# Određivanje utjecaja farnezola i nerolidola na p38 MAPK stanični put

**Glumac, Mateo**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:167:795821

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**

*Repository / Repozitorij:*

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

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

# ODREĐIVANJE UTJECAJA FARNEZOLA I NEROLIDOLA NA p38 MAPK STANIČNI SIGNALNI PUT

**DIPLOMSKI RAD**

**MATEO GLUMAC**

**Matični broj: 66**

**Split, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

# ODREĐIVANJE UTJECAJA FARNEZOLA I NEROLIDOLA NA p38 MAPK STANIČNI SIGNALNI PUT

**DIPLOMSKI RAD**

**MATEO GLUMAC**

**Matični broj: 66**

**Split, 2018.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**

**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

# DETERMINATION OF FARNESOL AND NEROLIDOL ACTIVITY ON p38 MAPK CELL SIGNALING PATHWAY

**DIPLOMA THESIS**

**MATEO GLUMAC**

**Parent number: 66**

**Split, 2018.**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Sveučilište u Splitu**
**Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu**
**Diplomski studij organske kemije i biokemije**

| | |
|---|---|
| **Znanstveno područje:** | Organska kemija i biokemija |
| **Znanstveno polje:** | Biokemija |
| **Tema rada** | je prihvaćena na III. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta |
| **Mentor:** | doc. dr .sc. Mila Radan |
| **Pomoć pri izradi:** | doc. dr. sc. Mila Radan<br>izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić |

# ODREĐIVANJE UTJECAJA FARNEZOLA I NEROLIDOLA NA p38 MAPK STANIČNI SIGNALNI PUT

Mateo Glumac
Broj indeksa: 66

**Sažetak:** Koristeći se western blot tehnikom kao metodom za identifikaciju i kvantifikaciju proteina određivan je utjecaj farnezola i nerolidola na ekspresiju p38 MAP kinaza kod tri stanične linije raka: raka mokraćnog mjehura(T24, TCC SUP) i glioblastoma (LN229). p38 MAP kinaze ključni su dio p38 MAPK staničnog signalnog puta koji je zadužen za transkripciju, popravak oštećenja na stanici i borbu protiv kancerogeneze. Na sve tri stanične linije ispitivan je utjecaj seskviterpenskih alkohola (farnezola i nerolidola) na ekspresiju p38 MAP kinaza te je rezultat uspoređen s kontrolnim uzorcima čime je ostvarena objektivna usporedba aktivnosti ispitivanih spojeva. Iz dobivenih eksperimentalnih podataka može se zaključiti da konstitucijski izomeri farnezol i nerolidol različito utječu na ispitivani signalni put u različitim staničnim linijama. Farnezol pokazuje slaba inhibitorska svojstva za T24 i TCC SUP staničnu liniju dok kod LN229 pokazuje snažnu aktivaciju signalnog puta. Nerolidol pokazuje snažnu inhibiciju kod T24 i LN229 stanične linije dok kod linije TCC SUP pokazuje aktivacijsku sposobnost. Dobiveni rezultati sugeriraju na različito vezivanje farnezola i nerolidola na stanične receptore kod istih i različitih staničnih linija što je veoma zanimljiv rezultat za daljnja istraživanja. Detaljan opis eksperimentalnog rada prikazan je u radu zajedno s rezultatima eksperimenta.

**Ključne riječi:** T24, TCC SUP, LN229, p38 MAPK, farnezol, nerolidol, rak
**Rad sadrži:** 73 stranica, 31 slika, 9 tablica, 0 priloga, 52 literaturnih referenci
**Jezik izvornika:** Hrvatski
**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. Prof. dr. sc. Mladen Miloš - predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić - član.
3. Doc. dr. sc. Mila Radan - član mentor

**Datum obrane:** 24.10.2018.

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

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**DIPLOMA THESIS**

**University of Split**
**Faculty of Chemistry and Technology Split**
**Graduate study of Organic chemistry and Biochemistry**

| | |
|---|---|
| **Scientific area:** | Organic chemistry and Biochemistry |
| **Scientific field:** | Biochemistry |
| **Thesis subject** | was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. III |
| **Mentor:** | Assistant professor Mila Radan, PhD |
| **Technical assistance:** | Assistant professor Mila Radan, PhD<br>Associate professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD |

# DETERMINATION OF FARNESOL AND NEROLIDOL ACTIVITY ON p38 MAPK CELL SIGNALING PATHWAY

Mateo Glumac
Indeks no. 66

**Abstract:** Using the Western blot technique as a method for identification and quantification of proteins p38 MAP kinaze quantity was determined in three cancer cell lines: urinary bladder cancer (T24, TCC SUP) and glioblastoma (LN229). p38 MAPKs are key molecules in the p38 MAPK cell signaling pathway which is in charge of transcription, damage repairs and anti-cancer activity. All cell lines were tested for sesquiterpene alcohol (farnesol and nerolidol) activity on p38 MAPK quantity and the results was compared with control samples to gain an objective conclusion on their activity. Experimental data shows that constitutional isomers farnesol and nerolidol show different effect on tested pathway in different cell lines. Farnesol shows low inhibitory activity for T24 and TCC SUP but it shows a high activation ability for LN229 cell line. Nerolidol shows a high inhibitory activity for T24 and LN229 but it shows activation for TCC SUP cell line. Experimental data suggest that farnesol and nerolidol bind differently on the cell receptors within the same cell line and on the different cell lines making the results of this thesis interesting topic for future research. Detailed description of the experiment is shown in the thesis as well as experimental results data.

**Key words:** T24, TCC SUP, LN229, p38 MAPK, farnesol, nerolidol, cancer research
**Thesis contains:** 73 pages, 31 figures, 9 tables, 0 supplements, 52 references
**Original in:** Croatian
**Defense committee:**

1. Mladen Miloš - PhD, Full Professor - chair person
2. Ani Radonić - PhD, Associate Professor - member
3. Mila Radan - PhD, Assistant Professor - supervisor

**Defense date:** 24.10.2018.

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

*Rad je izvršen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr .sc. Mile Radan, u razdoblju od veljače do rujna 2018. godine.*

*Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897*

*Zahvaljujem se doc. dr .sc. Mili Radan na pruženom vremenu i strpljenju koje mi je omogućilo izradu ovoga rada. Također se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić što mi je omogućila korištenje njenog vremena i opreme bez kojih ovaj rad ne bih mogao izraditi.*

**ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

- Napraviti otopine nerolidola i farnezola poznatih koncentracija prema literaturnim izvorima koje će se primijeniti u eksperimentalnom radu
- Pravilno uzgojiti stanične linije potrebne za rad
- Primijeniti napravljene otopine na stanične linije
- Izdvojiti proteine iz stanica te izvršiti njihovo razdvajanje korištenjem tehnike gel elektroforeze
- Koristeći se western blot tehnikom identificirati te kvantificirati p38 MAPK proteine i „housekeeping“ protein čija se ekspresija ne mijenja u uvjetima pri kojim je proveden eksperiment
- Korištenjem računalnog softvera odrediti utjecaj nerolidola i farnezola na ekspresiju p38 MAPK proteina u staničnom signalnom putu

**SAŽETAK:**

Koristeći se western blot tehnikom kao metodom za identifikaciju i kvantifikaciju proteina određivan je utjecaj farnezola i nerolidola na ekspresiju p38 MAP kinaza kod tri stanične linije raka: raka mokraćnog mjehura(T24, TCC SUP) i glioblastoma (LN229). p38 MAP kinaze ključni su dio p38 MAPK staničnog signalnog puta koji je zadužen za transkripciju, popravak oštećenja na stanici i borbu protiv kancerogeneze. Na sve tri stanične linije ispitivan je utjecaj seskviterpenskih alkohola (farnezola i nerolidola) na ekspresijup38 MAP kinaza te je rezultat uspoređen s kontrolnim uzorcima čime je ostvarena objektivna usporedba aktivnosti ispitivanih spojeva. Iz dobivenih eksperimentalnih podataka može se zaključiti da konstitucijski izomeri farnezol i nerolidol različito utječu na ispitivani signalni put u različitim staničnim linijama. Farnezol pokazuje slaba inhibitorska svojstva za T24 i TCC SUP staničnu liniju dok kod LN229 pokazuje snažnu aktivaciju signalnog puta. Nerolidol pokazuje snažnu inhibiciju kod T24 i LN229 stanične linije dok kod linije TCC SUP pokazuje aktivacijsku sposobnost. Dobiveni rezultati sugeriraju na različito vezivanje farnezola i nerolidola na stanične receptore kod istih i različitih staničnih linija što je veoma zanimljiv rezultat za daljnja istraživanja. Detaljan opis eksperimentalnog rada prikazan je u radu zajedno s rezultatima eksperimenta.

**Ključne riječi:** T24, TCC SUP, LN229, p38 MAPK, farnezol, nerolidol, rak

**SUMMARY**

Using the Western blot technique as a method for identification and quantification of proteins p38 MAP kinaze quantity was determined in three cancer cell lines: urinary bladder cancer (T24, TCC SUP) and glioblastoma (LN229). p38 MAPKs are key molecules in the p38 MAPK cell signaling pathway which is in charge of transcription, damage repairs and anti-cancer activity. All cell lines were tested for sesquiterpene alcohol (farnesol and nerolidol) activity on p38 MAPK quantity and the results was compared with control samples to gain an objective conclusion on their activity. Experimental data shows that constitutional isomers farnesol and nerolidol show different effect on tested pathway in different cell lines. Farnesol shows low inhibitory activity for T24 and TCC SUP but it shows high activation ability for LN229 cell line. Nerolidol shows a high inhibitory activity for T24 and LN229 but it shows activation for TCC SUP cell line. Experimental data suggest that farnesol and nerolidol bind differently on the cell receptors within the same cell line and on the different cell lines making the results of this thesis interesting topic for future research. Detailed description of the experiment is shown in the thesis as well as experimental results data.

**Keywords:** T24, TCC SUP, LN229, p38 MAPK, farnesol, nerolidol, cancer research

## Sadržaj

1. OPĆI DIO ..... 1

1.1. Rak ..... 1

1.1.1. Nastanak raka ..... 1

1.1.2. Rast i razvoj raka ..... 2

1.1.3. Tipovi raka ..... 6

1.1.4. Epidemiologija raka ..... 8

1.1.5. Dijagnoza i liječenje raka ..... 10

1.2.Stanične linije ..... 16

1.2.1. Održavanje staničnih linija na životu ..... 17

1.2.2. Stanična linija T-24 ..... 19

1.2.3. Stanična linija TCCSUP ..... 20

1.2.4. Stanična linija LN-229 ..... 21

1.3. Ispitivani spojevi ..... 22

1.3.1. Seskviterpeni ..... 22

1.3.2. Farnezol ..... 23

1.3.3. Nerolidol ..... 23

1.4. Postupak ispitivanja spojeva na antiproliferirajuće djelovanje ..... 25

1.5. Metode određivanja i identifikacije proteina ..... 26

1.5.1. Građa i struktura proteina ..... 26

1.5.2. Određivanje ukupne količine proteina u uzorku ..... 26

1.5.3. Metode izdvajanja proteina iz smjese ..... 27

1.5.4. Metode za identifikaciju proteina ..... 33

1.5.5. Western blot metoda ..... 34

1.6. Stanična komunikacija i putovi transdukcije signala ..... 43

1.6.1. MAPK signalni put ..... 47

1.6.2. p38 MAPK signalni put ..... 49

2. EKSPERIMENTALNI DIO ..... 50
2.1. Metoda odabira ispitivanih spojeva (test citotoksične aktivnosti) ..... 50
2.2. Nanošenje ispitivanih spojeva i proliferacija staničnih linija ..... 50
2.3. Liziranje stanica ..... 51
2.4. SDS-elektroforeza i Western bloting ..... 54
2.5. Imunobojanje ..... 59
2.6. Detekcija ..... 60
2.7. Obrada rezultata ..... 61
3. REZULTATI I RASPRAVA ..... 62
3.1. Rezultati eksperimentalnog rada ..... 62
3.2. Utjecaj farnezola na p38 MAPK signalni put ..... 63
3.3. Utjecaj nerolidola na p38 MAPK signalni put ..... 63
4. ZAKLJUČAK ..... 64
Literaturni izvori: ..... 66
Popis tablica: ..... 69
Popis grafikona: ..... 69
Popis slika: ..... 70
Popis kratica: ..... 72

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Rak

Rak je naziv za skupinu bolesti uzrokovanih nekontroliranim dijeljenjem tjelesnih stanica pri čemu dolazi do širenja bolesti u okolna tkiva. Rak može nastati u bilo kojem dijelu tijela. Stanice se u zdravom ljudskom tijelu dijele na nove stanice samo kada su nove stanice tijelu potrebne. Kada se stanice oštete ili ostare one umiru, a nove stanice zauzmu njihovo mjesto. Kod razvoja raka prirodni ciklus je poremećen. Kroz nekoliko generacija stanica, nastala abnormalnost sve više napreduje pri čemu stare i oštećene stanice ne umiru nego se nastavljaju dijeliti povećavajući šansu nastanka novih oštećenja genetskog materijala. Dijeljenje se odvija bez obzira na to što tijelo nije signaliziralo potrebu za nastankom novih stanica. Te nove stanice se mogu dalje dijeliti bez prestanka pri čemu u tijelu nastaje tvorevina koju nazivamo tumor. Većina vrsta raka tvori čvrste tvorbe (tkiva), dok neke vrste raka, poput raka krvi (npr. leukemija), ne stvaraju čvrsta tkiva. Kancerogeni tumori su maligni što znači da se mogu širiti u ili napasti okolna tkiva tako povećavajući rakom zahvaćeno područje u tijelu. Osim ove vrste širenja raka, tijekom rasta i razvoja raka mnoge stanice bivaju odcjepljene od originalne mase i nošene krvlju ili limfom putuju u druge dijelove tijela gdje mogu stvoriti nove tumore. Za razliku od malignih tumora postoje benigni tumori. Ove tvorevine nemaju tendenciju širenja ili napadanja okolnih tkiva no mogu izrasti u tvorevine velikih dimenzija. Mogu se kirurški ukloniti i obično nakon uklanjanja se ne ponavljaju dok se maligni tumori mogu ponoviti i nakon izlječenja. Većina benignih tumora nije opasna za zdravlje dok benigni tumori mozga jesu zbog ograničenosti prostora za rast te stvaranja pritiska na mozak. [1,2]

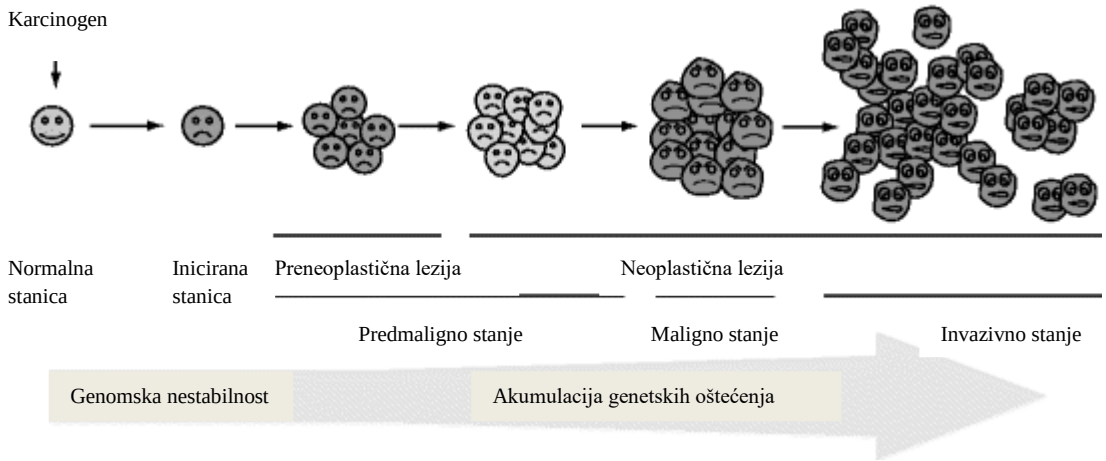
### 1.1.1. Nastanak raka

Rak je genetska bolest, što znači da je uzrokovana promjenama na genima koji kontroliraju funkciju stanice. Kao najvažnija mjesta oštećenja su geni zaduženi za rast i dijeljenje stanica jer da bi stanje raka nastalo mora doći do njihovog nekontroliranog dijeljenja. Neke promjene na genomu su nasljedne što znači da će se predispozicije za nastanak raka prenijeti s roditelja na djecu no to ne znači da će i kod njih doći do razvoja raka već da imaju veći stupanj rizika za njegov nastanak. Ovaj način nastanka objašnjava samo mali broj slučajeva raka. Drugi način nastanka raka, onaj kojim u većini slučajeva dolazi do njegove pojave, je oštećenje DNA uzrokovano okolišnim

