiproliferacijsko djelovanje je značajno smanjeno.
Ključne riječi : karcinom mokraćnog mjehura, karcinom pluća, valencen, antiproliferacijski učinak, MTT – test

Rad sadrži: 36 stranica, 11 slika, 7 tablica, 30 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski
Sastav Povjerenstva za obranu: 1. Izv. prof. Olivera Politeo – predsjednik
2. Doc. dr. sc. Danijela Skroza – član
3. Doc. dr. sc. Mila Radan - član-mentor

Datum obrane: 27.9.2019.
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) 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 study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.19.

Mentor: Doc. dr. sc. Mila Radan

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF VALENCENE ON TWO CARCINOMA CELL LINES

Dorotea Perović, 411

Abstract:
Tumor is a word for abnormal set of cells which can be malignant or benign. Malignant tumors that are developed form epithelilal are called carcinoma. Lung and urinary bladder cancer are one of the most common types of cancer in the world and so in Croatia. They are more common in men, but women also suffer from them. They usually occur with people older than 60 years old and if it is diagnosed in early phase, there is a chance of successful treatment and recovery. Terpenoids are volatile unsaturated hydrocarbons with pleasant smell. They're components of majority of natural and artificial odoriferous substances. Of particular interest are sesquiterpenoids which are defined as terpenoids derivated from three isoprene units which include 15 carbon atoms. In this paper we have used sesquiterpenoid valencene which is characteristic of citrus aroma. Selected sesquiterpenoid has been used for analysis of its antiproliferative effect on cell line T24 of urinary bladder cancer and cell line A549 of lung cancer. Antiproliferative effect has been tested by MTT test. Results show strong antiproliferative effect of valencene on cell line T24, especially at concentration level of 0,5 mM. At lower concentrations antiproliferative effect is significantly reduced in both cell lines.
Keywords: urinary bladder cancer, lung cancer, valencene, antiproliferative effect, MTT test

Thesis contains: 36 pages, 11 figures, 7 tables, 30 references
Original in: Croatian
Defence committee: 1. Olivera Politeo - PhD, associate prof. - chair person
2. Danijela Skroza - PhD, assistant prof - member
3. Mila Radan – PhD, assistant prof . - supervisor
Defence date: 27.9.2019.
Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od svibnja do rujna 2019.godine.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mili Radan koja mi je svojim savjetima i prenesenim znanjem pomogla u izradi ovog završnog rada te obradi eksperimentalnih podataka.

Hvala mojim kolegama i prijateljima koji su moje studiranje učinili ljepšim i ugodnijim.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, svim odricanjima i razumijevanju.

SAŽETAK

Tumor je naziv za abnormalnu nakupinu tkiva koja može biti maligna ili benigna. Maligni oblik tumora epitelnog podrijetla naziva se karcinom. Rak pluća i mokraćnog mjehura jedni su od najčešćih oblika tumora u svijetu i Hrvatskoj. Češće se javljaju kod muškaraca, ali i žene oboljevaju od njih. Javlja se u osoba starijih od 60 godina i ukoliko se dijagnosticiraju u ranoj fazi, postoji šansa za izlječenje.

Terpenoidi su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodna mirisa. Karakteristični su sastojci većine prirodnih i umjetnih mirisnih tvari. Osobito su zanimljivi seskviterpenoidi, terpenoidi izvedeni iz tri izoprenske jedinice koji sadrže 15 ugljikovih atoma. U ovom radu koristili smo seskviterpenoid valencen, karakterističan za aromu citrusa.

Odabrani seskviterpenoid koristio se radi ispitivanja njegovog antiproliferacijskog učinka na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura i staničnu liniju A549 karcinoma pluća. Antiproliferacijsko djelovanje ispitano je MTT-testom. Dobiveni rezultati pokazuju jače antiproloferacijsko djelovanje valencena na staničnu liniju T24 i to osobito pri koncentraciji 0,5 mM. Pri nižim koncentracijama u obje stanične linije antiproliferacijsko djelovanje je značajno smanjeno.

Ključne riječi: karcinom mokraćnog mjehura, karcinom pluća, valencen, antiproliferacijski učinak, MTT – test

SUMMARY

Tumor is a word for abnormal set of cells which can be malignant or benign. Malignant tumors that are developed form epithelilal are called carcinoma. Lung and urinary bladder cancer are one of the most common types of cancer in the world and so in Croatia. They are more common in men, but women also suffer from them. They usually occur with people older than 60 years old and if it is diagnosed in early phase, there is a chance of successful treatment and recovery.

Terpenoids are volatile unsaturated hydrocarbons with pleasant smell. They're components of majority of natural and artificial odoriferous substances. Of particular interest are sesquiterpenoids which are defined as terpenoids derivated from three isoprene units which include 15 carbon atoms. In this paper we have used sesquiterpenoid valencene which is characteristic of citrus aroma.

Selected sesquiterpenoid has been used for analysis of its antiproliferative effect on cell line T24 of urinary bladder cancer and cell line A549 of lung cancer. Antiproliferative effect has been tested by MTT test. Results show strong antiproliferative effect of valencene on cell line T24, especially at concentration level of 0,5 mM. At lower concentrations antiproliferative effect is significantly reduced in both cell lines.

Keywords: urinary bladder cancer, lung cancer, valencene, antiproliferative effect, MTT test

SADRŽAJ

UVOD....1

1. OPĆI DIO....2

1.1. TUMORI....2

1.1.1. Karakteristike tumora....2

1.2. KARCINOM PLUĆA....3

1.3. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA....6

1.4. TERPENOIDI....8

1.4.1. Biosinteza terpenoida....9

1.4.2. Podjela terpenoida....10

1.4.3. Seskviterpenoidi....11

1.4.4. Valencen....11

2. EKSPERIMENTALNI DIO....13

2.1. Stanične linije....13

2.2. MTT test....14

2.3. Postupak....16

3. REZULTATI....17

3.1. Stanična linija T24 karcinoma mokaćnog mjehura....17

3.2. Stanična linija A549 karcinoma pluća....19

4. RASPRAVA....21

5. ZAKLJUČAK....22

6. LITERATURA....23

UVOD

Laboratorijske dijagnostičke pretrage iz područja medicinske biokemije obuhvaćaju vrlo širok raspon mjerenja različitih sastojaka krvi i drugog biološkog materijala metodama poput spektrometrije, visokotlačne tekućinske kromatografije, plinsko-masene kromatografije, magnetske rezonancije i sl. Biokemijske pretrage primjenjuju se u internoj medicini za prepoznavanje ranih znakova bolesti kada klinički znakovi bolesti nisu izraženi, dijagnozi i diferencijalnoj dijagnozi bolesti, procjeni težine bolesti, praćenju učinka liječenja te kod različitih istraživanja u području interne medicine, primjerice pri ispitivanju novih lijekova ili terapijskih postupaka. Ovakvim postupcima tj. pretragama dolazi se do otkrića i dijagnosticiranja tumora.[1]

Rak, neoplazma ili novotvorina (*grč. neos – nov, plasia – rast*) je općeniti pojam za mnoge bolesti kod kojih se abnormalne stanice dijele bez kontrole te su u stanju napasti zdravo tkivo. Rak je uobičajeni narodni naziv za sve zloćudne tumore. Današnje spoznaje ukazuju da ne postoji jedinstvena bolest, nego veliki broja različitih bolesti pa razlikujemo više od 100 različitih vrsta rakova.