čimbenicima. Okolišni čimbenici poput izloženosti raznim kemijskim spojevima koji imaju kancerogenu aktivnost ili radijaciji dovode do oštećenja DNA molekule. Starenjem organizma dolazi do nakupljanja oštećenja na DNA što dovodi do povećanja pojave raka u starijoj životnoj dobi. Svaki rak je uzrokovan specifičnom kombinacijom oštećenja na DNA, a tijekom njegova razvoja može doći i do novih oštećenja dovodeći do različitosti između samih stanica raka. [1]

### 1.1.2. Rast i razvoj raka

Rak započinje iz normalne tjelesne stanice koja je diferencirana i obavlja njoj predviđenu ulogu. Kancerogeneza počinje trajnim oštećenjem DNA, koje stanica nije uspješno popravila kroz vlastite stanične mehanizme zadužene za njen popravak, čime nastaje inicirana stanica. Takva inicirana stanica gotovo sigurno umire kroz stanične procese apoptoze (umiranja samo te stanice) ili nekroze (odumiranja oštećene stanice i okolnog tkiva). Specifično oštećenje DNA na genima koji kontroliraju stanični ciklus, preciznije programiranu staničnu smrt, dovodi do preživljavanja inicirane stanice. Drugi stupanj kancerogeneze je promocija, stupanj u kojem stanica doživljava fiziološke promjene koje nisu zasnovane na daljnjem oštećenju DNA. Promocija je kronična, ali reverzibilna. Promocijom nastaje žarišna preneoplastična lezija, uznapredovano oštećena skupina stanica koja ima veliku šansu da postane tumor. Progresijom kancerogeneze iz preneoplastične lezije nastaje tumorsko tkivo. Progresija je odlikovana genetskom nestabilnosti koja dovodi do daljnjeg oštećenja DNA te sve veće razlike oštećene stanice od normalne stanice istog tkiva. Povećanjem broja oštećenja dovodi do uspješnijega rasta stanica, smanjenja imunogenosti te angiogeneze. Također gubitkom diferencijacije stanica, pri čemu stanice postaju po svojstvima slične matičnim stanicama, dovodi do pojave aktivnosti telomeraza koje omogućuju kontinuirano dijeljenje stanica bez gubitka genetske informacije. Napretkom kancerogeneze tumor postaje invazivan te dobiva metastastski potencijal, mogućnost širenja u tijelu. Postizanjem ovog stupnja kancerogeneze tumor je definiran kao rak. [1,3]

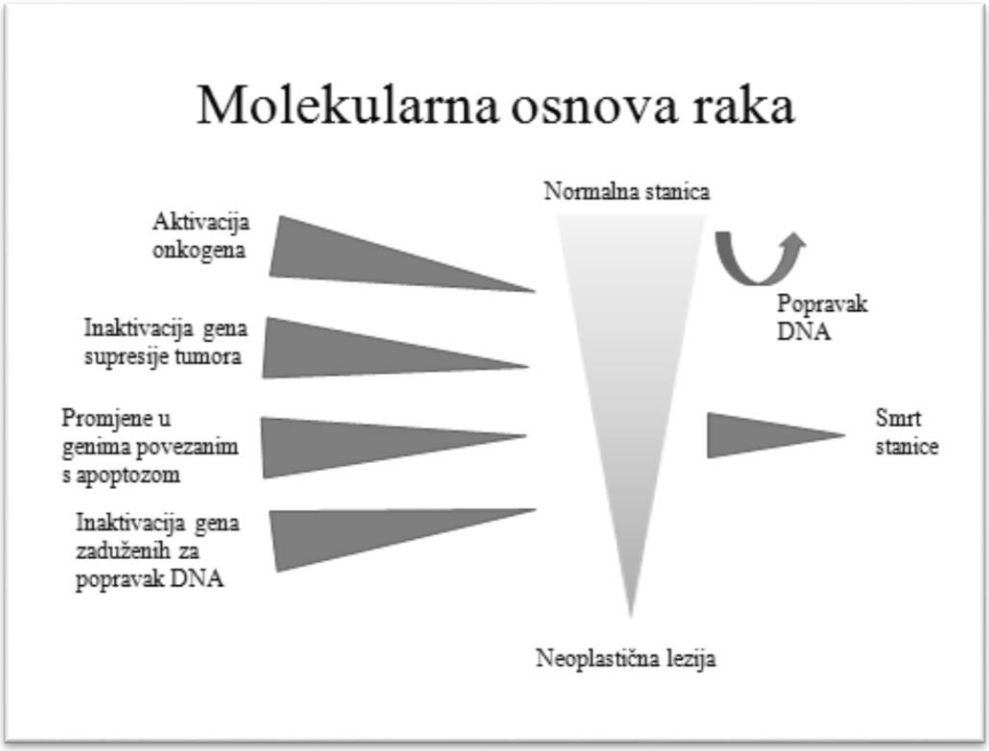



Slika 1: Proces kancerogeneze

Rak u ranoj fazi definiran je sljedećim osobinama:

- stvara vlastite signale rasta
- ignorira postojeće signale rasta
- stanice izbjegavaju staničnu smrt
- stanice se neograničeno repliciraju
- održava angiogenezu
- prodire u tkiva putem staničnih membrana i kapilarnih zidova
- izbjegava imunosnu obranu.

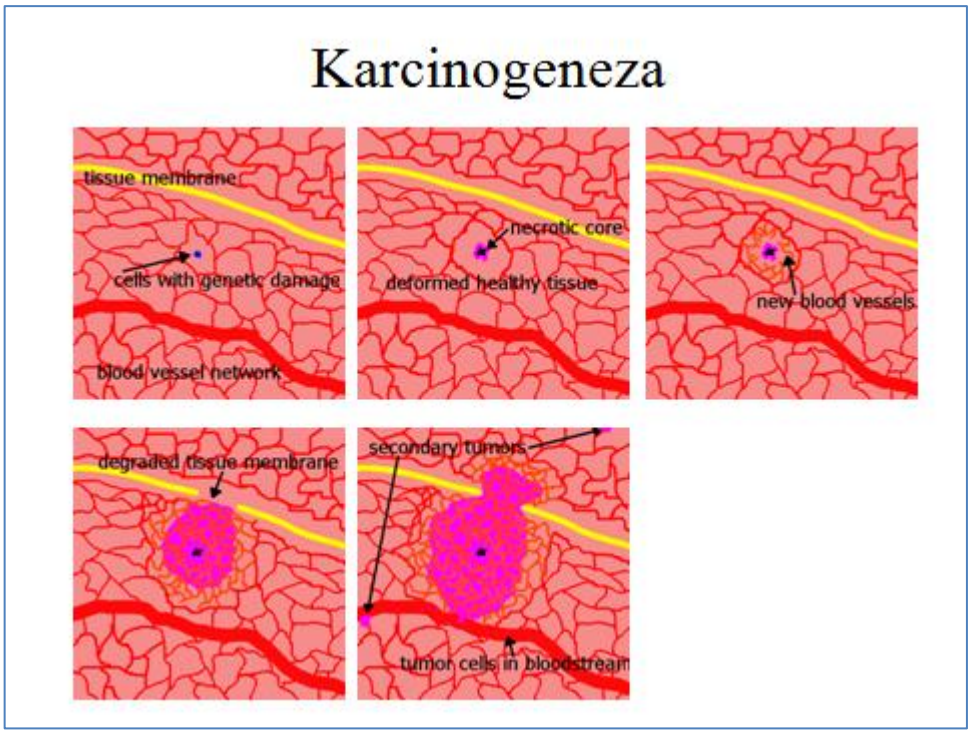
Gledajući molekularnu i staničnu biologiju tumora, za početak zloćudne preobrazbe u prosjeku je potrebno poremetiti 7 do 10 gena. Nastanak rane leukemije događa se nakon samo dvije mutacije na ciljanim genima, dok na primjer za nastanak raka prostate potrebno je mutiranje oko tridesetak različitih gena. Progresijom oštećenja DNA dovodi do nastanka agresivnog metastatskog raka koji u prosjeku ima preko 100 mutiranih gena. Ključna mutacija koja razlikuje benigne tumore od raka je aktivacija onkogena i inaktivacija tumor-supresorskog gena što dovodi do zloćudne preobrazbe. Aktivacija onkogena odvija se putem točkaste mutacije, translokacije ili amplifikacije na postojećem genomu. Inaktivacija tumor-supresorskog gena događa se točkastom mutacijom, delecijom toga gena ili epigenetskim čimbenicima. Nakon ovih promjena na DNA, inaktivacija gena koji sprječavaju pogreške u genomu dovodi do veće genetske nestabilnosti i povećavaju učestalost mutacija svih gena.[3]




Slika 2: Molekularna osnova raka

Razvoj raka opisan kroz pet stadija:

1. Genetički promijenjena stanica – koja se brže dijeli
2. Hiperplazija – nakupina stanica nalik na normalne stanice od kojih samo jedna od milijun, nakon dugog vremenskog perioda, razvije dodatnu mutaciju
3. Displazija – nakupina promijenjenih stanica koje rijetko razvijaju nove promjene na DNA. Displazija je razdoblje fizioloških promjena koje se javljaju zbog promjena u genetičkom materijalu stanica.
4. Karcinom *in situ* – nakupina pravih stanica raka koje još nisu probile bazalnu membranu
5. Invazivni karcinom – raste infiltrativno, destruktivno i metastazira.




Slika 3: Karcinogeneza

U medicini, radi određivanja tijeka liječenja, vrši se profiliranje (eng. „*grading*“) tumora. Profiliranje tumora vrši se na temelju stupnja diferenciranosti stanica. Diferencirane stanice su one stanice koje su se prilagodile obavljanju njima predviđene zadaće dok su nediferencirane stanice one stanice koje još nemaju određenu zadaću poput novonastalih stanica, matičnih stanica te mutiranih stanica. Stupnjevi razvoja tumora definirani su:

- GX - stupanj nije moguće odrediti
- G1 – stanice su dobro diferencirane (niski stupanj nediferenciranih stanica)
- G2 – stanice su umjereno diferencirane (srednji stupanj)
- G3 – stanice su slabo diferencirane (visoki stupanj)
- G4- stance su nediferencirane (visoki stupanj)

Stupnjevanje razvoja tumora vrši se histološkim pregledom gdje se mikroskopiranjem pregledava biopsijom izuzeto oboljelo tkivo. Kao faktori koji se uzimaju u obzir su veličina i oblik jezgre, mitotička aktivnost, stupanj staničnosti, stanični pleomorfizam, način rasta te opsežnost nekroze. Pacijenti nižega stupnja imaju bolju prognozu ishoda liječenja dok pacijenti visokog stupnja imaju lošu prognozu.[3]

### 1.1.3. Tipovi raka

Do danas je zabilježeno više od sto različitih tipova raka kod ljudi. Obično se nazivaju prema tipu tkiva ili organu iz kojeg su potekli. Opisujemo ih prema obliku stanica iz kojih su nastali. Pa tako razlikujemo:[2,4]

#### *1.1.3.1. Karcinom*

Ovaj tip raka je najčešći tip raka kod ljudi. Javlja u starijoj životnoj dobi. Nastaje iz epitelnih stanica koje oblažu kako vanjštinu tijela tako i unutrašnje površine u tijelu. Postoji mnogo tipova epitelnih stanica no većini je zajednički izduljeni pločasti oblik, a prema tipu tih stanica razlikujemo:

- Adenokarcinom – nastaje iz epitelnih stanica koje stvaraju tjelesne tekućine ili sluz pa se još nazivaju i žljezdanim tkivima. U ovaj tip raka ubrajamo rak dojke, prostate i debelog crijeva.
- Karcinom bazalnih stanica – nastaje u dubljim (bazalnim) dijelovima kože.
- Rak pločastih stanica – nastaje iz pločastih stanica smještenih odmah ispod prvog sloja kože. Pločaste stanice također oblažu brojne organe poput želuca, crijeva, pluća, mjehura i bubrega. Svojim izgledom pločaste stanice podsjećaju na riblje ljuske. Ovaj tip raka još se naziva epidermoidnim karcinomom.
- Karcinom prijelaznih stanica – tip karcinoma koji nastaje iz prijelaznih epitelnih stanica ili urotela. Ovaj tip stanica radi višeslojna tkiva epitelnih stanica, različitih po svojoj veličini, koja oblažu brojne organe poput mjehura, mokraćovoda i dijelova bubrega. Ovaj tip karcinoma čini veliku udio pojava raka mokraćnog sustava.[2,4]

#### *1.1.3.2. Sarkom*

Sarkom je tip raka koji se razvija u kostima i mekim tkivima uključujući mišićno i masno tkivo, krvne i limfne žile te fibrozna tkiva. Sarkomi su veoma rijetki kod ljudi. Većina raka koji se pojavljuju u navedenim tkivima su potekli od epitelnih stanica pa su definirani kao karcinomi.

- Osteokarcinom – najžešći oblik raka kosti. Specifično je agresivan i najčešće se javlja kod adolescenata i mladih.

- Ostali česti tipovi sarkoma su: leiomiosarkom (sarkom mišićnog tkiva), Kaposijev sarkom (stvara lezije, uzrokovan je HIV-om), maligni fibrozni histiocitom (brzorastući i brzometastazirajući tip sarkoma proizašao iz mekih tkiva i kosti) i liposarkom (sarkom masnih stanica).[2,4]

#### *1.1.3.3. Leukemije*

Leukemije su tip raka koji nastaje u krvotvornim tkivima unutar koštane srži. Ne stvara čvrste nakupine tkiva već stvara veliki broj bijelih krvnih stanica koje se nakupljaju u krvotoku i unutar koštane srži, sprječavajući normalne stanice da obavljaju svoju funkciju pa tako smanjuju mogućnost tijela da se opskrbi kisikom, da zaustavi krvarenje ili spriječi širenje infekcije. Leukemije se najčešće javljaju kod ljudi starijih od 55 godina te kod djece mlađe od 15 godina. Razlikujemo četiri osnovna tipa leukemije prema tome koliko bolest brzo napreduje i prema tipu stanica iz koje je rak nastao:

- akutna limfoblastična leukemija
- kronična limfoblastična leukemija
- akutna mijelogena leukemija
- kronična mijelogena leukemija.[2,4]

#### *1.1.3.4. Limfom*

Limfom je tip raka nastao iz stanica limfocita (T ili B limfocita), stanica koje su sastavni dio imunološkog sustava. Kod pojave limfoma, abnormalne stanice se nakupljaju u limfnom sustavu i drugim organima povezanima na taj sustav. Razlikujemo dva glavna tipa limfoma:

- Hodgkinsov limfom – oboljeli ima tip limfocita zvanih Reed-Sternbergove stanice. Najčešće nastaje iz B limfocita.

- Ne-Hodgkinsov limfom – velika i raznovrsna skupina raka proizašla iz limfocita. Nastaje iz oba tipa limfocitnih stanica.[2,4]

#### *1.1.3.5. Multipli mijelom*

Rak koji nastaje u stanicama plazme i u drugim imunološkim stanicama koje se nakupljaju unutar tkiva koštane srži gdje tvore čvrsta tumorska tkiva koja se šire po tijelu. Ovaj tip raka je neizlječiv, ali se može kontrolirati raznim tipovima liječenja.[2,4]

#### *1.1.3.6. Melanom*

Melanom je tip raka nastao kancerogenezom iz stanica melanocita, specijaliziranih stanica epiderme koje stvaraju melanin. Najčešće nastaje na koži, ali može nastati i u drugim tkivima koji imaju melanocite, poput očiju. Najčešće je uzrokovan ultraljubičastim zračenjem i u slučaju ranog otkrivanja je u potpunosti izlječiv.[2,4]

#### *1.1.3.7. Tumori mozga i leđne moždine*

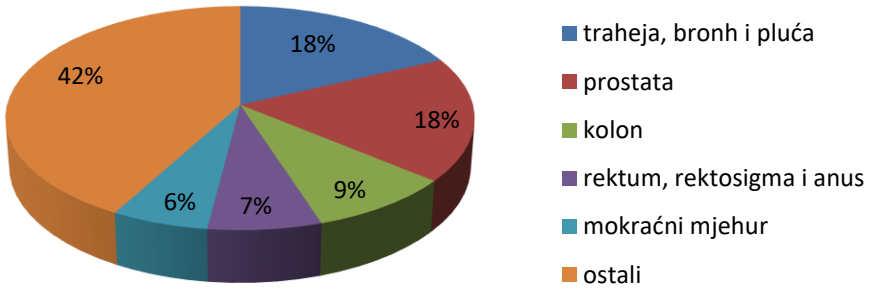
Veoma raznovrsna skupina raka. Tumori nastali djelovanjem raka ovog tipa nazivaju se prema tipu stanica koje ga tvore te prema dijelu živčanog tkiva u kojemu je došlo do razvoja raka. Većina tumora nastalih u ovim dijelovima tijela su benigne prirode, ali mogu stvoriti probleme u normalnom radu živčanog sustava. Rak mozga i leđne moždine se rijetko javlja, a najčešće nastaje iz astrocita, stanica koje se brinu o normalnom radu mozga.[2,4]

### 1.1.4. Epidemiologija raka

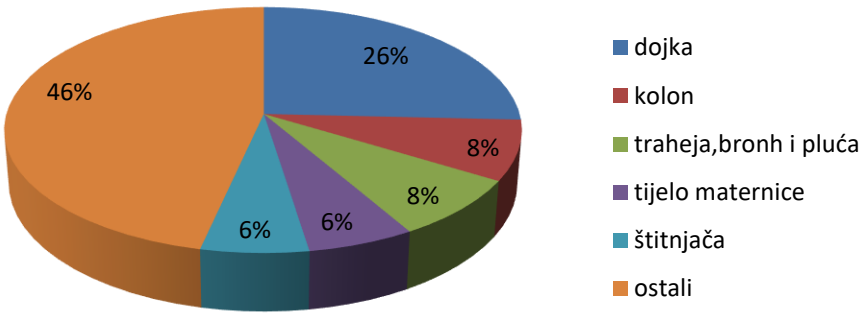
Rak je jedan od najčešćih uzroka smrti kod ljudi. Porastom broja stanovnika Zemlje te čovjekova negativnog utjecaja na okoliš broj oboljelih od raka u stalnom je porastu. U 2015. godini zabilježeno je 17,5 milijuna novooboljelih od raka i 8,7 milijuna smrtnih slučajeva uzrokovanih rakom. Prateći statističke podatke u razdoblju od 2005. do 2015. godine stopa pojave raka porasla je za 33%. Glavni faktori porasta oboljelih je starenje populacije s udjelom od 16%, rast populacije s udjelom od 13% te promjene u dobnim stopama s udjelom od 4%. Najčešće tip raka za muškarce u svijetu je rak prostate s učestalošću od 1,6 milijuna oboljelih na godinu. Rak ždrijela, bronha i pluća najveći je uzročnik smrti kod muškaraca s 1,2 milijuna umrlih te 25,9 milijuna radno onesposobljenih muškaraca koji se liječe ili oporavljaju od ovog tipa raka. Kod žena najčešći tip raka je rak dojke s 2,4 milijuna novooboljelih žena na godinu. Također ovaj tip raka je i najčešći uzročnik smrti od raka kod žena s 523 tisuće umrlih te 15,1 milijun radno onesposobljenih žena na godinu. Ukupno na godišnjoj razini 208,3 milijuna ljudi bude radno nesposobno kao posljedica oboljenja od raka te samog liječenja. Između 2005. i 2015. godine stope učestalosti raka standardizirane prema dobi za sve tipove raka porasle su u 174 od 195 država i teritorija. Dobno standardizirane stope smrti od raka su se smanjile u 140 od 195 država i teritorija u

kojima se vodila statistička obrada podataka. Povećanje stope smrti pojavile su se većinom samo u državama Afričkog kontinenta. Stope smrti od raznih tipova raka između 2005. i 2015. godine su se značajno smanjile poput stope smrti od Hodgkinsonovog limfoma sa 10,6% na 1,3%. Stope smrti su u padu također za rak jednjaka, želudca i kronične mijeloične leukemije iako njihov pad nije dovoljno značajan za smanjenja broja ukupnih smrtnih slučajeva. [5]

U Hrvatskoj je pojava raka te smrtnost jako visoka u odnosu na druge zemlje razvijenog svijeta pa se u Hrvatskoj vode veoma precizne statistike pojave i smrtnosti od raka. U 2015. godini zabilježeno je 22 503 novooboljele osobe od raka od kojih je 11 969 muškaraca te 10 534 žene. Stopa učestalosti iznosila je 535,3 oboljele osobe na 100 tisuća stanovnika s neravnomjernom razdiobom među spolovima u odnosu 53:47. Od raka u 2015. godini je umrlo 14 012 osoba od kojih 8 030 muškaraca i 5 982 žene. Stopa mortaliteta bila je 333,3 umrle osobe na 100 tisuća stanovnika u neravnomjernom raspodjelom među spolovima u odnosu 57:43. Najčešći tip raka kod muškaraca bio je rak ždrijela, dušnika i pluća te rak prostate dok se kod žena najviše javljao rak dojke. Dobno standardizirane stope učestalosti raka za Hrvatsku uznosile su 369,9/100 000 te dobno standardizirana stopa smrtnosti iznosila je 207,5/100 000.[6]




Grafikon 1: Najčešći tipovi raka kod muškaraca u Hrvatskoj za 2015. godinu




Grafikon 2: Najčešći tipovi raka kod žena u Hrvatskoj za 2015. godinu

### 1.1.5. Dijagnoza i liječenje raka

Nastanak i razvoj raka u tijelu sa sobom ne donosi prepoznatljive simptome putem kojih bi ga odmah mogli prepoznati. Najčešće su to simptomi koji se često pojavljuju poput promuklosti, kašlja, osjećaja slabosti ili neodređene boli. Simptomi koji se pojavljuju su ovisni o mnogo čimbenika poput: tipa raka, mjesta na kojemu se pojavio, dobi oboljelog, općem zdravstvenom stanju oboljelog itd.

Razvoj simptoma bolesti ne znači da se radi o raku. Najčešće se radi o drugim oblicima bolesti. Ukoliko je došlo do promjena na stanicama koje uzrokuju određene simptome, u velikom broju slučajeva radi se o benignim tumorima, a ne o raku. Ukoliko se osjete bilo kakvi simptomi koji traju duže od jednog tjedna potrebno je posjetiti liječnika da bi se došlo do dijagnoze i započelo potrebno liječenje. Veliki broj pacijenata ne posjećuje svog liječnika kod same pojave prvih simptoma već prolongira svoj odlazak liječniku do faze u kojoj se pojavljuje osjet boli na rakom zahvaćenom području tijela, a kada dođu kod liječnika jedini mogući ishod liječenja biti će terapije za produljenje života dok je šansa za izlječenje u tom trenutku minimalna.

Ukoliko je simptom prisutan ili je orijentacijski test (eng. „screening test“) pozitivan liječnik mora odrediti je li uzrok rak ili neki drugi medicinski razlog. Niska ili visoka razina određenih tvari u tijelu može biti pokazatelj na prisutnost raka. Zato se vrše analize krvi, urina i drugih tjelesnih tekućina. Sama analiza krvi nije pokazatelj

prisutnosti raka već samo ukazuje da je neki problem prisutan. Sljedeći korak u dijagnostici jest snimanje dijelova tijela da bi se vidjelo je li u njima rak prisutan. Moguće je vršiti snimanje na više načina poput: CT skeniranja, nuklearne magnetske rezonancije, ultrazvučnog snimanja, PET snimanja ili rendgenskog snimanja. Prisutnost nepoznate mase u tijelu i dalje nije dokaz raka pa je sljedeći korak vršenje biopsije nepoznate tvorevine. Biopsija je postupak uklanjanja dijela tvorevine te mikroskopiranja uzorka nakon čega se odredi stupanj razvoja tumora ovisno o staničnoj diferencijaciji. Biopsija se vrši na tri načina: korištenjem igle, endoskopski ili operativno. Ukoliko je biopsija pokazala da su stanice nepoznate tvorevine stanice raka, određuje se stupanj razvoja raka po TNM sistemu. T označava veličinu i širenje primarnog tumora. N stoji za broj limfnih čvorova koje je rak zahvatio. M označava prisutnost ili odsutnost metastaza. Prema ovom sistemu označavanja iza svakog slova piše se broj koji označava stupanj razvoja raka u određenoj skupini (na primjer T1N0MX ili T3N1M0). Brojevi uz slovo T mogu biti od 0 do 4 gdje 0 znači da primarni tumor nije nađen, a brojevi od 1 do 4 svojim porastom opisuju veličinu i širenje primarnog tumora. Brojevi uz slovo N mogu biti od 0, koja znači da niti jedan limfni čvor nije zahvaćen, do 4, koja znači da je veliki broj limfnih čvorova zahvaćeno rakom. Brojevi uz slovo M mogu biti 0, koja znači da nema metastaza, ili 1, koji znači da su metastaze prisutne. Moguća je i pojava oznake X koja znači da mjerenje nije bilo moguće provesti. Osim TNM metode opisivanja tumora moguće je i opisivanje tumora putem stupnja razvoja tumora. Ta metoda opisana je u poglavlju 1.1.2.. Utvrđivanje stupnja razvoja raka pomaže liječnicima u odabiru potrebne terapije.

Pacijenti kroz dijagnosticiranje raka dobivaju prognozu liječenja koja je bazirana na statističkim podacima. Iz statističkih podataka mogu se dobiti različite informacije poput perioda preživljavanja za određeni tip raka (daju se vremenski periodi poput jedne, dvije, tri ili pet godina), relativna stopa preživljavanja (usporedba preživljavanja pacijenta s rakom i zdrave osobe), opća stopa preživljavanja (postotak ljudi sa specifičnim tipom raka i stupnjem njegova razvoja koji nisu umrli kroz određeni vremenski period kao posljedica toga raka) ili stupanj preživljavanja bez znakova postojanja bolesti (postotak pacijenata koji nemaju znakove bolesti nakon liječenja kroz određeni vremenski period). Ovakvo statističko grupiranje ljudi nije u potpunosti ispravno jer je svaki pacijent drugačiji i drugačije reagira na terapiju, ali se može dobiti približno dobar vremenski okvir. Ukoliko je liječenje koje je primijenjeno bilo uspješno,

mogu se dogoditi dva scenarija: rak je izliječen ili je u remisiji. Izlječenje je stanje kada u tijelu više ne postoje stanice raka i ne postoji mogućnost pojave istog. Remisija je stanje u kojem u kojem su simptomi raka smanjeni. Remisija može biti djelomična ili potpuna. Kod potpune remisije rak više ne pokazuje simptome. Ukoliko je pacijent dulje od 5 godina u remisiji liječnik ga može izvijestiti da je rak izliječen iako uvijek postoji mogućnost ponovne aktivacije stanica raka i nastavak njegovog širenja. U slučaju da je rak u remisiji potrebno je stalno pratiti stanje u kojem se rak nalazi i po potrebi ponovno na njega djelovati da uđe u remisiju.[7]

Postoje brojne terapije za liječenje raka. Terapija koja će se primijeniti određuje se ovisno o tipu raka te o stupnju u kojem se nalazi. Kod određenog broja oboljelih jedan tip terapije je dovoljan dok se kod većine primjenjuje kombinirana terapija poput kirurškog odstranjivanja tumora i kemoterapija ili terapija zračenjem. Moguće su i druge terapije poput imunoterapije, ciljane terapije ili hormonske terapije. Također je moguće uključiti se u razna klinička ispitivanja.[8]

#### *1.1.5.1. Kirurška terapija*

Kod kirurške terapije odstranjuje se tumor korištenjem invazivnog pristupa u kojem dolazi i do oštećenja zdravog tkiva. Potrebno je napraviti dovoljno velik otvor kroz zdravo tkivo da bi se došlo do tumora. Osim tradicionalnog pristupa kirurškim zahvatima moguće su i krio-operacije u kojima se korištenjem niskih temperatura uništavaju tumorske stanice, laserske operacije u kojima se primjenjuje intenzivno fokusirano svjetlo za izvođenje rezova što omogućuje smanjenje štete na okolno tkivo, hipertermijska terapija kod koje se dio tijela zagrijava što dovodi do stanične smrti ili ih pravi osjetljivima na radijaciju i neke tipove kemoterapija te fotodinamičke terapije kod koje se u tijelo unose prolijekovi koji se pod utjecajem točno određenog svjetla pretvaraju u svoj aktivni oblik i ubijaju osvijetljene stanice.

#### *1.1.5.2. Radijacijska terapija*

Radijacijska terapija je tip terapije u kojoj se za uništavanje stanica raka koriste visoke doze radijacije. Visoke doze radijacije dovode do oštećenja DNA što dovodi do nepovratno narušene funkcionalnosti stanica te stanične smrti. Nakon smrti stanice ona se razlaže i uklanja iz tijela. Ovaj tip terapije ne daje rezultate trenutno već oni postaju vidljivi tek nakon nekoliko tjedana, a same stanice raka odumiru i mjesecima iza same primjene. Postoje dva osnovna pristupa radijacijskoj terapiji: zračenje tijela izvana i

unutartjelesna radijacijska terapija. Kod zračenja izvana radijacija se dovodi u obliku zrake koja pogađa tijelo pod raznim kutovima ciljajući sam tumor dok se kod unutartjelesne radijacijske terapije izvor zračenja unosi u tijelo. Izvor može biti tekućina ili krutina. Osim uništavanja stanica raka radioterapija se koristi i za kontroliranje simptoma raka poput boli, inkontinencije ili teškoća u disanju. Radioterapija se može koristiti u svim fazama liječenja:

- predoperativno za smanjivanje veličine tumora, da bi se lakše uklonio i da bi se smanjila šansa od postoperativnog širenja raka
- tijekom operacije prilikom čega se koristi za direktno ciljanje samog tumora bez prolaska kroz zdravo tkivo
- nakon operacije za uništavanje preostalih stanica raka.

Iako je radioterapija veoma efikasna, ljudsko tijelo može primiti samo određenu dozu zračenja, nakon čega je zbog velike stanične smrti funkcija nepovratno narušena, a moguća je i smrt od pretjeranog izlaganja radijaciji.

#### *1.1.5.3. Kemoterapija*

Kemoterapija koristi različite kemijske spojeve za liječenje raka. Radi na principu zaustavljanja ili usporavanja rasta stanica raka te sprječavanja njihova dijeljenja. Kemoterapija se upotrebljava za dvije primjene:

- za tretiranje raka gdje djeluje kao lijek, smanjuje šansu ponovne aktivacije raka te zaustavlja rast ili dijeljenje stanica
- za olakšavanje simptoma raka pri čemu se koristi za smanjivanje tumora koji uzrokuju bol i druge zdravstvene probleme.

Kemoterapija se može primijeniti na više načina:

- oralno u obliku tableta, kapsula ili tekućina
- intravenozno
- intratekalno injektiranjem između slojeva tkiva koji oblažu mozak i leđnu moždinu
- intraperitonealno injektiranjem u trbušnu šupljinu
- intraarterijalno injektiranjem u arteriju koja hrani tumor
- topički u obliku kreme koja se nanosi na oboljeli dio kože

#### *1.1.5.4. Imunoterapija*

Imunoterapija je način liječenja raka koji koristi vlastiti tjelesni imunološki sustav u borbi protiv raka. Spada u biološke terapije jer koristi žive stanice za borbu protiv raka. Koristi se nekoliko tipova imunoterapije za liječenje raka na principu pomaganja imunološkom sustavu da se bori protiv raka ili stimuliranjem imunološkog sustava da napada stanice raka. Oblici imunoterapije koja pomaže imunološkom sustavu da djeluje direktno na rak uključuju:

- inhibitori kontrolnih točaka - lijek djeluje kao inhibitor molekula koje sprječavaju da T stanice uništavaju tumorske stanice. Ovaj tip terapije ne napada sam tumor već onemogućava njegov obranu od imunološkog odgovora
- transfer posvojenih stanica – T stanice se uzimaju iz samog tumora te se odabiru samo najbolje u uništavanju tumora. Takve stanice se uzgoje u velikom broju i vraćaju natrag u tijelo gdje vrše svoju zadaću
- monoklonska antitijela – to su laboratorijski kreirani proteini koji se vežu na tumorske stanice. Vezani mogu označiti tumorske stanice i napraviti ih vidljivima imunološkom sustavu da ih lakše uništi, neka antitijela mogu blokirati stanicu da raste ili se dijeli, a neka antitijela uzrokuju direktno samouništenje tumorskih stanica prilikom vezivanja. Moguća je primjena antitijela koja na sebi imaju vezane toksine koji se prilikom vezivanja antitijela unose u tumorsku stanicu i uništavaju je. Ovaj tip imunoterapije još se smatra i ciljanom terapijom zbog specifičnosti vezivanja antitijela.
- terapija cijepljenjem – koriste se tvari koje pomažu pokrenuti imunološki odgovor prema stanicama raka.