Proliferacija se odnosi na proces povećanja broja stanica kako bi se stvorilo tkivo potrebne veličine. Postoje razni testovi kojima se mjeri proliferacija, vidljivost i citotoksičnost a služe kako bi se ustanovio odgovor i stanje stanica u staničnoj kulturi koje se tretira različitim spojevima. Odgovarajući test se odabire na temelju broja i vrste stanica te ovisi o očekivanom rezultatu. Jedan od takvih testova je MTT- test, test za homogenu održivost stanica razvijen za pločicu sa 96 jažica.

U ovom radu je ispitano antiproliferacijsko djelovanje seskviterpena valencena na stanične linije T24 karcinoma mokraćnog mjehura i staničnu liniju A549 karcinoma pluća. Za ispitivanje je korišten MTT- test i uzorci različitih koncentracija čija je antiproliferacijska aktivnost ispitana u različitim vremenskim intervalima (4 h, 24 h, 48 h i 78 h).

1. OPĆI DIO

1.1. TUMORI

Tumor je oteklina ili nabreknuće, koje je pri upali uzrokovano hiperemijom, eksudacijom, emigracijom leukocita, ekstravazacijom pa i obilnim bujanjem granulacijskog tkiva. Za jednu od najprikladnijih definicija uzima se ona Saltykowljeva koja glasi: Tumor je lokalno, atipično, autonomno, neprestano i nesvrsishodno bujanje tkiva. Nabreknuće može biti uzrokovano i drugim patološkim procesima kao što su krvarenje i hematom. Onkolozi i drugi kliničari dijele tumore na solidne (rak nekog organa, rak tkiva) i hematološke tumore (rak limfnog/hematopoetskog tkiva). Oba tipa tumora su slični po nekontroliranom rastu abnormalnih stanica, a općenito, solidni tumori tvore izraslinu ili višestruke izrasline, a hematološki tumori svojim rastom i umnožavanjem ugrožavaju normalne stanice koje kruže tijelom putem krvotoka. Normalno tijelo održava sustave provjera i ravnoteže rasta stanica, tako da se stanice dijele samo kada je to potrebno. Poremećaj tog sustava provjera i ravnoteže na rast stanica rezultira nekontroliranim dijeljenjem ili proliferacijom stanica koje s vremenom stvore masu koja se zove tumor.[2]

1.1.1. Karakteristike tumora

Tumore možemo prema biološkom ponašanju podijeliti na benigne i maligne. Također, postoje i tumori čija je malignost znatno manja ili se može reći da je njihova benignost pogoršana nekim osobinama koje su karakteristika malignih. Takve tumore nazivamo semimalignim. Osnovna karakteristika benignih tumora je da nisu štetni za svog domaćina osim mogućom lokalizacijom te se obično mogu ukloniti i ne šire se na druge dijelove tijela. S druge strane maligni tumori su pogibeljni za organizam nosilac, napadaju i druga tkiva u tijelu, ulaze u krvotok ili limfni sustav, a zatim na drugim mjestima u tijelu stvaraju nove tumore. Ovaj proces širenja naziva se metastaziranje ili presađivanje tumora. Metastaze ili presadnice podrazumijevaju aktivno ili pasivno prenošenje tumorskih stanica po organizmu i to, u početku, iz primarnog tumora u neka

druga udaljena područja organizma, odnosno razvitak tumorske kolonije u toj udaljenoj regiji. Metastaza nesumnjivo označuje tumor kao zloćudni te bolesnici s ovim stadijem bolesti imaju značajno ograničene mogućnosti liječenja i time lošiju prognozu. Metastatske stanice izgledom i ponašanjem odgovaraju stanicama primarnog sijela raka. Primjerice, ako se rak dojke proširi na pluća on je još uvijek rak dojke i naziva se metastazirani rak dojke na plućima. Stanice raka na plućima će se ponašati kao i stanice u prvobitnom raku dojke. Širenje stanice raka i stvaranje metastaza se najčešće kroz krvotok i limfni sistem ili kroz oboje. Osim toga, širenje je moguće i kroz tjelesne šupljine i neposredno presađivanjem (mehanički). Razlika je također i u brzini rasta, pa tako benigni tumori rastu polagano i najčešće ekspanzivno, a maligni brzo i rast im je infiltrativan i destruktivan. Maligni se tumori najčešće javljaju kod ljudi starije životne dobi, što osobito vrijedi za karcinom koji je najčešći tumor.[3]

Karcinom je složena bolest u kojoj stanice više ne odgovaraju u cijelosti na signale unutar tkiva u kojem reguliraju staničnu diferencijaciju, preživljavanje, proliferaciju i smrt. Kao rezultat toga, ove stanice se nakupljaju unutar tkiva, dovodeći do lokalnog oštećenja i upale.[4]

1.2. KARCINOM PLUĆA

Naziv karcinom pluća koristi se za zloćudne tumore koji nastaju iz stanica dišnog epitela. Karcinom pluća najučestalija je lokalizacija maligne bolesti u muškaraca, a pri vrhu je učestalosti i kod žena. Vodeći je uzrok smrti među svim karcinomima. Rak pluća ima tendenciju širenja ili metastaziranja vrlo rano nakon formiranja, što ga čini vrlo opasnim po život i jedan je od oblika raka koje je najteže liječiti. Mjesta najčešćih metastaza su nadbubrežne žlijezde, jetra, mozak i kosti, ali to može biti i bilo koji drugi dio tijela. Krajem 19. i početkom prošlog stoljeća bio je rijetka bolest, međutim nagli porast počinje dvadesetih godina prošlog stoljeća i od tada se udvostručava svakih petnaest godina.[5]

U Hrvatskoj su karcinom pluća i bronha najzastupljeniji kod muškaraca dok su kod žena na trećem mjestu. Rizik obolijevanja za dob između 30 i 74 g. je oko 14% za muškarce,

a manji od 10% za žene. Bolest se najčešće javlja kod muškaraca nakon četrdesete godine života, i to pušača. U Europi je 1990. g. zabilježeno 150 000 novih slučajeva raka pluća u muškaraca, što čini 22% svih slučajeva raka, a čak 29% svih smrti uzrokovanih karcinomima. U žena rak pluća čini 5% svih karcinoma, a odgovoran je za 9% mortaliteta uzrokovana tumorima. Kod 25% ljudi koji su dobili od raka pluća, rak se otkrije slučajno na rutinskoj RTG snimci pluća (slika 1.) ili CT. Takvi bolesnici s malim karcinomom često ne navode nikakve simptome ni znakove bolesti. [6]

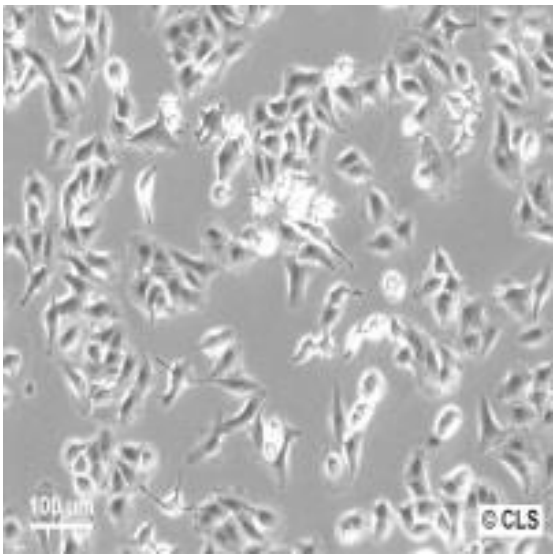
Rendgenska snimka pluća je najčešći prvi dijagnostički korak kada su prisutni simptomi raka pluća. RTG snimka može otkriti sumnjivo područja u pluća, ali ne može utvrditi je li to područja maligne prirode. Konkretno, kalcificirani čvorovi u plućima ili benigni tumori koji se nazivaju hamartomi mogu se vidjeti na RTG snimci i oponašaju rak. CT-om (kompjuterizirana tomografija) se mogu skenirati prsni koš, trbuh i/ili mozak i tako ispitati stanje u tim organima i dobiti dovoljno informacija o opsegu ili lokalizaciji tumora. CT je također postupak koji uključuje ionizirajuće zračenje, ali koji uz pomoć računala kombinira više slika i tako generira presjek ljudskog tijela. Jedna od prednosti CT je da je osjetljiviji od standardnih RTG snimaka pluća u otkrivanju kvržica u plućima, to jest, pokazat će više i preciznije. Međutim, CT izlaže bolesnika većem zračenju u odnosu na RTG pretragu. [7]



Slika 1. Rendgen grudnog koša – prikaz raka pluća[8]

Smatra se da na razvoj bolesti utječu brojni čimbenici. Najznačajnija povezanost dokazana je između pušenja i karcinoma pluća još 1940. g. Oko 85% karcinoma pluća razvija se u pušača i bivših pušača. Za buduća kretanja morbiditeta i mortaliteta od raka pluća važna je činjenica da je pušenje sve više prisutno u mlađim dobnim skupinama, pa se i karcinom pluća sve češće dijagnosticira u mlađih osoba. Dim cigarete identificiran je kao glavni rizični činilac za razvoj svih češćih histoloških tipova karcinoma bronha i pluća: karcinoma malih stanica, planocelularnog, velikih stanica i adenokarcinoma. Rizik za razvoj karcinoma ovisi o broju popušenih cigareta na dan, dobi u kojoj je osoba počela pušiti i o duljini pušenja. Nakon prestanaka pušenja rizik od oboljenja ostaje povišen i do 15 g. te se nikada neće izjednačiti sa rizikom osobe koja nikad nije pušila. Postoje pretpostavke da se rak razvija i na ožiljcima pluća, nakon preboljene tuberkuloze ili inhalacije fibrogenih čestica. Hormoni također mogu utjecati na razvoj adenokarcinoma pluća u žena stoga je rizik povećan kod žena koje uzimaju estrogene. Također, kancerogeni spojevi pronađeni su ispušnim plinovima automobila, industrije i termoelektrana. Postoji povezanost između izloženosti azbestu i karcinoma. Prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama i kolesterolom, a siromašna vitaminima A,C i E, β-karotenom, selenom i cinkom također povećava rizik. Dokazana je i genetska uvjetovanost kod bolesnika s nasljednom mutacijom rb- i ras-gena.[9]

Plućni karcinom obuhvaća heterogenu skupinu tumora epitelnog podrijetla s različitim stupnjevima maligniteta. Najčešći tip je adenokarcinom koji se javlja u 35% slučajeva. U ovom radu ispitivanja smo vršili na stanicama karcinoma A549 (slika 2.), alveolarnim epitelnim stanicama. Ovaj tip karcinoma se javlja u perifernim dijelovima pluća te u području ožiljaka nakon upalnih procesa u plućnom parenhimu.



Slika 2. Mikroskopski prikaz A549 stanične linije [10]

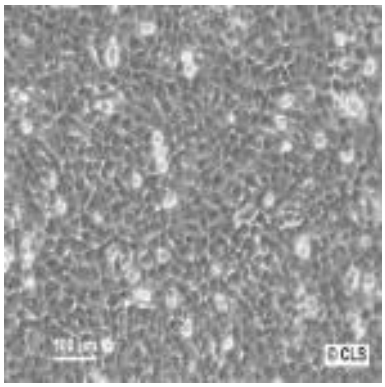
1.3. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

U mokraćnom mjehuru tumori su relativno česti, radi se o *papiloma molle* i o *karcinomima*. *Papiloma molle* su benigne izrasline koje se ne šire po tijelu te ne rastu agresivno. Izrasline se formiraju samo u određenim vrstama tkiva. Često su poznate i kao bradavice kada dođu do kože. Mogu se formirati na površini vlažnih tkiva koje oblažu unutrašnjosti tijela, poput crijeva ili dišnih putova. Iako sami papilomi nisu kancerogeni povezani su s visokim rizikom od oboljenja od raka te mogu uzrokovati probleme i nelagodu u području gdje se nalaze. Sekundarni tumori prvenstveno su karcinomi koji se direktno šire iz okolnih organa (cerviksa uterusa, prostate i rektuma). Izrasline u mjehuru nisu česte, na njih opada 5%. Mogu se pojaviti u svakoj životnoj dobi, ali su najčešći kod osoba nakon 40. g. te su zastupljeniji kod muškaraca.[11]