#### *1.1.5.5. Ciljana terapija*

Ciljana terapija je tip terapije koja djeluje na genetske promjene koje omogućavaju raku da raste, da se dijeli i širi u tijelu. Lijekovi za ciljanu terapiju su malomolekulski lijekovi ili monoklonska antitijela. Malomolekulski lijekovi se koriste zbog svog svojstva da lako ulaze u stanice pa mogu djelovati na unutarstanične procese. Monoklonska antitijela ne ulaze u stanice već se vežu za njenu površinu. Ciljane terapije djeluju na brojne načine:

- pomažu imunološkom sustavu da uništava stanice raka
- sprječavaju stanice raka da rastu

- sprječavaju signale za angiogenezu
- prenose toksične tvari izravno u stanice raka
- izazivaju direktnu smrt stanica raka
- izglađuju stanice raka sprječavajući stvaranje hormona u tijelu potrebnih za njihov rast.

Ovakav tip terapije je veoma selektivan prema stanicama raka i nanosi minimalnu štetu zdravim stanicama, ali razvoj ovakvih terapija je veoma skup te postoji mogućnost razvoja rezistencije stanica tumora na primijenjeni lijek.

#### *1.1.5.6. Hormonska terapija*

U hormonskoj terapiji koriste se različiti hormoni za usporavanje ili zaustavljanje širenja raka. Primjenjuje se kod raka koji zahtijeva hormone za svoj rast i razvoj. Još se naziva i endokrinom terapijom. Hormonska terapija se može koristiti za dvije različite namjene:

- za liječenje raka kao terapija za smanjivanje šanse za reaktivaciju raka ili za usporavanje ili zaustavljanje njegova rasta
- za kontroliranje simptoma koji su izazvani smanjenim lučenjem hormona iz oboljelih tkiva poput hormonskog nadomještanja kod pacijenata s rakom prostate koji je ušao u neoperabilni stadij.

Hormonska terapija radi na način da ili blokira mogućnost tijela da sintetizira određene hormone ili izmjenjuje način kako hormoni djeluju unutar tijela. Ovaj tip terapije ne koristi se samostalno već isključivo u kombiniranim terapijama gdje služi kao predterapija za smanjenje veličine tumora prije kirurške terapije ili radioterapije, može služiti za smanjivanje šanse reaktivacije raka ili za uništavanje stanica koje su se već raširile po tijelu.

#### *1.1.5.7. Presađivanje matičnih stanica*

Presađivanje matičnih stanica koristi se za ponovnu uspostavu tjelesne sposobnosti da stvara krvne stanice koja je izgubljena tijekom liječenja raznih tipova raka putem visokih doza kemoterapije ili radioterapije.

Presađivanje se vrši ubrizgavanjem tih stanica u krv nakon čaga one putuju u koštanu srž gdje zauzimaju mjesto uništenih stanica te se diferenciraju u krvotvorne stanice. Moguće je izolirati krvotvorne matične stanice iz koštane srži, krvi ili pupčane vrpce. Donor može biti sam pacijent pa se takvo doniranje naziva autologno, može biti neki

drugi odgovarajući donor što se naziva alogeno doniranje te donor može biti jednojajčani blizanac, ukoliko ga pacijent ima, te se u tom slučaju to naziva sinergijskim donorstvom. Ukoliko se radi o donoru s različitom DNA potrebno je zadovoljiti niz kriterija da bi se izbjeglo odbacivanje presađenih stanica. Ovaj tip terapije obično se ne koristi za direktno liječenje raka već kao pomoć pri oporavku nakon drugih tipova liječenja. Međutim kod nekih leukemija i multiplog mijeloma presađivanje matičnih stanica je pokazalo da uspješno uništava preostale stanice raka nakon drugih tipova terapije stvarajući bijele krvne stanice koje napadaju stanice raka.

## 1.2.Stanične linije

Stanična linija je populacija stanica koja je uzgojena u kontroliranim uvjetima najčešće izvan svog prirodnog okruženja. Nakon izdvajanja iz živog tkiva stanice se održavaju na životu u simuliranim uvjetima u kojima im se pruža sve potrebno za rast i razmnožavanje. Održavanje se vrši u prilagođenim posudama koje sadrže hranjivi medij. Hranjivi medij mora sadržavati sve tvari koje bi bile pružene stanicama da se nalaze u svojoj prirodnoj sredini, pa tako u sastav medija ulaze aminokiseline, ugljikohidrati, vitamini,minerali, faktori rasta, hormoni te plinovi poput $CO_2$ i $O_2$. Osim hranjivih tvari potrebno je dodati pufere te kontrolirati osmotski tlak i temperaturu. Većina stanica zahtijeva površinu ili suspendirani supstrat na koji se mogu pričvrstiti dok ostale stanice ne zahtijevaju pa se one mogu uzgojiti unutar medija kao suspendirana kultura. Životni vijek staničnih linija je određen samim skraćivanjem molekule DNA i gubitkom genetičke informacije.[9] Neke stanične linije su napravljane besmrtnima pa se one mogu reproducirati beskonačno uz održavanje optimalnih uvjeta za njihov rast. Besmrtnost je postignuta mutacijom na genima zaduženim za starenje pa stanica može ulaziti u proces diobe bez da na nju utječu normalni mehanizmi starenja stanice koji nakon određenog broja dioba sprječavaju stanicu da se dijeli ne bi li se izbjegao prijenos nakupljenih pogrešaka na genomu na stanice kćeri. Ovakav tip stanične linije veoma je važan za znanstvena istraživanja u biokemiji i staničnoj biologiji, a sve se više koriste u biotehnologiji.[10] Kada se govori o staničnim linijama tada se misli na stanice dobivene iz višestaničnih eukariotskih organizama (životinja, biljaka, gljiva i mikroba).

### 1.2.1. Održavanje staničnih linija na životu

Nakon izolacije stanica koje želimo uzgojiti u staničnoj kulturi iz živog tkiva organizma one ulaze u prirodni proces starenja te se prestaju dijeliti nakon određenog broja staničnih dioba pri čemu i dalje zadržavaju svoju funkciju. Proces starenja različit je kod različitih staničnih linija, a opisuje se Hayflickovom granicom.[11]

Stanice se uzgajaju na pogodnoj temperaturi i u atmosferi sastavljenoj iz pogodnog omjera plinova (za stanice sisavaca to je temperatura od 37 °C i atmosfera s oko 5% koncentracije $CO_2$) unutar inkubatora za stanice.

Slika 4: Inkubator za stanične linije

Veoma je važno prilagoditi uvjete unutar inkubatora onima u prirodnom okruženju stanice jer ista stanična linija stvara druge fenotipe stanica pri drugačijim uvjetima. Stanice nisu direktno izložene zraku već se nalaze potopljene unutar medija za rast. Medij za rast mora sadržavati tvari koje bi se prirodno nalazile u njihovoj okolini unutar živog organizma. Ovisno o tipu stanica koje se uzgajaju medij mora zadovoljiti uvjete određene razine pH, koncentracije glukoze, koncentracije različitih faktora rasta te drugih nutrijenata koje stanica zahtijeva za rast i razvoj.

Tablica 1: Sastojci medija i njihova uloga

| Sastojak | Uloga |
|---|---|
| **Izvor ugljika (glukoza/glutamin)** | Izvor energije |
| **Aminokiseline** | Građevni elementi proteina |
| **Vitamini** | Održavanje zdravlja, rast i reprodukcija |
| **Izotonična otopina mineralnih soli** | Održavanje osmotskog tlaka i izvor metalnih iona |
| **Fenolsulfonftalein (PSP)** | pH indikatorska boja (crvena) koja zakiseljavanjem prelazi u žutu, a porastom koncentracije baza u ljubičastu |
| **Biskarbonatni /HEPES pufer** | Održavanje pH medija |

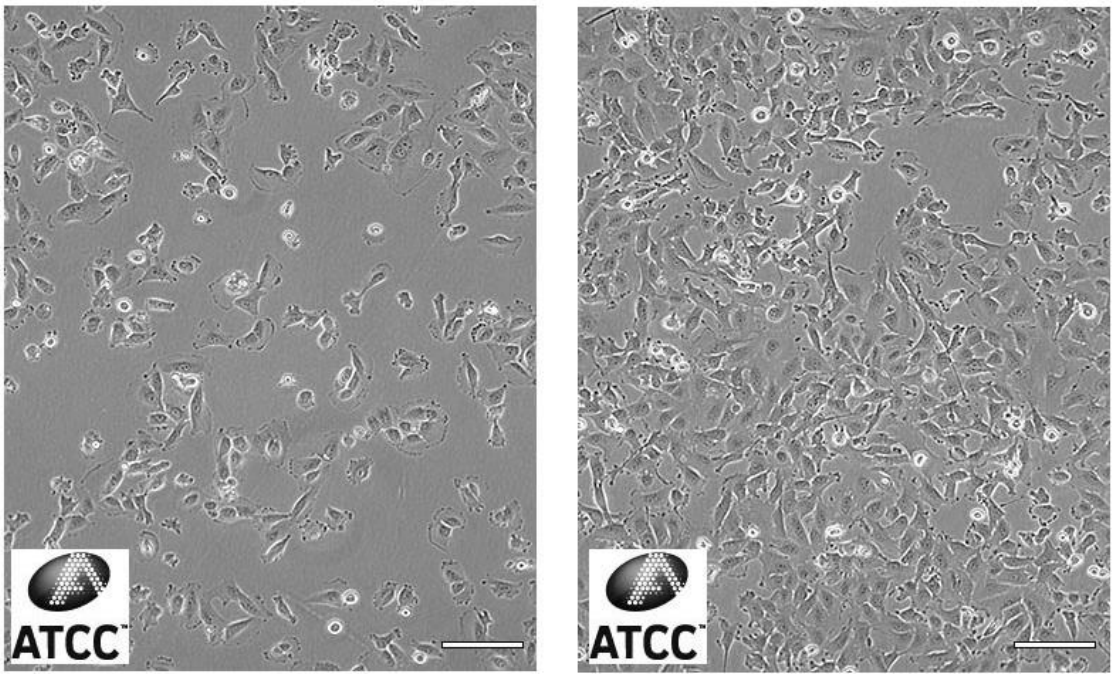
Tablica 2: Najčešće korišteni uvjeti za uzgoj u inkubatoru

| **Parametri** | |
|---|---|
| **Temperatura** | 37 °C |
| **$CO_2$** | 5 % |
| **Relativna vlažnost atmosfere** | 95 % |

Osim okolišnih uvjeta te sastojaka hranjive podloge za uzgoj staničnih linija važna je i gustoća nasijavanja stanica (broj stanica po volumenu hranjive podloge) te potreba za učvršćivanjem za površinu. Stanice se drugačije ponašaju kada se nalaze u gusto nasađenoj podlozi ili kada imaju više praznog prostora oko sebe. Također brojne stanične linije ne mogu preživjeti suspendirane u podlozi već zahtijevaju površinu za rast.[9]

### 1.2.2. Stanična linija T-24

Stanična linija T-24 je besmrtna stanična linija uzgojena iz tkiva mokraćnog mjehura oboljelog od karcinoma prijelaznih stanica.[13] Morfološki prijelazne stanice su epitelne stanice koje se nalaze na površini mjehura i čine izolacijski sloj koji odjeljuje mjehur od urina. Ova stanična linija je primarno adherentna linija i zahtijeva površinu na koju se može vezati za rast i razvoj.

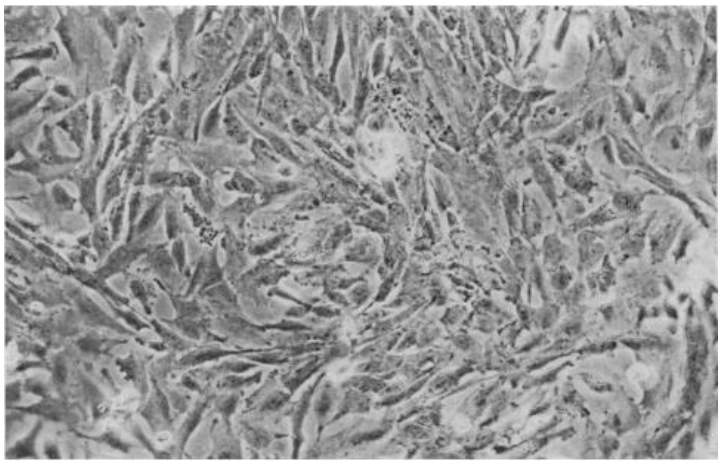



Slika 5: Mikroskopska slika stanične linije T24

Generacijsko vrijeme za stanice ove linije je 19 sati. Čuva se u 1,5 mM L-glutamina i 2200 mg/L natrijevog bikarbonata u koju je dodano 10% fetalnog goveđeg seruma kao izvora energije. Rastu na temperaturi od 37°C i koncentraciji $CO_2$ od oko 5%. Precjepljivanje ove stanične linije vrši se u omjerima 1:3 do 1:8, a mijenjanje hranjive podloge mora se vršiti 2 do 3 puta na tjedan. Precjepljivanje se vrši uklanjanjem medija te ispiranjem posude na koju su stanice učvršćene s otopinom 0,25% tripsina, 0,03% EDTA. Potom se doda 1 do 2 mL otopine tripsin-EDTA te ostavi na sobnoj temperaturi da se stanice odvoje od podloge. Stanicama se dodaje svježa hranjiva podloga nakon čega se prenesu u novu posudicu gdje se one ponovno vežu za stjenke posude.[12,14]

### 1.2.3. Stanična linija TCCSUP

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

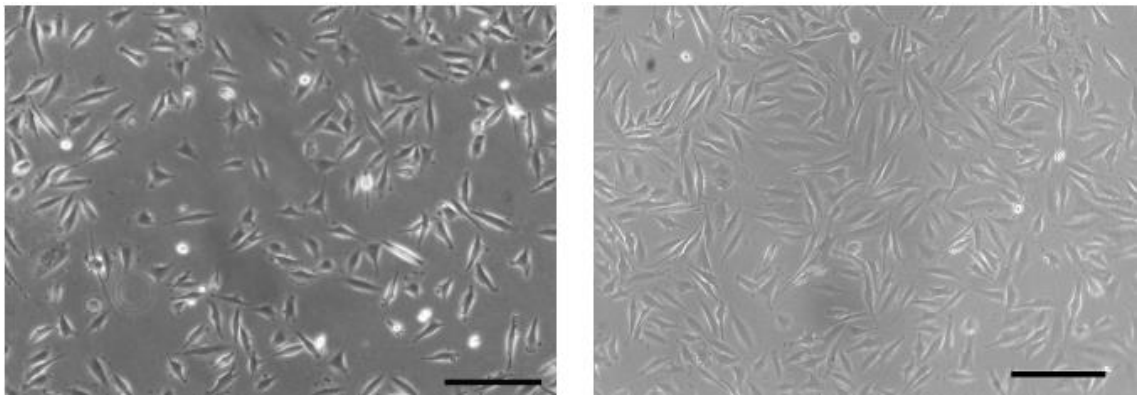


Slika 6: Mikroskopska slika stanične linije TCC SUP

Adherentna su stanična linija pa im za rast i razvoj treba podloga. Generacijsko vrijeme im je od 30 do 40 sati.[17] Čuvaju se u hranjivoj podlozi koja sadrži 2mM L-glutamina, 1mM 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. Precjepljivanje se vrši u omjerima od 1:2 do 1:3, a hranjiva podloga se mora zamijeniti 2 do 3 puta na tjedan. Precjepljivanje se vrši uklanjanjem hranjivog medija nakon čega se sloj stanica ispere otopinom 0,25% (w/v) tripsina i 0,53 mM EDTA. Doda se 2 do 3 mL otopine tripsin-EDTA da se stanice odvoje od podloge. Nakon odvajanja stavi se hranjiva podloga i prenesu stanice u novu posudu te stave u inkubator.[15,16]

### 1.2.4. Stanična linija LN-229

Stanična linija LN-229 uzgojena je iz moždanog tkiva točnije iz desnog frontalnog parieto-okcipitalnog korteksa oboljelog od glioblastoma.