Provedenim istraživanjima došlo se do zaključka da su najugroženiji radnici industrijskih postrojenja, osobito oni koji su u doticaju sa bojama i anilinom poput soboslikara i ličilaca te željeznički strojovođe. Također, dugotrajno korištenje lijekova poput privina i benila povećavaju rizik od oboljenja. Prvi i najčešći simptom je bezbolna i povremena hematurija (u 75-85%). Disuričke smetnje (učestalo, bolno mokrenje, tenezmi) obično su izraz površne zahvaćenosti sluznice mjehura (papilarni

karcinom ili karcinom in situ). Uznapredovala bolest direktnim urastanjem uzrokuje opstrukciju mokrenja (hidronefrozu) ili stolice (opstipaciju), limfedem noge, bolne, opipljive mase u maloj zdjelici, ili metastazira u udaljene organe (kosti, pluća, jetra). Učestalo mokrenje javlja se zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili rjeđe, simptoma urinarne infekcije. Izrasline se lako prepoznaju cistoskopskom pretragom, međutim dijagnoza je često zakašnjela zbog kasnog odlaska pacijenta urologu. Sumnju na rak mjehura pobuđuje klinička slika. Dijagnostička obrada uključuje ultrazvuk, IVU (intravenska urografija) ili CT, cistoskopiju s biopsijom opaženih promjena. Za stupnjevanje mišićnoneinvazivnih novotvorina (70–80% svih tumora) dovoljna je cistoskopija s biopsijom. Za druge zloćudne tumore treba snimiti CT trbuha i zdjelice i napraviti radiogram prsnog koša, kako bi se utvrdila proširenost tumora i eventualne presadnice. Većina mjehurovih novotvorina je urotelnog podrijetla te ima veliku sklonost ponovnom pojavljivanju s mogućnošću da se zloćudno izrode i da tvore metastaze. Nakon postavljanja dijagnoze, liječenje se odvija konzervativno i operativno. uz redovite kontrole svakih 3–6 mjeseci radi otkrivanja rasta ili ponovnog javljanja tumora.[12]

Prema naravi bolesti, njezinu tijeku i načinu liječenja razlikujemo površinski karcinom (ca. in situ - CIS i papilarni) i mišićno-invazivni oblik. CIS je obično agresivan, slabo diferenciran, ekstenzivan i nalazi se na više mjesta u mokraćnom sustavu. Mnoge probleme uzrokuju stanične linije raka mokraćnog mjehura T24 (slika 3.), koje se pojavljuje u mnogim drugim vrstama stanica raka. Adrie van Bokhoven sa Sveučilišta Colorado u Denveru otkrio je da se ona može pojaviti među stanicama raka prostate, ali se i dvije godine nakon objavljivanja njegova otkrića ta vrsta stanica u znanstvenim publikacijama i dalje opisuje kao stanica prostate.[13]



Slika 3. Stanične linije T24[14]

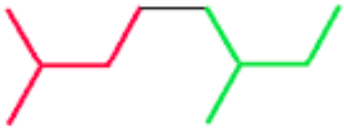
1.4. TERPENOIDI

Terpenoidi (sinonimi: terpeni i izoprenoidi) su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodna mirisa. Ime terpenoid ili terpen izvedeno je iz činjenice da su prvi članovi ove klase izolirani iz terpentina, (lat. balsamum terebinthinae), hlapljivog ulja, tj. smole borova drveta (Pinaceae), čiji je glavni sastojak α-pinen. Terpen ne označava hlapivo ulje već balzam, gustu smolnu izlučevinu nekih četinjača iz koje se tek postupkom destilacije dobiva hlapljiva komponenta nazvana terpentinsko ulje, a zaostaje kruti ostatak zvan kolofonij. U prirodi su vrlo rasprostranjeni (oko 30 000 spojeva), uglavnom u biljnom svijetu.[2°] Znanstveno su i tehnički vrlo važni, jer su karakteristični proizvodi životnih procesa i sastojci većine prirodnih i umjetnih mirisnih tvari. Mnogi su važni u medicini (npr. borneol, kamfor, mentol) te se uvelike rabe u parfemima i kao dodatci hrani. Ubrajaju se u tzv. jednostavne lipide koji nastaju polimerizacijom izopentenil-difosfata.

Osnovni strukturni element je izopren ili 2-metilbuta-1,3-dien (slika 5.). Izoprenske jedince povezane su po načelu „glava na rep“ (slika 6.). Svi terpenoidi se dobivaju ponovljenom kondenzacijom razgranatih peteročlanih ugljikovih jedinica na izopentanskom skeletu. Ti monomeri se odnose na izoprenske jedinice jer konačnom razgradnjom mnogih terpenoidnih supstanca nastaje plinoviti alken izopren.



Slika 4. Izoprenska jedinica te osnovni strukturni element[16]



rep-glava

Slika 5. Načelo „glava na rep“[17]

1.4.1. Biosinteza terpenoida

Terpenoidi su produkti mevalonskog biosintetskog puta, biosintetskog puta čiji je središnji međuprodukt mevalonska kiselina. Prekursor mevalonskog biosintetskog puta je acetil-koenzim A. Mevalonska kiselina nastaje iz 3 molekule acetil-CoA. Izopren nije uključen u biosintezu terpenoida već biokemijski aktivna izoprenska jedinica - njegov difosfatni (pirofosfatni) ester, izopentenil-difosfat, IPP.

Biosinteza svih terpenoida iz jednostavnih, primarnih metabolita može se podijeliti u četiri glavna koraka:

a) sinteza osnovnog prekursora izopentenil difosfata, IPP;

b) ponovljene adicije IPP pri čemu nastaje serija prenil difosfatnih homologa koji služe kao neposredni prekursori različitih klasa terpenoida;

c) detaljnije razrađivanje ovih alilnih prenil difosfata specifičnim terpenoidnim sintazama što rezultira različitim terpenoidnim skeletima;

d) sekundarne enzimske modifikacije na skeletima (najčešće su to redoks reakcije).[18,19]

1.4.2. Podjela terpenoida

Podijela terpenoida prema broju izoprenskih jedinica prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Podjela terpenoida[20]

Naziv	**Oznaka**	**Broj izoprenskih jedinica**
Semiterpenoidi	C_5	1
Monoterpenoidi	C_{10}	2
Seskviterpenoidi	C_{15}	3
Diterpenoidi	C_{20}	4
Sesterterpenoidi	C_{25}	5
Triterpenoida	C_{30}	6
Tetraterpenodi	C_{40}	8
Politerpenoidi	$(C_5)_n$	N

Terpeni mogu biti: alifatski (aciklički, ciklički) i aromatski. Funkcijske skupine koje utječu na raznolikost terpenoida dijelimo na ugljikovodike i oksidirani derivate ugljikovodika poput alkohola, etera, fenola, karbonilnih spojeva (aldehidi i ketoni) te esteri.

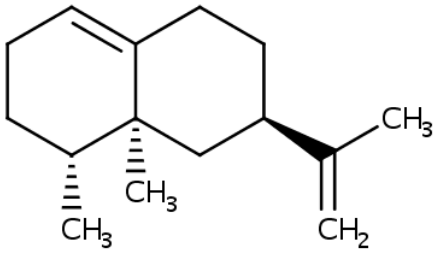
1.4.3. Seskviterpenoidi

Prema podacima iz tablice 1, seskviterpenoidi se mogu definirati kao terpenoidi izvedeni iz tri izoprenske jedinice koji sadrže 15 ugljikovih atoma. Mnogi seskviterpeni nađeni su u esencijalnim uljima. Brojni djeluju kao fitoaleksini, fenolni antibiotski spojevi koje biljke proizvode kada su ozlijeđene ili inficirane patogenim organizmima. Objašnjenju konstitucije seskviterpena najviše je pridonio L. Ružička. [21, 22]

1.4.4. Valencen

Valencen je seskviterpen koji je odogovoran za aromu i miris karakterističan za agrume te se najčešće dobiva iz naranče i to iz sorte valencije. Njegova biosinteza vrši se iz farnezil pirofosfata (FPP) enzimom CVS. Koristi se kao prekursor za dobivanje nootkatona, koji pridonosi aromi i okusu grejpa. [23]

Valencen je karbobiciklički spoj, seskviterpenoid i policiklički olefin. Njegova struktura se sastoji od 1,2,3,4,4a,5,6,7-oktahidronaftalena koji je supstituiran prop-1-en-2-il skupinom u položaju 3 i metilnim skupinama na poziciji 4a i 5 (3R, 4aS, 5R-dijastereoizomer) (slika 7.). Molekulska formula valencena je $C_{15}H_{24}$, a molekulska masa iznosi 204,36 Da. Točka vrelišta mu se nalazi na 123 $°C$. Prirodni valencen uglavnom se koristi u industriji pića zbog svoje arome citrusa. Također, koristi se i u parfemskoj industriji. Jedan od poznatijih proizvođača je tvornica Isobionics (Nizozemska), koja u svojoj ponudi nude dvije kvalitete valencena, onaj sa minimalnom čistoćom 75% i onaj od 80%.[24,25]



Slika 6. Struktura valencena[26]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Stanične linije

Tijekom eksperimentalnog djela, ispitivanja smo vršili na karcinomskim staničnim linijama T24 i A549. U niže navedenim tablicama prikazanu su karakteristike korištenih linija.

Tablica 2. Karakteristike stanične linije T24[27]

Organizam	**Homo sapiens, čovjek**
Tkivo	mokraćni mjehur
Forma proizvoda	Smrznuto
Morfologija	Epitelna
Obilježja kulture	Adherentna
Bolest	Karcinom prijelaznih stanica
Dob i spol	81 godina, žena

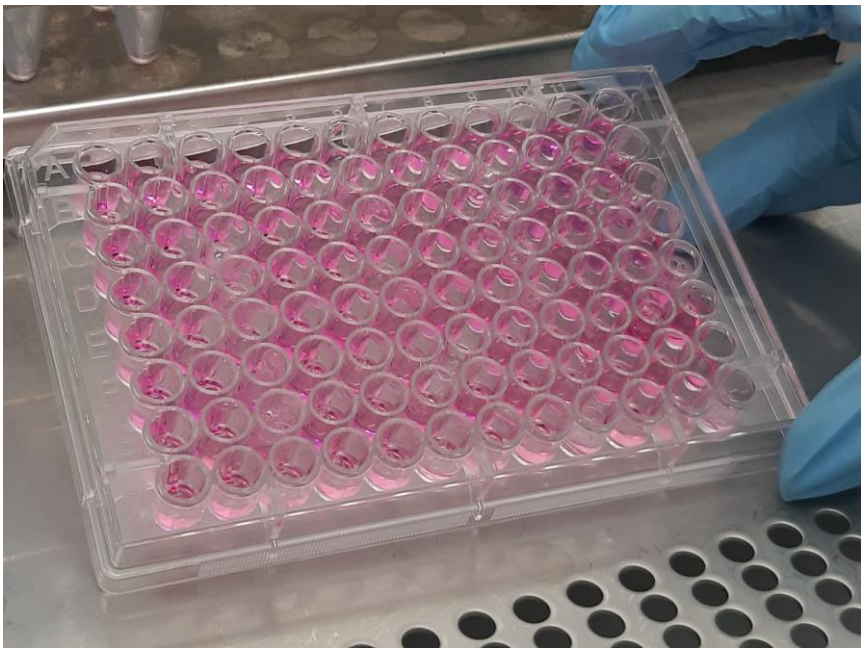
Tablica 3. Karakteristike stanične linije A549[27]

Organizam	Homo sapiens, čovjek
Tkivo	Pluća
Forma proizvoda	Smrznuto
Morfologija	Epitelna
Obilježje kulture	Adherentna
Bolest	Karcinom
Dob i spol	58 godina, muškarac