Slika 7: Mikroskopska slika stanične linije LN229

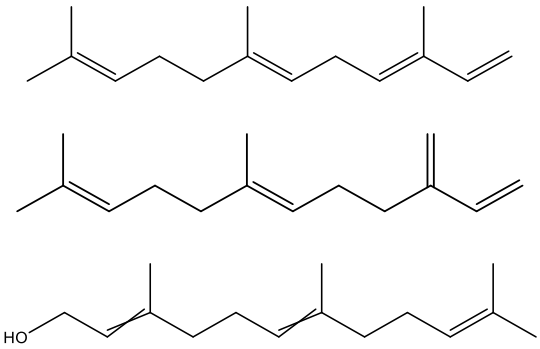
Morfološki ove stanice su epitelne i adherentnog su tipa. Generacijsko vrijeme im je 31 sat.[20] Čuvaju se u hranjivoj podlozi koja sadrži 4 mM L-glutamina, 1mM glukoze, 1mM natrijevog piruvata i 1500 mg/L natrijevog bikarbonata te 5% fetalnog goveđeg seruma. Rastu na temperaturi od 37°C. Precjepljivanje se vrši u omjerima 1:4 do 1:6. Vrši se tako da se prvo ukloni hranjiva podloga iznad sloja stanica. Nakon uklanjanja podloge stanični sloj se ispire s otopinom 0,25% (w/v) tripsina i 0,53% (w/v) EDTA da bi se uklonili ostatci podloge. Dodaje se 2 do 3 mL otopine tripsin-EDTA da se stanice odlijepe od površine posude nakon čega im se doda hranjiva podloga i prenesu se u novu posudu.[18,19]

## 1.3. Ispitivani spojevi

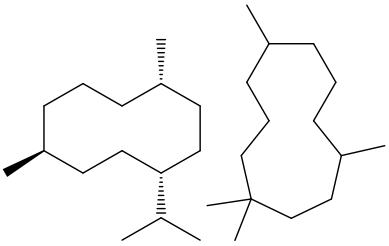
### 1.3.1. Seskviterpeni

Seskviterpeni su C15 terpenski spojevi građeni od tri izoprenske jedinice. Zbog velikog broja ugljikovih atoma seskviterpeni grade više različitih prostornih struktura. Razlikujemo:

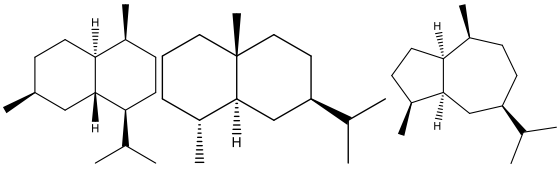
- acikličke seskviterpene poput α-farnezena, β-farnezena i farnezola,



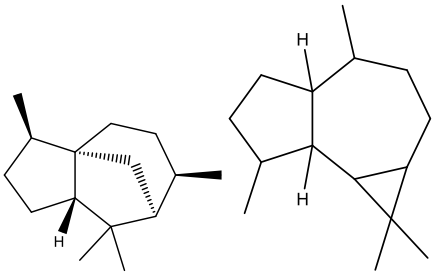

- monocikličke seskviterpene poput germakrana i humulana,



- bicikličke seskviterpene kao što su kadinan, eudezman i gvajan,




- tricikličke seskviterpene poput cedrana i aromadendrana.



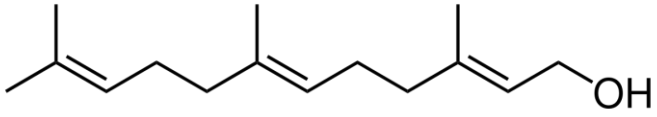
Osim navedene podjele po broju prstenova u strukturi postoji i podjela seskviterpena u 18 grupa koja je temeljena na dokazanom ili pretpostavljenom biosintetskom odnosu.[21]

Seskviterpene često nalazimo kod viših biljaka, ali i u brojnim drugim organizmima poput morskih organizama i gljiva. Kemijski gledano, seskviterpene nalazimo u obliku ugljikovodika te u oksidiranim oblicima poput laktona, alkohola, kiselina, aldehida i ketona. Sastavni su dio velikog broja eteričnih ulja i farmakoloških proizvoda kojima daju aromu. [22]

### 1.3.2. Farnezol

Farnezol je seskviterpenski aciklički alkohol. Pri standardnim uvjetima je bezbojna tekućina. Netopljiv je u vodi, a dobro topljiv u mastima. Ima cvjetni miris koji neke ljude podsjeća na đurđice (lat.*Convallaria majalis*). Sintetizira se iz manjih izoprenskih spojeva u biljkama i životinjama. Reakcijom geranil-pirofosfata s izopentenil-pirofosfatom nastaje C15 spoj farnezil pirofosfat koji je međuspoj za biosintezu seskviterpena. Daljnjom oksidacijom nastaje farnezol.

Farnezol nalazimo u brojnim eteričnim uljima poput eteričnog ulja limunske trave, ruže, citronele itd. Koristi se u proizvodnji parfema za naglašavanje cvjetnih nota u parfemu tako da djeluje kao dodatno otapalo koje regulira isparljivost drugih mirisnih spojeva. Za ovu namjenu se veoma često koristi kod proizvodnje parfema na bazi ljiljana. U duhanskoj industriji se koristi za aromatiziranje cigareta. Koristi se i u kozmetici jer pokazuje antibakterijsko djelovanje.[23]



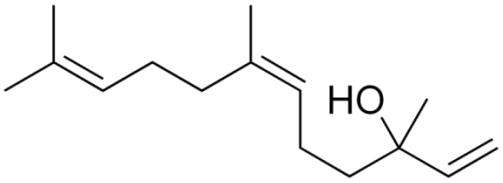

Slika 8: Strukturna formula farnezola

Osim već spomenutog antibakterijskog djelovanja farnezol se ispituje kao kemopreventivni i antitumorski agent.[23]

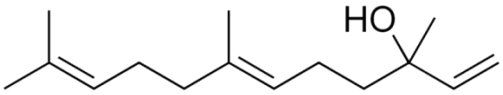
### 1.3.3. Nerolidol

Nerolidol, također znan kao peruviol, je alifatski seskviterpenski alkohol s dva kiralna centra u svojoj strukturi. U prirodi ga nalazimo kao smjesu *cis*- i *tran-s*

konformacijskih izomera. Sam nerolidol je izomer farnezola s različitim položajem jedne dvostruke veze i hidroksilne skupine. Sastojak je brojnih eteričnih ulja kojima daje drvenastu aromu poja podsjeća na koru drveta. Koristi se kao pojačivač aroma te kao mirisna komponenta u parfemima, kozmetici, šamponima, sapunima i drugim higijenskim potrepštinama.




Slika 9: *cis*-Nerolidol

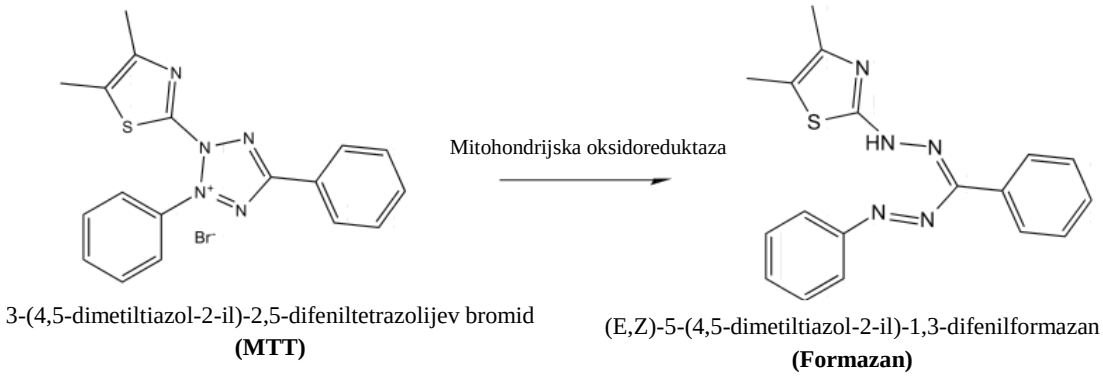



Slika 10:*trans*-Nerolidol

Ispitivanja su pokazala da nerolidol ima svojstvo poboljšanja transdermalnog transporta lijekova i drugih tvari koje prodiru kroz kožu zbog njegova raspoređivanja u dvosloju između fosfolipidnih molekula. Nerolidol pokazuje antitumorsko djelovanje zbog utjecaja na prenilaciju proteina ili efekta na mevalonatni sintetski put. Antibakterijska svojstva također su potvrđena kroz niz ispitivanja sugerirajući na to da nerolidol dovodi do oštećenja stanične membrane. Potvrđeno je i antifungalno djelovanje te antilišmenijsko djelovanje (uništava parazit vrste *Leishmania*). Nerolidol pokazuje svojstvo inhibicije stvaranja čireva induciranih etanolom, indometakinom i stresom. Koristi se u raznim pesticidima.[24,25,26]

## 1.4. Postupak ispitivanja spojeva na antiproliferirajuće djelovanje

Postoji mnogo različitih pristupa koji se mogu iskoristiti kao test na antiproliferirajuće djelovanje određenog spoja, ali MTT test se zbog svoje jednostavnosti i brzine provedbe ustalio kao prvi izbor za ovakav tip ispitivanja. MTT test je kalorimetrijski test za procjenu metaboličke aktivnosti u stanicama. NAD(P)H ovisne oksidoreduktaze koje se nalaze unutar živih stanica, pod određenim uvjetima, mogu se koristiti kao pokazatelj broja živih stanica u ispitivanom sustavu. Oksidoreduktaze su enzimi sposobni reducirati žuti tiazolni spoj MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) do formazana. Rezultirajući intracelularni ljubičasti formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 570 nm.




Slika 11: Oksidoredukcijska reakcija MTT (žuto)pri čemu nastaje ljubičasto obojeni formazan

Stanice s slabijim metabolizmom, poput timocita i splenocita, reduciraju jako male količine MTT dok stanice sa snažnim metabolizmom (one koje se brzo dijele) reduciraju velike količine MTT. Za provođenje samog testa veoma je važno paziti na reakcijske uvjete jer oni bitno utječu na samu metaboličku aktivnost pa možemo dobiti pogrešne rezultate iako same stanice nisu bile pod utjecajem ispitivanog spoja.[27]

## 1.5. Metode određivanja i identifikacije proteina

### 1.5.1. Građa i struktura proteina

Proteini, također poznati kao polipeptidi, su organski spojevi izgrađeni od aminokiselina koje su povezane u linearne lance koji se slažu u globularne strukture. Postoji dvadeset aminokiselina koje prevladavaju u strukturama proteina koji se pojavljuju u prirodi. Proteini se razlikuju jedan od drugog po tipu, broju i rasporedu aminokiselina koje ga grade. Rezultat toga je razlika u molekulskoj strukturi i fizikalno-kemijskim osobinama proteina. Tako lanac aminokiselina predstavlja primarnu strukturu toga proteina. Sama primarna struktura najčešće je biološki neaktivna. Ovisno o svojstvima aminokiselina koje ga grade protein se, najčešće sam, smotava u trodimenzionalne strukture. Tako nastaje sekundarna struktura proteina koja je stabilizirana vodikovim vezama i sadrži jednostavne trodimenzionalne strukture poput uzvojnica i pločastih struktura. Tercijarna struktura proteina nastaje kada se sekundarne strukture stabiliziraju u prostoru u odnosu na druge sekundarne strukture istog aminokiselinskog lanca. Sama tercijarna struktura je biološki aktivna i predstavlja nativnu strukturu proteina, a to je forma u kojoj se taj protein prirodno nalazi. Neki aminokiselinski lanci se udružuju s drugim lancima tvoreći proteinske komplekse koji čine kvartarnu strukturu proteina. Proteini su esencijalni građevni element živih organizama i sudjeluju u svim procesima koji se odvijaju u stanicama. Mnogi proteini su enzimi, biološki katalizatori, koji ubrzavaju kemijske reakcije unutar stanice što ih čini neizostavnim dijelom metabolizma.[29,30]

### 1.5.2. Određivanje ukupne količine proteina u uzorku

Određivanje sadržaja ukupnih proteina vrši se putem raznih metoda zasnovanih na fizikalno-kemijskim osobinama proteina. Kjeldahl i Dumas metodama određuje se ukupni sadržaj proteina na temelju sadržaja dušika koji se nalazi u uzorku. Ni jedna ni druga metoda nisu direktne metode određivanja proteina jer neke aminokiseline imaju više od jednog dušika u molekuli pa se za interpretaciju rezultata koriste konverzijski faktori. Kod Kjeldahl metode sav dušik se korištenjem jake mineralne kiseline prevodi u amonijak koji se titracijski određuje i iz kojeg se posebnom formulom dobije ukupna količina proteina. Dumas metoda koristi visokotemperaturno spaljivanje uzorka pri čemu se vezani dušik oslobađa kao $N_2$ koji se nakon pročišćavanja određuje konduktometrijski. Korištenjem izvedene formule i konverzijskog faktora odredi se ukupni sadržaj proteina u uzorku. UV-Vis spektroskopijske metode se također koriste

za određivanje sadržaja proteina. Najjednostavnija je mjerenje apsorbancije uzorka na 280 nm jer aminokiseline triptofan i tirozin apsorbiraju elektromagnetsko zračenje te valne duljine, a sadržane su u gotovo svim polipeptidnim lancima. Postoji mogućnost interferencije mjerenja s DNA koja također apsorbira zračenje na istoj valnoj duljini no to se rješava kontrolnim mjerenjem druge valne duljine i određivanjem razlike. Biuret metoda je metoda kojom se stvara ljubičasto obojenje korištenjem iona bakra za bojanje peptidnih veza. Određivanjem apsorbancije na 540 nm i korištenjem kalibracijske krivulje dobije se količina proteina u uzorku. Lowrijeva metoda je poboljšanje na Biuret metodu jer se osim bakrovih iona koristi i boja koja se veže na tirozinske i triptofanske rezidue dajući izraženije obojenje i nižu granicu određivanja. Metode bojanjem zasnivaju se na korištenju anionske boje koja se veže na pozitivno nabijene proteine što se postiže podešavanjem pH vrijednosti otopine. Vezivanjem boje nastaje netopljivi talog, a nevezana boja ostaje u otopini. Iz razlike apsorbancije elektromagnetskog zračenja korištene boje, prije bojanja i nakon bojanja, izračuna se količina proteina u uzorku. Za izračun ukupne količine proteina moguće je koristiti i turbidimetrijsku metodu koja se zasniva na denaturaciji proteina korištenjem kemijskog agensa poput trikloroctene kiseline što zamuti otopinu. Određivanjem turbiditeta dobije se količina proteina u uzorku. Osim ovih metoda, postoje metode zasnovane na mjerenju fizikalnih svojstava proteina kao što su mjerenje gustoće i indeksa refrakcije, mjerenje adsorpcije elektromagnetskog zračenja (UV-Vis, IR i NMR tehnike) te mjerenje rasipanja elektromagnetskog zračenja i ultrazvuka. Ove metode daju najmanje pouzdane rezultate, ali ih je najlakše primijeniti na velike proizvodne sustave za kontrolu samog procesa.[29,30]

### 1.5.3. Metode izdvajanja proteina iz smjese

Razdvajanje proteina iz smjese zasnovano je na njihovim različitim fizikalno-kemijskim svojstvima, kao što su: veličina, naboj, adsorpcijske karakteristike, topljivost i toplinska stabilnost. Odabir metode, koja će se koristiti za separaciju, ovisi o nizu faktora kao što su: razlozi same analize, količina uzorka na raspolaganju, željena čistoća, dostupnost opreme, vrsti proteina prisutnih u uzorku i sama cijena analize. Potrebno je obratiti pažnju na to je li potrebno da protein ostane u nativnoj strukturi jer brojne metode za razdvajanje i identifikaciju narušavaju nativnu strukturu proteina. Poznavanje strukture i mogućih interakcija koje određivani protein ima od velike je pomoći kod odabira metode no ukoliko se radi o nepoznatom proteinu postoji

vjerojatnost da će za točno razdvajanje i identifikaciju samog biti potrebno obaviti veći broj analiza. Ukoliko je struktura poznata možemo prilagoditi uvjete u smjesi kao što su pH, ionska jakost, otapalo i temperaturu da pospješimo izdvajanje određivanog proteina iz smjese. [29,30]

#### *1.5.3.1. Metode razdvajanja bazirane na topljivosti*

Metode razdvajanja bazirane na topljivosti proteina iskorištavaju činjenicu da su različiti proteini manje ili više topljivi u vodenoj otopini. Topljivost proteina determinirana je aminokiselinama koji grade njegov polipeptidni lanac te njihov razmještaj u prostoru jer to određuje njegovu veličini, oblik, hidrofobnost i električni naboj. Proteine je moguće specifično istaložiti ili otopiti promjenama pH vrijednosti, ionske jakosti, dielektrične konstante ili temperature otopine. Ova metoda razdvajanja najlakša je za primjenu u velikim sustavima za razdvajanje proteina zbog njezine jednostavnosti, brzine i niske cijene izvedbe. Većinom predstavlja prvi korak za izdvajanje proteina u proizvodnim pogonima jer eliminira većinu onečišćenja. U ovaj tip metoda za izdvajanje proteina ubrajamo:

1. Isoljavanje – postupak taloženja proteina dodatkom velike količine soli, dovoljno velike da pređe kritičnu granicu poznatu kao granica isoljavanja. Proteini u otopini su hidratizirani. Dodatkom soli voda zbog većeg afiniteta hidratizira sol i otapa je, a kada je količina soli toliko velika da ne postoji dovoljan broj molekula vode da hidratiziraju protein, on se izdvaja iz otopine. Najčešće se za isoljavanje koristi amonijev sulfat zbog njegove velike topljivosti u vodi, ali moguće je koristiti i druge soli poput natrijevog ili kalijevog klorida. Isoljavanje se najčešće vrši u dva koraka. Prvo se unese dovoljno soli da se približi granici isoljavanja za određeni protein, ali se ta granica ne prelazi. Svi proteini manje topljivosti se istalože ovim korakom smanjujući broj primjesa u daljnjemu radu. U drugom koraku koncentracija soli u otopini podiže se malo iznad same granice isoljavanja što dovodi do taloženja traženog proteina. U oba koraka se istaloženi proteini uklanjaju centrifugiranjem radi ubrzanja postupka rada. Ova metoda je jednostavna za izvođenje, ali stvara problem kontaminacije otopine velikom količinom soli pa su potrebni daljnji postupci za njihovo uklanjanje.
2. Izoelektrična precipitacija – postupak taloženja proteina na temelju njihove izoelektrične točke (pI), pH vrijednosti pri kojoj je ukupni naboj molekule

proteina nula. Nepostojanje električnog naboja dovodi do situacije da ništa ne sprječava molekule proteina da koaguliraju. Svi proteini imaju različitu izoelektričnu točku pa podešavanjem pH vrijednosti otopine možemo izdvojiti točno određeni protein.