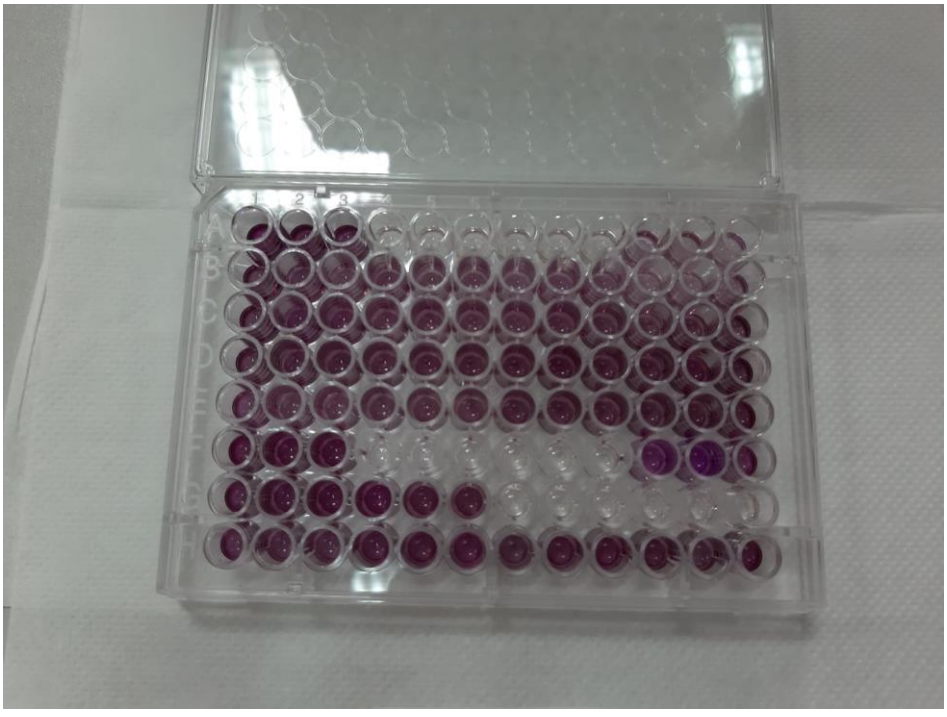
2.2. MTT test

Kvantitativno određivanje broja preživjelih stanica potrebno je neovisno o vrsti stanica i načinu ispitivanja. Postoje različite metode koje se mogu koristiti za procjenu broja živih eukariotskih stanica. Jedna od tih metoda je MTT test. MTT test citotoksičnosti je *in vitro* je metoda pogodna za procjenu održivosti stanice u doticaju s biomaterijalom. Glavne karakteristike ove metode su njena jednostavnost, točnost i brza detekcija toksičnosti te je koristan alat u procjeni rizika na ljudsko zdravlje. Radi se o kolorimetrijskoj metodi za ispitivanje stanične metaboličke aktivnosti uz bojanje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT) bojom. MTT test daje kvantitativnu procjenu citotoksičnosti i proliferacije (umnažanja) stanica mjerenjem aktivnosti mitohondrijskih enzima koji reduciraju tetrazonijeve soli (MTT) u kristale formazana koji se otapaju zakiseljenim izopropilnim alkoholom. Rezultirajuća ljubičasta otopina spektrofotometrijski se kvantificira na čitaču za mikrotitarske pločice. Veći intenzitet razvijene ljubičaste boje ukazuje na veći broj živih stanica.[28]

Žuti tetrazolin MTT se reducira u metabolički aktivnim stanicama. MTT testom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja jednom od ekstrakata biljaka, jer mrtve, odnosno metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Nastali unutarstanični ljubičasti formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski. Da bi se mogla očitati apsorbancija (na 570 nm) novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid) . Nakon jednog sata MTT je ispran i dodan je DMSO. Pločice su inkubirane 10 min na 37 °C uz treskanje. Apsorbancija je mjerena na 570 nm (signal) i 690 nm (pozadina).[29]



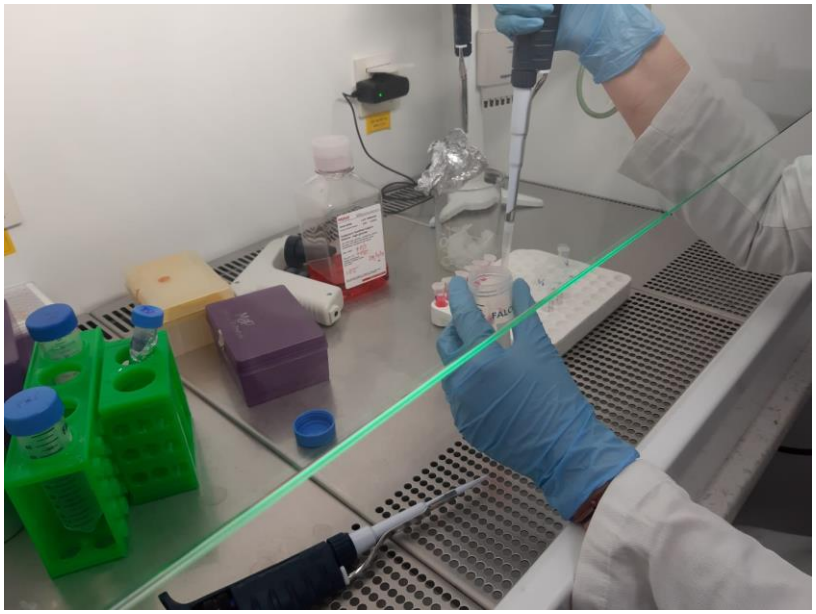
Slika 7. Izgled mikrotitarske pločice prije dodatka DMSO-a



Slika 8. Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO-a u otopinu MTT-a

2.3. Postupak

Stanične linije T24 karcinoma mokraćnog mjehura nakon odmrzavanja su uzgojene u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO_2, u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju. Jednak broj stanica nanesen je na pločicu sa 96 jažica u tri replikata uz dodatak navedenog medija do 100 µl te se ostave u inkubatoru 24h. Sljedećeg dana se medij isisa iz jažica te se dodaju tri ponavljanja uzorka otopljenog u mediju za svaku koncentraciju na mikrotitarsku pločicu, uključujući i kontrole u zadnje tri jažice koje ne sadrže uzorak. Uzorak se dodavao u koncentracijama 0,0625 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM i 1 mM. Tretirane stanice se inkubiraju na 4, 24, 48 i 72 h, dodaje se 100 µl MTT-a, te se uzorak ponovno inkubira minimalno sat vremena. Nakon toga MTT se isisa iz jažica, otapa se u 50 µl DMSO te se izmjeri apsorbancija na 570 nm. Iz dobivenih rezultata izračunamo polovicu maksimalne inhibitorske koncentracije (IC50) koja označava mjeru jačine tvari u inhibiranju specifične biološke ili biokemijske funkcije. Navedni postupak ponovili smo i za staničnu liniju A549 karcinom pluća.[3°]