3. Frakcioniranje otopine pomoću otapala – Topljivost proteina ovisi o dielektričnoj konstanti otapala koje ga solvatira zato što solvatacija utječe na elektrostatske interakcije između nabijenih čestica. Snižavanjem dielektrične konstante otopine smanjuje utjecaj elektrostatskih interakcija tako smanjujući dielektričnu konstantu čime se smanjuje topljivost proteina. To se događa jer otapala s visokom dielektričnom konstantom tvore barijeru između nabijenih čestica dok otapala niske dielektrične konstante stvaraju otpor nabijenim česticama da se agregiraju. Gubitkom naboja proteini se istalože. Snižavanje dielektrične konstante vodene otopine vrši se dodatkom vodotopljivih organskih otapala poput etanola ili acetona. Potrebna količina ovisi o samom proteinu kojega se izdvaja dajući nam mogućnost separacije na temelju topljivosti. Za izvođenje postupka koristi se koncentracija organskog otapala od 5 do 60% te se postupak izvodi pri 0°C da bi se izbjegla denaturacija proteina oslobođenom toplinom nakon otapanja organskog otapala u vodi.
4. Denaturiranje kontaminirajućih proteina – postupak razdvajanja proteina koristeći se poznavanjem njihove stabilnosti prema toplini i ekstremnim pH uvjetima. Ovaj postupak se koristi za izdvajanje proteina visoke stabilnosti tako da se primjenom visoke temperature ili jako bazičnih i kiselih uvjeta talože manje stabilni proteini, a u otopini zaostaje traženi protein. [29,30]

#### *1.5.3.1. Metode razdvajanja bazirane na adsorpcijskim karakteristikama*

Separacija na temelju različitih adsorpcijskih karakteristika najčešće se izvodi u obliku adsorpcijske kromatografije. Metode su zasnovane na adsorpciji/desorpciji na čvrstoj stacionarnoj fazi baziranoj na različitom afinitetu proteina prema čvrstoj fazi. Dolazi u dvije izvedbe: kromatografija na otvorenoj koloni i visokoefikasna tekućinska kromatografija. U separaciju na temelju različitih adsorpcijskih karakteristika ubrajamo:

1. Kromatografija ionskom izmjenom – kromatografija bazirana na adsorpciji/desorpciji iona u otopini na električki nabijenoj čvrstoj stacionarnoj fazi. Najčešće je korištena kromatografska tehnika za separaciju proteina. Može biti u obliku anionskog izmjenjivača u kojem pozitivno nabijena stacionarna

faza izmjenjuje negativni ion za negativno nabijenu proteinsku molekulu te u obliku kationskog izmjenjivača gdje negativno nabijena stacionarna faza izmjenjuje pozitivno nabijeni ion za pozitivno nabijenu proteinsku molekulu. Selektivnost metode proizlazi iz odabira pH i ionske jakosti otopine koji favoriziraju maksimalno vezivanje željenog proteina. Ostali proteini se u tim uvjetima vežu slabije pa bivaju isprani s kolone. Protein od interesa ispire se s kolone koristeći otopinu za ispiranje koja favorizira otpuštanje tog proteina s kolone.

2. Afinitetna kromatografija – kromatografija bazirana na veoma specifičnom vezivanu proteina od interesa s ligandom kovalentno vezanim za stacionarnu fazu. Ligand je molekula koja ima veoma specifični i reverzibilni afinitet vezivanja za točno određeni protein. Propuštanjem smjese proteina kroz stacionarnu fazu na kojoj je vezan za traženi protein, specifični ligand dovodi do vezivanja traženog proteina dok se ostali proteini isperu s kolone. Protein od interesa se tada ispire s kolone korištenjem otopine za ispiranje koja favorizira desorpciju tog proteina. Ova metoda je veoma efikasna i daje veoma čisti protein, ali veliki nedostatak ove metode je cijena zbog potrebe za proizvodnjom kolona koje sadrže specifične ligande. [29,30]

#### *1.5.3.3.Metode razdvajanja bazirane na veličini proteina*

Metode razdvajanja bazirane na različitoj veličini proteina iskorištavaju volumen koji protein zauzima u prostoru kao separacijsku varijablu. Obično proteinske molekule imaju mase od 10.000 do 1.000.000, ali ove separacijske metode ne koriste masu već Stokeov radijus molekule. Stokesov radijus je prosječni radijus molekule koji ona zauzima dok se nalazi u otopini, a ovisi o trodimenzionalnoj strukturi molekule. Radijus raste promjenom oblika proteina iz gustog globularnog proteina, preko nasumično smotanog oblika do molekule štapićastog oblika. Metode separacije bazirane na veličini proteina su:

1. Dijaliza – koristi se za separaciju molekula kroz polupropusnu membranu koja propušta molekule manje od veličine pora na membrani, a veće molekule ostaju zarobljene. Smjesa proteina ulije se u sustav cijevi napravljenih u obliku polupropusne membrane koje su smještene unutar vodom ili puferom ispunjenog spremnika. Male molekule izlaze iz otopine niz koncentracijski gradijent dok veće molekule ne uspijevaju proći kroz pore na membrani pa zaostaju unutar

sustava. Metoda je veoma spora zahtijevajući provođenje postupka do 12 sati. Nema primjenu u industriji, a u laboratorijskim uvjetima sve rjeđe se primjenjuje. Najčešća uloga dijalize je za uklanjanje soli iz otopine nakon provedenog postupka isoljavanja ili kod promjene pufera.

2. Ultrafiltracija – separacija kroz polupropusnu membranu uz primjenu tlaka. Manje molekule prolaze kroz pore membrane dok veće zaostaju. Sama metoda veoma je slična dijalizi, ali primjena povećanog tlaka ubrzava provođenje postupka. Ova metoda zamijenila je dijalizu kao primarnu metodu razdvajanja proteina.
3. Kromatografija isključivanjem – separacijska tehnika na temelju veličine proteina. Stacionarnu fazu čine porozne kuglice od polimernog materijala. Smjesa proteina propušta se kroz kolonu. Manje molekule ulaze u pore kuglica zaostajući za većim molekulama koje su za to prevelike pa se brže ispiru s kolone. Postignuta je separacija od većih prema manjim molekulama. Veličine pora na kuglicama određuje djelotvornost metode. Ova metoda omogućava određivanje veličine nepoznatog proteina uspoređivanjem volumena potrebnog za njegovu eluaciju s volumenom eluacije proteina poznate veličine. [29,30]

#### *1.5.3.4.Metode razdvajanja primjenom električnog polja*

Metode razdvajanja proteina temeljene na elektroforezi za razdvajanje se oslanjaju na različitosti u migraciji nabijenih čestica kroz otopinu pod utjecajem električnog polja. Ove metode omogućuju razdvajanje proteina na temelju njihove veličine, oblika ili naboja. U elektroforetske metode ubrajamo:

1. Nedenaturirajuću elektroforezu – metoda u kojoj se pokušava očuvati nativna struktura proteina. Za rad primjenjuje se puferska otopina koja održava proteinsku molekulu u nativnom obliku. Na gel (najčešće poliakrilamidni, škrobni ili agarozni) se primjeni napon. Proteini se kreću kroz gel u smjeru elektrode suprotna naboja, a brzina kretanja im ovisi o naboju te trenju molekula i polimerne mreže gela. Ova metoda koristi naboj, veličinu i oblik proteina kao temelj za razdvajanje.
2. Denaturirajuća elektroforeza – metoda razdvajanja proteina na temelju molekulske mase. Za razliku od nedenaturirajuće elektroforeze denaturirajućom elektroforezom proteina izbjegava se utjecaj naboja i oblika molekule postižući razdvajanje korištenjem samo jedne karakteristike što olakšava daljnju

identifikaciju proteina. Za denaturaciju koriste se merkaptoetanol i natrijev dodecilsulfat (SDS), gdje merkaptoetanol razara disulfidne veze, a SDS se hidrofobno veže za proteine dajući im ujednačen negativan naboj po cijeloj dužini molekule i sprječavajući ponovno smatanje u trodimenzionalnu strukturu. Proteini putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi razdvajajući se isključivo prema njihovoj veličini (ovisnoj samo o molarnoj masi) te veličini pora u gelu. Manji proteini kreću se brže kroz gel od većih proteina što dovodi do njihova razdvajanja. Za praćenje dosega razdvajanja koristi se boja, najčešće bromfenol plavo. Ona zbog male mase putuje ispred proteina (stvara front). Proteine je moguće obojiti da bi postali vidljivi. Korištenje standarda ili takozvanog markera moguće je odrediti prosječne veličine proteina dobivenih razdvajanjem.

3. Elektroforeza izoelektričnim fokusiranjem – metoda separacije koja koristi naboj molekula kao karakteristiku razdvajanja. Proteini se razdvajaju na temelju naboja na gelu s pH gradijentom. Kreću prema suprotno nabijenoj elektrodi kroz pH gradijent dok ne dođu u područje pH gdje dostižu svoju izoelektričnu točku. U toj točki protein nema prosječni naboj pa se ne može dalje kretati kroz električno polje omogućujući veoma efikasnu separaciju iz smjese. Moguće je koristiti gelove s uskim ili širokim područjem pH vrijednosti. Gel s uskim područjem pH koristi se kada poznajemo pI određivanog proteina dok se gelovi sa širokim pH područjem koriste za dobivanje šire slike proteinskog sastava u otopini.
4. Dvodimenzionalna elektroforeza – oblik denaturirajuće elektroforeze za postizanje veće rezolucije razdvajanja. Prvo se vrši razdvajanje na temelju izoelektričnog fokusiranja, a onda zakretanjem gela za 90° na temelju veličine molekule.[29,30]

### 1.5.4. Metode za identifikaciju proteina

Kao tehnika za identifikaciju proteina koristi se tehnika Western blot. Najčešća inačica te metode je imunobojanje. Prije imunobojanja obično se izvodi elektroforetsko razdvajanje SDS-PAGE metodom da bi se proteinska smjesa razdvojila na temelju molekulske mase. Proteini se tada prebacuju na specijalne membrane na kojima se dalje izvršava postupak imunobojanja. Imunobojanje je tehnika korištenja specifičnih antitijela za identifikaciju za to antitijelo specifičnog proteina. Zbog te specifičnosti vezivanja antitijela i proteina vezivanje daje dokaz da je riječ o traženom proteinu.

Ostale metode koje se koriste za identifikaciju proteina su Edmanova degradacija i masena spektrometrija. Edmanova degradacija je metoda sekvenciranja aminokiselina koje grade polipeptidni lanac. Aminokiselina se označi određenim markerom kojega možemo identificirati nakon čega se otkine od samog lanca ne narušavajući peptidne veze na bilo kojem drugom položaju u molekuli. Detekcijom markera i izdvajanjem iz otopine vrši se analiza kojom se odredi o kojoj je aminokiselini riječ. Postupak degradacije se ponavlja za svaku aminokiselinu koja gradi lanac dok se ne identificiraju sve aminokiseline. Ova metoda nam daje točan uvid u aminokiselinski sastav polipeptidnog lanca identificirajući određeni protein i omogućujući određivanje svojstava koje bi taj protein mogao imati. Masena spektrometrija je druga metoda za identifikaciju proteina koja mjeri odnos mase i naboja nabijenih čestica. Svaki protein definiran je njegovom molarnom masom pa poznavanjem molekulske mase moguće je identificirati istraživani protein. Postojanje više pikova na spektrogramu nakon analize daje nam za neki protein specifični izgled spektrograma. Postoje baze spektrograma koje je moguće kupiti i tako veoma brzo i pouzdano odrediti o kojem se proteinu radi.[31]

### 1.5.5. Western blot metoda

Western blot metoda ili proteinska imunoblot metoda je analitička tehnika koja se koristi za detekciju specifičnih proteina u uzorku. Koristi se u brojnim granama bioznanosti poput molekularne biologije i imunogenetike. Kao uzorak moguće je koristiti tkivni homogenat ili ekstrakt. Uzorak se prvo podvrgava obradi u vidu denaturacije, a zatim se vrši elektroforeza. Nakon elektroforeze membrana se ispire otopinom koja sadržava specifično antitijelo. Antitijela mogu biti izolirana iz životinja ili mogu biti sintetskog porijekla. Antitijelo se veže za specifični protein nakon čega se višak antitijela ispere. Sekundarno antitijelo se nakon dodatka veže na primarno antitijelo pojačavajući signal, ali i noseći na sebi vezanu molekulu koja služi za razvoj signala. Ta molekula može davati signal bojanjem, imunoflorescencijom ili emisijom radijacije. Metode slične ovoj su dot blot analiza, kvantitativna dot blot analiza, imunohistokemijska analiza, imunocitokemijska analiza te vezani enzimski imunosorbentski test (ELISA).

Sam naziv Western blot je proizašao iz igre riječima na temelju Southern blota koji se koristi za detekciju DNA razvijenog od strane Edwina Southerna koji radi po sličnom principu. [28]

#### *1.5.5.1. Aplikacija*

Western blot metoda često se koristi u biokemiji za kvantitativno određivanje proteina i proteinskih modifikata (poput post-translacijski modificiranih proteina). Koristi se i kao glavna metoda za dokazivanje postojanja određenog proteina unutar uzorka. Moguće je koristiti ovu metodu za procjenu količine proteina u uzorku koristeći se veličinom i intenzitetom boje kojom je obojana vrpca na blot membrani. Također koristeći se standardnim otopinama proteina kojega određujemo moguće je dobiti i približne koncentracije tog proteina u uzorku. Western blot metoda koristi se za dokazivanje proteina i njihove čistoće nakon procesa kloniranja te u medicini za dijagnosticiranje raznih bolesti npr. u HIV testu ili BSE testu. Jedna od novijih primjena ove metode je u sprječavanju krvnog dopinga kod sportaša kod kojeg se u krvotok unose nositelji kisika ne bi li se povećanjem dostupnosti kisika u tijelu poboljšali sportski rezultati. [28]

#### *1.5.5.2. Procedura*

Western blot metoda sastoji se od gel elektroforeze koja služi za razdvajanje proteina. Proteini se razdvajaju u nativnoj strukturi ili se denaturiraju ovisno kakvo razdvajanje želimo postići. Poslije provedene elektroforeze na gelu vrši se elektroforetski transfer proteina na membranu (PVDF ili nitrocelulozna membrana) te imunobojanje da bi se vizualizirao određivani protein. Natrijev dodecilsulfat – poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) se obično koristi kod elektroforetskog razdvajanja proteina. SDS ima ulogu pufera u gelu i u otopini u kojoj se vrši elektroforeza. On daje svim proteinima uniforman negativan naboj čime se sprječava razdvajanje na osnovi naboja i postiže de se svi proteini kreću u istom smjeru prema pozitivnoj elektrodi. Prije same elektroforeze uzorci se često prokuhavaju da bi došlo do denaturacije svih prisutnih proteina. Ovo osigurava da se razdvajanje odvija samo na osnovi duljine polipeptidnog lanca te sprječava enzime prisutne u samom uzorku (proteaze) da degradiraju uzorak. Nakon elektroforetske separacije vrši se transfer proteina na membranu (obično nitroceluloznu ili PVDF), a preostala vezujuća mjesta na membrani se blokiraju korištenjem mlijeka (ili nekog drugog blokirajućeg agensa) da bi se spriječilo nespecifično vezivanje antitijela. Potom se nanosi antitijelo koje se specifično veže na traženi protein, a zatim se nanosi sekundarno antitijelo koje se veže na već vezano primarno antitijelo te se koristi za detekciju putem raznih metoda. Važnost provođenja gel elektroforeze za ovu metodu nije u samom razdvajanju proteina po masi već da bi se spriječilo nespecifično vezivanje antitijela. [28]

#### *1.5.5.3. Priprema uzorka*

Uzorkovanje za Western blot metodu može se vršiti iz tkiva ili iz stanične kulture. Uzorak se prvo usitnjava mehanički korištenjem blendera, homogenizatora ili sonifikacijom. Osim stanica moguće je uzorkovati viruse i izvanstanični matriks koji također sadržavaju proteine koji se mogu odrediti ovom metodom. Različiti detrgenti, soli i puferske otopine mogu se koristiti za poticanje lize stanica i otapanje proteina. Fosfataze i proteaze koje bi mogle oštetiti uzorak, a prirodno se nalaze u uzorku, moraju se inaktivirati dodatkom inhibitora. Sama priprema uzorka vrši se na hladnom da bi se izbjegla denaturacija i degradacija proteina. Moguće je koristiti kombinaciju mehaničkih i biokemijskih tehnika u vidu različitih filtracija i centrifugiranja da bi se dobili uzorci različitih staničnih struktura i organela. [28]

#### *1.5.5.4. Gel elektroforeza*

Proteini sadržani unutar uzorka razdvajaju se korištenjem gel elektroforeze. Separacija proteina može se izvesti na osnovu izoelektrične točke (pI), mase molekule, električnog naboja ili kao kombinacija ovih faktora. Priroda separacije ovisi o načinu pripreme uzorka te o prirodi korištenog gela. Gel elektroforeza je veoma koristan način identifikacije proteina.