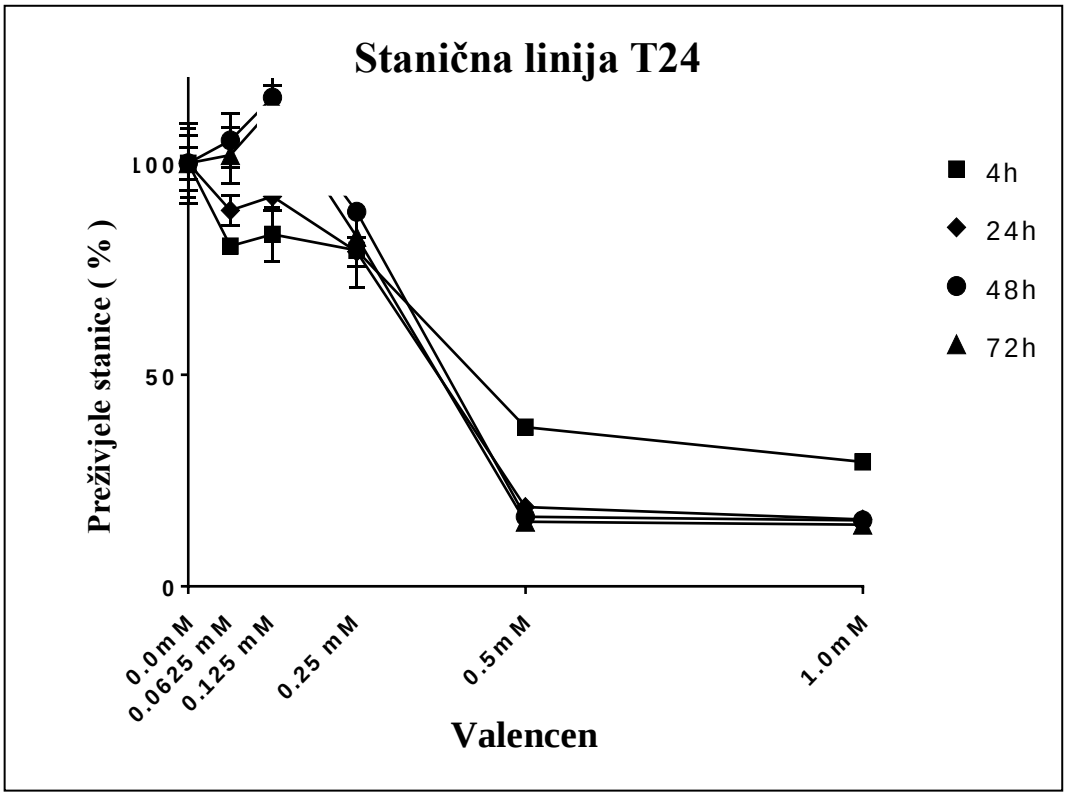
Slika 9. Priprema otopina uzoraka

3. REZULTATI

3.1. Stanična linija T24 karcinoma mokaćnog mjehura

Tablica 4. Održivost stanice izražena u postotku za različita vremenska razdoblja

Koncentracija/mM	4 h	24 h	48 h	72 h
0,0625	29,32	57,02	72,67	66,50
0,125	30,32	59,14	79,65	73,77
0,25	28,94	50,77	61,07	53,90
0,5	13,72	12,04	11,36	09,97
1	10,72	10,16	10,76	09,53



Slika 10. Linearni prikaz ovisnosti koncentracije i preživjelih stanica

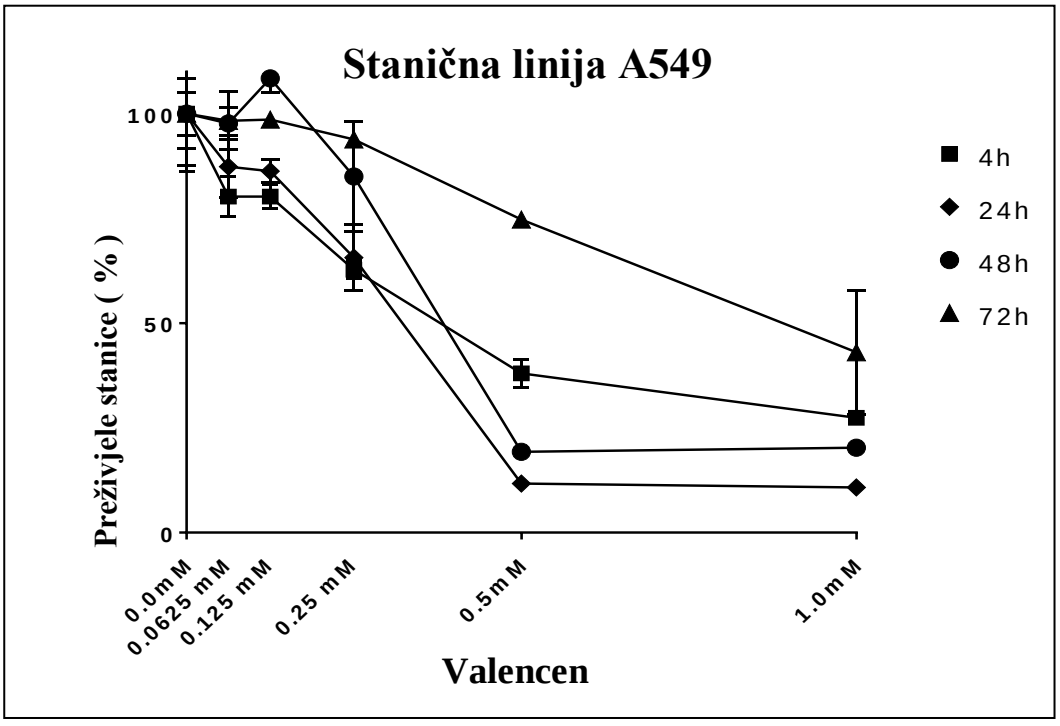
Tablica 5. Dobivene IC50 vrijednosti za različita vremenska razdoblja

	4 h	**24 h**	**48 h**	**72 h**
IC50	0,4659	0,375	0,497	0,4519

3.2. Stanična linija A549 karcinoma pluća

Tablica 6. Održivost stanice izražena u postotku za različita vremenska razdoblja

Koncentracija/mM	4 h	24 h	48 h	72 h
0,0625	43,64	75,84	65,34	61,04
0,125	43,64	74,88	72,53	61,22
0,25	34,61	60,94	59,84	58,28
0,5	25,34	23,20	25,66	46,42
1	14,92	09,36	13,57	26,75