Najčešće korišteni tip gela za elektroforezu je poliakrilamidni gel s natrijevim dodecilsulfatom (SDS) kao u gelu uvezanim puferom. SDS-PAGE (SDS poliakrilamidna gel elektroforeza) održava polipeptide u denaturiranom obliku nakon što su bili tretirani reducirajućim agensom koji dovodi do povratka proteina u njegovu primarnu strukturu (uklanjanjem disulfidnih mostova) i tako omogućujući separaciju proteina na temelju mase molekule. Proteini sadržani u uzorku bivaju prekriveni s negativno nabijenim SDS-om i kreću se prema pozitivno nabijenoj elektrodi kroz poliakrilamidni gel koji se sastoji od mreže isprepletenih poliakrilamidnih vlakana. Manji proteini kreću se kroz mrežu brže od većih proteina što dovodi do njihovog razdvajanja po veličini (obično mjerenoj u kDa). Pripravljena koncentracija akrilamida određuje kakva će biti rezolucija gela. Niže koncentracije akrilamida pogoduju boljoj rezoluciji proteina više molekulske mase dok više koncentracije akrilamida u gelu pogoduju većoj rezoluciji za proteine niže molekulske mase.

Uzorci se stavljaju na gel unošenjem u jažice – male udubine, obično oblika kvadra na vrhu gela. Jedna staza (najkraća udaljenost između jažice i pozitivne elektrode) obično je rezervirana za marker, komercijalno dostupna smjesa proteina definirane molekulske mase, koja je obično obojena da razdvajanjem daje obojene vrpce. Nakon promjene električnog potencijala proteini migriraju kroz gel različitim brzinama u ovisnosti o njihovoj molekulskoj masi. Zbog različitih brzina migracije dolazi do razdvajanja u vrpce unutar svake staze.

Moguće je izvesti dvodimenzionalnu gel elektroforezu kojom se proteini razdvajaju u dvije dimenzije na temelju dva različita parametra razdvajanja poput razdjeljivanja prema izoelektričnoj točki u jednoj dimenziji, a zatim prema molekulskoj masi u drugoj dimenziji što se postiže zakretanjem gela za 90°.[28]

#### *1.5.5.5. Transfer*

Pošto su nakon gel elektroforeze proteini zarobljeni unutar gela, primjena antitijela za dokazivanje određenog proteina bila bi nemoguća. Zato je potrebno obaviti njihovo premještanje iz gela na primjereni medij koji će proteine vezati na svojoj površini čineći ih dostupnim za reakcije s antitijelima. Za tu namjenu koriste se membrane izrađene od nitroceluloze ili polivinilidien disflorida (PVDF). Primarna metoda za transfer proteina je elektrobloting – metoda koja koristi električnu struju za transfer proteina iz gela na membranu pri čemu se zadržava njihov raspored u kojem su se nalazili u gelu. Starija metoda kojom se vršio transfer je metoda transfera kapilarnim silama. Na gel bi se postavila membrana, a na membranu veća količina filtar-papira te bi se sve to uronilo u pufersku otopinu. Filtar-papir zbog kapilarnih sila vuče pufersku otopinu prema gore kroz gel i membranu, povlačeći za sobom same proteine, koji po dolasku na membranu bivaju vezani. Metoda je efikasna, ali zbog dugog vremena provedbe preferira se elektrobloting metoda. Nitrocelulozne i PVDF membrane izabrane su za ovu metodu zbog njihove sposobnosti nespecifičnog vezivanja proteina (vežu sve proteine podjednako). Vezivanje proteina zasniva se na temelju hidrofobnih interakcija te interakcija između naboja na proteinu i membrani. Nitrocelulozne membrane su jeftinije od PVDF membrana, ali imaju manu da su manje izdržljive od PVDF membrana pa ne mogu izdržati veći broj određivanja. [28]

#### *1.5.5.6. Bojanje proteina*

Ovaj korak koristi se za vizualiziranje proteina kao potvrdu da je transfer s gela na membranu bio uspješan. Bojanjem je moguće potvrditi jednolikost proteinskog transfera i provesti normalizaciju traženog proteina sa stvarnom količinom proteina u stazi. Normalizacija korištenjem takozvane „kontrole unosa“ bazirana je na imunobojanju „*housekeeping*“ proteina u klasičnom postupku, ali u novijim postupcima ide u smjeru bojanja svih proteina zbog pogodnosti koje taj postupak omogućava. Trenutno se koristi sedam različitih pristupa kod bojanja proteina za normalizaciju, a to su bojanje s *Ponceau S*, tehnike bez nastanka mrlji, *Sypro Ruby*, *Epicocconone*, *Coomassie R-350*, *Amido Black* i *Cy5*. Da bi se izbjegla pojava šuma u signalu, bojanje je potrebno provesti prije nego se izvrši blokiranje membrane, ali bojanje nakon imunobojanja također je moguće provesti. [28]

### *1.5.5.7. Blokiranje*

Da ne bi došlo do nespecifičnog vezanja antitijela na membrane slijedi blokiranje. Blokiranje membrane je postupak popunjavanja praznih vezujućih mjesta na membrani. Korištenjem poznate proteinske vrste, koja sigurno neće reagirati s antitijelom, sprječava se interferencija. Blokiranje membrane je veoma bitno za sam postupak Western blota jer su korištene membrane izabrane zbog svog svojstva nespecifičnog vezivanja proteina, a antitijela su također proteinske građe pa bi se vezala i za traženi protein i za sva prazna mjesta na membrani. To bi dovelo do velike potrošnje samog antitijela te onemogućilo pronalazak određivanog proteina nakon detekcije jer bi pozadina također davala signal. Kao blokirajuće agense koriste se razrijeđene otopine proteina, najčešće 3-5% otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA) ili obrano mlijeko u prahu u otopini pufera (ili tris-puferirane fiziološke otopine ili I-Block-a, s malom koncentracijom (oko 0,1%) detrgenta kao što je Tween 20 ili Triton X-100). Za blokiranje se češće koristi mlijeko zbog njegove dostupnosti, ali proteini mlijeka nisu uvijek kompatibilni s detekcijskim vrpcama. Proteini blokirajućeg agensa vežu se za sva mjesta na koja se nisu vezali proteini nakon transfera tako da dodatkom antitijela jedina mjesta na koja se to antitijelo može vezati jest sami ciljani protein. Tako se smanjuje pozadinski šum, dobivaju čišći rezultati te sprječavaju lažni pozitivni rezultati. [28]

### *1.5.5.8.Imunobojanje*

Za detekciju određivanog proteina membrana se ispituje na traženi protein korištenjem modificiranog antitijela na koje je vezan enzim koji u reakciji sa supstratom stvara kolorimetrijski signal ili obojenje. Obično se ova metoda izvodi u dva koraka iako su razvijene detekcijske metode koje zahtijevaju samo jedan korak za stvaranje signala.

U dvostupanjskom procesu koriste se dva različita antitijela: primarno i sekundarno antitijelo. Primarna antitijela nastaju kada je imunosni sustav vrste iz koje potječe ispitivani uzorak izložen traženom proteinu (ili dijelu tog proteina). U živom organizmu ovo je normalan dio imunosnog sustava, a u ovom postupku se koristi kao veoma osjetljiva i specifična metoda detekcije točno određenog proteina.

Nakon izvršenog blokiranja membrane, membrana se inkubira u razrijeđenoj otopini primarnog antitijela (koncentracije od 0,5 do 5 μL/mL) uz lagano miješanje. Primarno

antitijelo se tada razrjeđuje s PBS-om ili TBST-om koji služi kao pufer za ispiranje. Samo ispiranje je bitno da bi se uklonio višak antitijela koji bi mogao stvoriti pozadinski šum kod detekcije. Obično je otopina sastavljena od puferirane otopine soli s malim udjelom detrgenta ili ponekad s mlijekom u prahu ili BSA. Otopina antitijela i membrana mogu se inkubirati u periodu od 30 minuta do cijelonoćnog namakanja. Također se može inkubacija vršiti na različitim temperaturama, gdje se niže temperature navode kao bolje za vezivanje, bilo specifično za traženi protein, bilo nespecifično za proteine koji stvaraju pozadinski šum.

Nakon namakanja i ispiranja membrane od primarnog antitijela na membranu se djeluje sa sekundarnim antitijelom. Vezivanje sekundarnog antitijela je specifično prema primarnom antitijelu. Antitijela za ovu namjenu su životinjskog porijekla i vezuju se specifično za proteine određene životinjske vrste pa tako sva *anti-mouse* sekundarna antitijela vežu za gotovo sva primarna antitijela izolirana iz miša. Sekundarna antitijela obično dobivaju naziv prema životinjskoj vrsti iz koje su potekli na primjer *anti-mouse*, *anti-goat* itd. Na sekundarno antitijelo obično je vezan biotin ili neki drugi signalni enzim kao što je alkalna fosfataza i hrenova peroksidaza. Ovakvim vezivanjem postiže se jačanje signala ostvarenog samim imunobojanjem.

Najčešće sekundarna antitijela koriste hrenovu peroksidazu koja se koristi za cijepanje kemoluminiscentnih agenata što rezultira stvaranjem luminiscencije koja je proporcionalna količini vezanog sekundarnog antitijela. Da bi se izmjerila luminiscencija koristi se fotografski film postavljen na membranu koji pod izloženosti svjetlom razvija sliku. Jeftinija tehnika koja se koristi za stvaranje slike jest bojanje s 4-kloronaftolom s 1% otopinom vodikova peroksida. Reakcija peroksida i 4-kloronaftola stvara ljubičasto obojenje na membrani koje se može fotografirati običnim fotoaparatom ne zahtijevajući fotografski film.

U ELISPOT (eng. „Enzyme-Linked Immuno Spot assay“) i ELISA (eng. „enzime-linked imunosorbent assay“) metodama, enzimima su dodane molekule koje se pretvaraju enzimskom reakcijom u obojene spojeve koji postaju vidljivi na membrani.

Moguće je korištenje sekundarnog antitijela koje kao signal stvara blisko infracrveno zračenje (NIR) korištenjem antitijela na koje je vezan fluorofor. Zračenje nastaje ekscitacijom fluorescentne boje, koja potom vraćanjem u nepobuđeno stanje, emitira zračenje. Ova metoda daje statičke rezultate čineći je preciznijom i točnijom metodom

za mjerenje razlike u signalu produciranom vezanim antitijelom za protein za razliku od kemoluminiscencije u kojoj se emisija svjetla mjeri dinamički.

Treća alternativa je korištenje radioaktivne oznake umjesto vezivanja enzima na sekundarno antitijelo. Često se za ovakve oznake koristi radioaktivni izotop joda. Pošto su druge metode sigurnije, brže i jeftinije ova se metoda danas veoma rijetko koristi. Prednosti su joj osjetljivost koja se postiže kod snimanja na temelju auto-radiografije koja omogućuje veoma precizno određivanje količine proteina u kombinaciji s optičkim softverom.

Iako zahtijeva više vremena dvostupanjski proces se preferira iz povijesnih razloga zbog relativno lake produkcije primarnih i sekundarnih antitijela koristeći se odvojenim postupcima u njihovoj produkciji. Ovo je omogućilo veću fleksibilnost u radu te dodalo korak kojim se pojačava signal. Razvojem visokopropusne proteinske analize i snižavanjem točke detekcije za proteine dovelo je do ponovnog razvoja jednostupanjskih postupaka određivanja proteina. Jednostupanjski procesi su brži i zahtijevaju manju količinu potrošnih materijala. Kod jednostupanjskog procesa, antitijelo ima zadaću da se specifično veže na protein od interesa, te da nosi na sebi oznaku koju možemo detektirati. Postupak rada u jednostupanjskom procesu veoma je sličan radu s primarnim antitijelom gdje nakon namakanja i ispiranja možemo odmah izvršiti detekciju. [28]

#### *1.5.5.9. Detekcija*

Nakon imunobojanja važno je izvršiti ispiranje nevezanog antitijela nakon čega se pristupa postupku detekcije. Detekcija se vrši korištenjem svojstava koje ima primijenjena oznaka na sekundarnom antitijelu. Moguće je razvijanje boje, emisija elektromagnetskog zračenja te radioaktivnosti. Moguće je dobiti signal na više od jedne proteinske vrpce jer se specifičnost antitijela odnosi na određeni aminokiselinski slijed koji se može nalaziti u više proteina pa se za identifikaciju traženog proteina koristi njegova molekulska masa iz koje se može prema korištenom markeru pronaći položaj traženog proteina na membrani. Nakon detekcije traženog proteina potrebno je ponoviti postupak rada skidanjem vezanih antitijela te izvršiti imunobojanje nekog proteina, tzv. *houskeeping* proteina,koji služi poput endogene kontrole. Kao endogena kontrola se uzimaju geni čija se ekspresija ne mijenja u uvjetima pri kojima je proveden eksperiment (GAPDH, aktin ili tubulin). Poznavanje količine *housekeeping* proteina

omogućuje nam normalizaciju količine traženog proteina u odnosu na *housekeeping* protein čime se izbjegava greška zbog nanošenja različitih količina proteina u sam gel prilikom elektroforeze. Bolji način normalizacije bilo bi korištenje ukupne količine proteina izdvojene iz staničnog lizata. Određivanje ukupne količine proteina može se izvršiti korištenjem trikloretanola ili epikokonona za njihovo bojanje. Ovako se izbjegava mogućnost pogreške koja bi se javila zbog pogreške u radu ili nepotpunog transfera proteina. [28]

#### *1.5.5.10. Kolorimetrijska detekcija*

Kod kolorimetrijskog određivanja proteina sama metoda ovisi o inkubacijskom periodu Western blota sa supstratom koji reagira s enzimom vezanim za sekundarno antitijelo. Ovom reakcijom se topljiva boja prevodi u netopljivi oblik koji se taloži na membranu pokraj enzima čime nastaje vidljiva vrpca na mjestu gdje se na membrani nalazi traženi protein. Razvijanje rezultata se prekida ispiranjem topljivog oblika boje s membrane, a količina proteina se dobije korištenjem denzitometrije ili spektrofotometrije. [28]

#### *1.5.5.11. Kemoluminiscencijska detekcija*

Kemoluminiscentna detekcijska metoda ovisi o inkubacijskom periodu membrane sa supstratom koji nakon reakcije s enzimom vezanim na sekundarno antitijelo postaje luminiscentan. Emitirano svjetlo tada se detektira korištenjem CCD kamera koje snimaju digitalnu sliku Western blota ili korištenjem fotografskog filma postavljenog na samu membranu. Korištenje filma je sve rjeđe zbog nelinearnog raspršenja emitiranog svjetla čime nastaje manje precizna slika. Slika se analizira denzitometrijski čime se dobije relativna količina proteina iz gustoće nastale mrlje na slici. Noviji softveri omogućuju i daljnju obradu podataka kao što je izračun molekulske mase iz odnosa mrlje prema standardu. [28]

#### *1.5.5.12. Radioaktivna detekcija*

Radioaktivno označavanje sekundarnog antitijela ne zahtijeva da sekundarno antitijelo ima nalijepljeni enzim nego se na membranu postavlja rendgenski film na kojem se razvija slika. Područja filma najbliže samoj radioaktivnoj oznaci na filmu potamne. Važnost ove metode za detekciju sve više opada zbog opasnosti pri radu, visoke cijene te napretka u razvoju kemoluminiscencijskih metoda. [28]