Slika 11. Linearni prikaz ovisnosti koncentracije i preživjelih stanica

Tablica 7. Dobivene IC50 vrijednosti za različita vremenska razdoblja

	4 h	**24 h**	**48 h**	**72 h**
IC50	0,3714	0,2823	0,4791	1,192 ? *

***greška u 72 h

4. RASPRAVA

Za svrhu ovog rada, odabrali smo seskviterpenoid valencen kako bismo utvrdili njegovo antiproliferacijsko djelovanje na dvije stanične linije, T24 karcinoma mokraćnog mjehura i A549 karcinoma pluća. Ispitivanje se vršilo pomoću MTT- testa. Mjerenja su provedena u funkciji različitih koncentracija te u funkciji vremena (nakon 4, 24, 48 i 72 sata). Korištene koncentracije uzorka valencena bile su 0,0625 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM i 1 mM. Uočeno je da je porastom koncentracije testiranog spoja raslo i antiproliferacijsko djelovanje. Osim toga, iz grafičkig prikaza na slikama 10. i 11. može se uočiti da je antiproliferacijsko djelovanje produženo tijekom vremena inkubacije. Na kraju se odredila vrijednost IC_{50}, tj. koncentraciju kod koje je vidljiva 50%-tna smrtnost stanica. Za stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura te vrijednosti za 4 h, 24 h i 48 h iznose 0,3714 mM, 0,2823 mM i 0,4791 mM. U vremenskim intervalima od 4 h, 24 h, 48 h, i 78 h za stanice karcinoma pluća dobivene su vrijednosti 0,4659 mM , 0,375 mM, 0,497 mM te 0,4519 mM.

Iz dobivenih vrijednosti može se primijetiti da je antiproliferacijski utjecaj valencena izraženiji kod staničnih linija mokraćnog mjehura nego kod pluća. Razlika u inhibicijskom učinku najbolje se vidi pri visokim koncentracijama (0,5 i 1 mM). Pri koncentraciji od 0,5 mM uočava se dvostruko niži postotak održivosti stanica T24 u odnosu na A549, osobito nakon 72 h gdje je održivost čak pet puta manja. Kod nižih koncentracija uočava se veći broj preživjelih stanica kod obje stanične linije. Smanjenje preživljenja stanica karcinoma pluća A549 te mokraćnog mjehura T24 nije uvijek u razmjeru s povećanjem koncentracije. To se najbolje vidi pri koncentraciji 0,125 mM kod stanične linije T24 gdje raste broj preživjelih stanica. Daljnjim povećanjem koncentracije dolazi do smanjenja tog broja. Kod stanične linije A549 također pri istoj koncentraciji nakon 48 i 72 h primjećujemo porast broja preživjelih stanica. Valencen je slabo istražen spoj stoga ne postoje neka prethodna saznanja o njegovom djelovanju na ove stanične linije.

5. ZAKLJUČAK

1) Valencen je imao jače antiproliferacijsko djelovanje na stanične linije T24 i to osobito pri koncentraciji 0,5 mM

2) Pri nižim koncentracijama antiproliferacijsko djelovanje valencena na obje stanične linije je slabije.

3) Smanjenje preživljenja stanica karcinoma pluća A549 te mokraćnog mjehura T24 nije uvijek u razmjeru s povećanjem koncentracije.

6. LITERATURA

1. Božidar Vrhovac; Biokemija i toksikološka kemija, u Interna medicina; Naklada Ljevak,Zagreb, 2003. 183

2. Anka Bunarević; Patologija; Jugoslavenska medicinska naklada, Zagreb, 1985.

3. URL : http://www.onkologija.hr/sto-je-rak/ (30.7.2019.)

4. *Mirna Župić*;Diplomski rad: Citotoksično djelovanje izotiocijanata iz porodice kupusnjača na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom; Split,2017.

5. URL : https://www.sutrajenovidan.org/tag/oboljeli-od-karcinoma/ (19.9.2019.)

6.URL:http://ordinacija.vecernji.hr/zdravlje/preventiva/rak-pluca-prevencija-simptomi-i-lijecenje/(30.7.2019.)

7. URL : http://hlpr.hr/rak/vijest/rak-pluca (30.7.2019)

8.URL:https://www.gponline.com/flag-lung-cancer-risk-x-ray-referrals-gps-told/cancer/respiratory/article/1299809 (9.9.2019.)

9. *Ante Šerger*; Medicinska enciklopedija 10; Leksikografski zavod FNRJ, Zagreb, 1965.

10.URL:https://clsgmbh.de/artikeldet.php?sprachnrs=2&sid=0j26gbub9sqotke1l5q7be0cm4&proid=686 (9.9.2019.)

11. URL : https://www.medicalnewstoday.com/articles/312657.php (23.9.2019.)

12. *Božidar Vrhovac*; Interna medicina; Naklada Ljevak, Zagreb, 2003. str. 39-43

13.URL: https://www.index.hr/vijesti/clanak/neka-istrazivanja-raka-ne-uspijevaju-zbog-pogresne-identifikacije-stanica/160564.aspx (15.9.2019.)

14.URL:https://clsgmbh.de/artikeldet.php?sprachnrs=2&sid=1mhjsq89asuf2pt3h29oc2t3u0&proid=1768 (10.9.2019.)

16.URL:http://www.pmf.unsa.ba/hemija/files/Katedra%20za%20organsku%20hemiju%20i%20biohemiju/HPPTerpeni.pdf (23.9.2019.)

17.URL:https://repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos%3A1059/datastream/PDF/view (23.9.2019.)

18. URL : http://www.pmf.unsa.ba/hemija/files/4-_HPPTerpeni.pdf (16.9.2019.)

19. URL : http://www.zzjzpgz.hr/nzl/102/mokraca.htm (16.9.2019.)

20. Ani Radonić, Terpenoidi.pdf ; Split 2018. (16.9.2019.)

21. URL : http://struna.ihjj.hr/naziv/seskviterpenoidi/3776/ (17.9.2019.)

22. URL : http://proleksis.lzmk.hr/45616/ (17.9.9.2019.)

23. URL :http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1006341.html (17.9.2019.)

24. URL : https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Valencene (17.9.2019.)

25. URL : http://www.isobionics.com/index-1.html (18.9.2019.)

26. URL : https://www.sielc.com/valencene.html (18.9.2019.)

27. URL : https://www.lgcstandards-atcc.org (21.9.2019.)

28. *Radojčić Redovniković et al*; Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition 11 (3-4), 169-175 (2016)

29. *Lucija Guć*; Završni rad: Citotoksično djelovanje farnezola i nerolidola na staničnu liniju raka mokra

30. *Mirko Modrić*; Diplomsk rad : Citotoksično djelovanje „Ononis spinosa“, „Geranium macrorrhizum“, „Calendula officinalis“ i „Achillea millefolium“ na različite stanične linije humanih karcinoma; Split 2016.ćnog mjehura; Split 2018.