#### *1.5.5.13. Fluorescencijska detekcija*

Ukoliko je sekundarno antitijelo obilježeno fluorescentnom molekulom osvjetljavanje membrane dovesti će do ekscitacije te molekule te pri povratku molekule u osnovno stanje doći će do emisije svjetla koju detektiramo fotosenzorom. Kao fotosenzor može se koristiti CCD kamera s pogodnim emisijskim filtrima čime se dobije digitalna slika iz koje se dalje, softverskom obradom, mogu dobiti različiti podatci poput molekulske mase određivanog proteina te može biti napravljena kvantitativna analiza. Fluorescencijska metoda smatra se jednom od boljih metoda detekcije, ali je manje osjetljiva nego kemoluminiscencija.[28]

#### *1.5.5.14. Mogućnost vršenja više imunobojanja na istoj membrani*

Ukoliko želimo iz istog uzorka određivati više različitih proteina moguće je napraviti skidanje (eng. „stripping“) antitijela i ponovno upotrijebiti istu membranu. Nitrocelulozna membrana daleko je osjetljivija od PVDF membrane pa se na njoj može odraditi maksimalno tri do četiri određivanja nakon čega gubitak proteina i oštećenja na samoj membrani onemogućuje daljnji rad. PVDF membrana je čvršća, lakše dolazi do skidanja antitijela i moguće ju je koristiti veći broj puta prije nego pozadinski šum postane prevelik i dobiveni podaci postanu nepouzdani. Sama PVDF membrana mora se namakati u 95% etanolu, izopropanolu ili metanolu prije upotrebe dok nitrocelulozna membrana nema taj korak.[28]

## 1.6. Stanična komunikacija i putovi transdukcije signala

Staničnom komunikacijom nazivamo svaki prijenos signala koji uvjetuje osnovnu staničnu aktivnost i svaki proces koordinacije staničnih aktivnosti. Sposobnost stanica da spoznaju i pravilno reagiraju na njihovu mikrookolinu je osnova njihova razvoja, cijeljenja ozlijeđenog tkiva te imunosnog odgovora, kao i normalne stanične homeostaze. Greške u komunikaciji dovode do brojnih bolesti poput raka, autoimunih bolesti i dijabetesa. Poznavanjem stanične komunikacije moguće je efikasnije liječiti nastale bolesti. Stanična komunikacija područje je istraživanja sistemske biologije koja proučava putove signalizacije, njihov međuodnos te kako izmjena tih putova utječe na prijenos informacija (transdukciju). Stanična komunikacija sastoji se od kompleksne mreže signalnih putova koji mogu pokazivati novonastala svojstva poput bistabilnosti i ultrasenzitivnosti. Analiza signalne mreže veoma je zahtjevan proces koji uključuje eksperimentalni rad, teoretski pristup analizi te razvoj simulacija i računalnih modela radi lakšeg objašnjavanja dobivenih rezultata.[32]

Prijenos (transdukcija) signala je proces u kojem se kemijski ili mehanički signal prenosi kroz stanicu u seriji molekularnih događaja. Mehaničkim signalom smatra se svaka sila koja može djelovati na stanicu ili biti proizvedena od same stanice, a postoji mogućnost njene detekcije. Biokemijski signali su molekule kao što s proteini, lipidi, ioni i male plinovite molekule.[32] Najčešće se prijenos vrši fosforilacijom proteina, koja je katalizirana protein kinazama, koje čine signalnu kaskadu. Prijenosom signala signalnom kaskadom dovodi do staničnog odgovora na podražaj. Podražaj je detektiran putem specijaliziranih proteina koje nazivamo signalnim receptorima (senzorima). Njihova uloga je da nakon vezivanja signalne molekule (liganda) ili fizičkog podražaja napravi prvu biokemijsku reakciju koja dovodi do nastanka signalne kaskade. Signalna kaskada je serija biokemijskih reakcija koja tvori signalni put. Signalne kaskade mogu međudjelovati s drugim signalnim kaskadama stvarajući signalne mreže koje omogućavaju stanici da koordinira više procesa kao odgovor na određeni vanjski podražaj. Mogući odgovori na podražaj su promjene u načinu transkripcije i translacije, post-translacijske i konformacijske promjene na proteinima te uzrokovanje promjene lokacija proteina u stanici. Svaka komponenta ili čvor u signalnom putu klasificira se prema ulozi koju ima u odnosu na početni podražaj. Ligande nazivamo primarnim glasnicima jer dovode signal do stanice, senzore prijenosnicima signala jer pokreću

signalnu kaskadu prvom reakcijom, prva molekula u kaskadi naziva se primarnim efektorom. Primarni efektor može biti vezan sa sekundarnim glasnikom koji dalje aktivira sekundarni efektor i tako ponavljajući ovu shemu nastane signalna kaskada. Svaki čvor u kaskadi ima različitu efikasnost pa tako neki prenesu signal samo na sljedeću molekulu dok neki prenesu signal na više molekula što dovodi do amplifikacije signala. U nekim signalnim putovima ovaj efekt dovodi do toga da jedan podražaj dovodi do uključivanja milijuna molekula u signalnu kaskadu. Stanična signalizacija karakterizirana je signalnom odgodom, šumom, povratnim signalom, unaprijednim signalom te smetnjama.[33]

Stanične signale kategoriziramo u odnosu na udaljenost stanica koje šalju određeni signal i stanica koje na taj signal reagiraju. Tako staničnu signalizaciju možemo podijeliti na:

- Intrakrine signale koje proizvodi sama stanica koja na njih stvara odgovor, a ne napuštaju samu stanicu
- Autokrine signale koje proizvodi sama stanica koja na njih stvara odgovor, ali prvo bivaju izlučeni u međustanični prostor gdje se vežu na membranski receptor pokrećući signalnu kaskadu. Ovim tipom signalizacije moguća je komunikacija sa susjednim stanicama što je vidljivo iz primjera imunosnih stanica.
- Jukstakrina signalizacija je signalizacija između susjednih stanica. Vrši se membranskim prijenosom putem proteina ili lipida koji su dio same membrane, a mogu djelovati na stanicu izvor signala ili susjednu stanicu.
- Parakrina signalizacija je signalizacija između stanica u blizini stanice izvora signala. Primjer je signalizacija korištenjem neurotransmitera.
- Endokrina signalizacija je signalizacija stanicama koje su udaljene od stanice izvora signala. Najčešće se vrši putem hormona koji se izlučuju u krvotok kojim putuju u udaljene dijelove tijela.

Osim navedenih metoda signalizacije mogući su i specijalni oblici prijenosa signala poput komunikacije povezivanjem citoplazmi susjednih stanica posebnim kanalima koji omogućuju brzi prijenos signala. Ovaj način signalizacije vidljiv je u srčanom mišiću gdje omogućuje propagaciju djelovanja potencijala stvorenog u sinusnom čvoru srca omogućujući koordinirani odgovor na potencijal stvarajući kontrakciju srca. Posebna

skupina signala koja se prenosi do centralnog živčanog sustava naziva se osjetima, a prenosi se putem neurona procesom zvanim sinaptička transmisija. Kemijski ili fizički podražaj naziva se primarnim glasnikom jer nosi informaciju od izvora signala do stanice koja mora provesti određenu radnju. Ukoliko se radi o biokemijskom signalu tada je za prijenos signala potrebna signalna molekula (ligand). U signalne molekule ubrajamo molekule poput faktora rasta, citokina, neurotransmitera i steroidnih hormona. Kemijski su veoma različiti i vežu se za specifične receptore u stanici. Mogu ulaziti u samu stanicu ili se vezati na receptore koji su dio stanične membrane.[32,33] Fizički podražaji se prenose mehaničkom silom. Ovakav način prijenosa signala uočen je kod istraživanja potrebe stanica za adhezivnošću kod višestaničnih organizama gdje je uočeno da stanice osjećaju veznu površinu putem integrinima vezanog aktinskog citoskeleta koji dalje taj mehanički signal pretvara u biokemijski preko YAP1 kaskade. Kao odgovor na fizički signal možemo ubrojiti i mehanosenzacije poput sluha, opipa, propriocepcije i osjeta ravnoteže koji tvore specijalnu podgrupu ovog tipa signalizacije.[34] Osim direktnog dodira stanice mogu osjećati i reagirati na podražaje poput promjena u osmotskom tlaku,temperaturi i svjetlu. Razlika u osmotskom tlaku izvanstaničnog prostora i citosola osnova je stanične homeostaze. Promjene nastale u izvanstaničnom prostoru stanica osjeća putem povećanja gustoće makromolekula, promjenama u ionskoj jakosti te promjenama u svojstvima membrane i citoskeleta. Osjet temperature naziva se termocepcija.[32,33] Najznačajniji toplinski receptori su iz porodice TRP (eng. „*transient receptor potential*“) koji su dio stanične membrane gdje TRP kanali putem promjena u osmotskom tlaku, volumenu, istezanju membrane i vibracijama propuštaju različite količine kalcijevih i magnezijevih iona u stanicu. Nisu selektivni i moguće je na njih utjecati različitim kemijskim spojevima pa tako jedući ljutu i paprenu hranu molekule poput kapsaicina pokreću strukturalne promjene na receptoru povećavajući prijenos iona što izaziva osjet vrućine u ustima.[35] Osim TRP-a stanice nakon naglih promjena temperature proizvode proteine temperaturnog šoka (Hsp) koji vrše popravke štete izazvane toplinom, a njihova prisutnost u stanici pokreće signalne kaskade koje reguliraju ekspresiju gena.[33]

Signalni receptori mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine, a to su intracelularni receptori i ekstracelularni receptori. Ekstracelularni receptori su transmembranski proteini. Protežu se čitavom debljinom stanične membrane. Prijenos signala događa se vezivanjem signala na dio receptora koji se nalazi u izvanstaničnom prostoru (ligand ne

ulazi u stanicu). Vezivanje liganda na receptor dovodi do konformacijskih promjena na unutarstaničnom dijelu receptora, proces koji se naziva aktivacijom receptora. Konformacijske promjene dovode do aktivacije enzimskog dijela receptora ili omogućavaju prilaz drugim enzimima iz citoplazme vezujućem mjestu nekog signalnog proteina čijim oslobađanjem počinje propagacija signala. U ovu skupinu receptora ubrajamo G-protein spregnute receptore, tirozin, serin/treonin i histidin specifične protein kinaze, integrine, TLR (eng: „*toll-like receptores*“) te ionske kanale koji se aktiviraju vezivanjem liganda. Intracelularni receptori su topljivi proteini smješteni u određenim dijelovima stanice. Dijele se na nuklearne receptore i citoplazmatske receptore. Ligandi koji se vežu na intracelularne receptore moraju biti dovoljno nepolarni da mogu proći kroz staničnu membranu pasivnom difuzijom. Nuklearni receptori prilikom vezivanja liganda ulaze u jezgru gdje djeluju na gensku ekspresiju dok citoplazmatski receptori pokreću signalne kaskade slično kao i ekstracelularni receptori.[33]

Nakon vezivanja primarnih glasnika na receptore, brojni receptori koriste sekundarne glasnike za prijenos signala za pokretanje signalne kaskade. Većinom transmembranski receptori koriste ovakav način transdukcije. Sekundarni glasnici nalaze se u citoplazmi gdje nakon oslobađanja s receptora djeluju na druge molekule pokrećući signal. Poznatiji sekundarni glasnici su kalcijevi ioni, lipidni glasnici, dušikov (I)oksid te redoks signalne molekule.[33]

Nakon što signal dođe do prve molekule u signalnoj kaskadi prenosi se biokemijskim reakcijama do proteina koji imaju ulogu u aktivaciji gena i metabolizmu. Aktivacijom gena, stanica izvodi druge radnje koje su kontrolirane tim genetskim zapisom. Najčešće se aktivira gen koji se prevodi u protein koji aktivira veći broj drugih gena tako koordinirajući traženi odgovor na zadani signal. Primjer je apsorpcija glukoze u stanicu[36] gdje vezivanje inzulina na receptor pokreće kaskadu koja izaziva veliki broj koordiniranih procesa u samoj stanici potrebnih za unos glukoze u stanicu te daljnje akcije koje stanica provodi u skladištenju glukoze. Set gena i slijed njihove aktivacije na određeni signal naziva se genetskim programom. Signalizacija je veoma potrebna stanicama pogotovo ako se radi o višestaničnom organizmu jer se brojne zadaće potrebne za preživljavanje stanice oslanjaju na vanjski signal kao prvi korak u izvođenju samih. Nedostatak faktora rasta u međustaničnom prostoru dovodi do smrti stanica kod sisavaca. Postoje tri osnovna tipa signala koja reguliraju stanični rast:

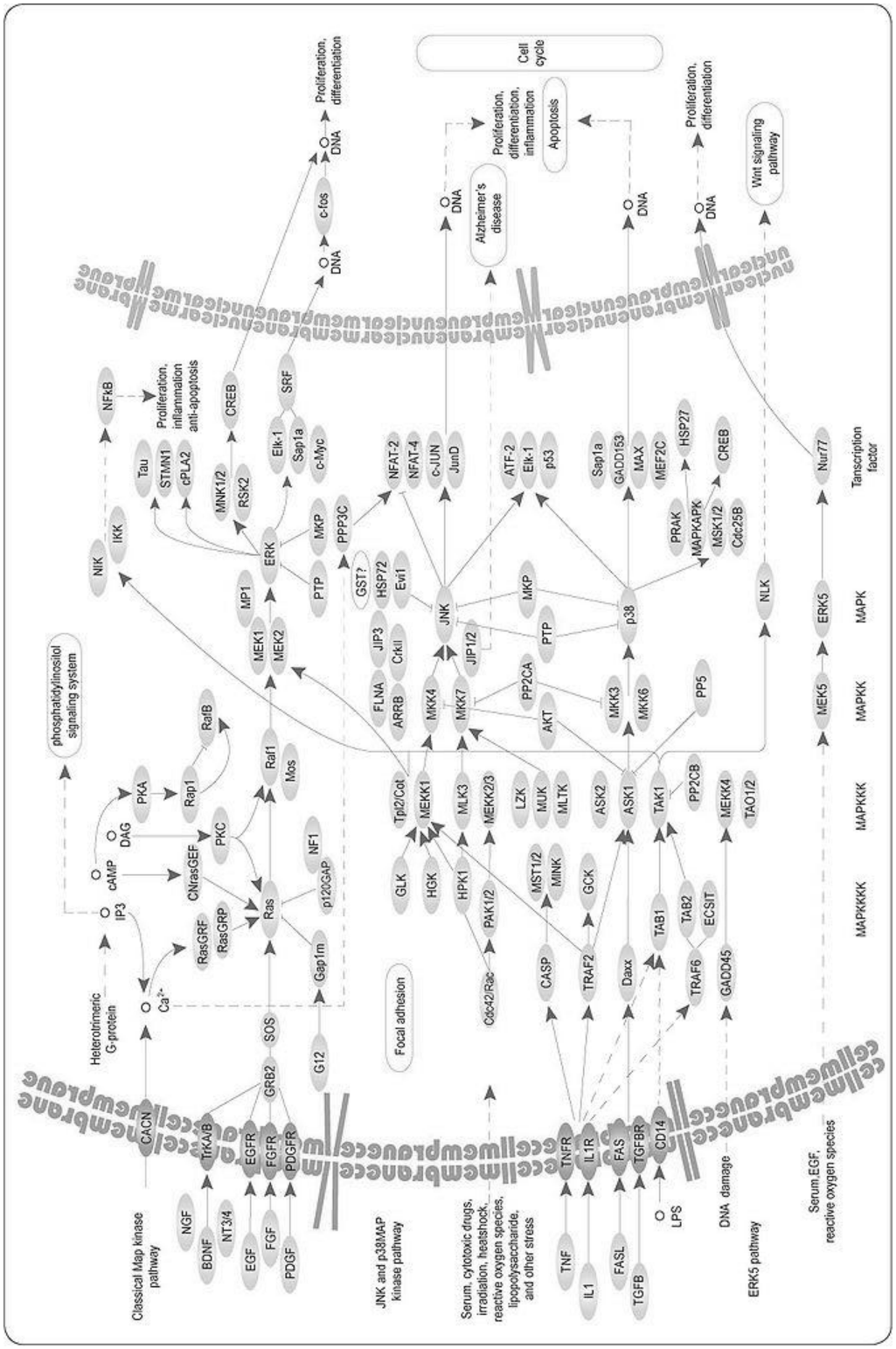
- stimulirajući signal (poput faktora rasta)
- inhibirajući signal (fizički kontakt stanica sprječava daljnji rast)
- dopuštajući signal (interakcija stanice i međustaničnog prostora) .

Reakcijama na ove signale stanica usklađuje svoje ponašanje s okolinom.[33]

### 1.6.1. MAPK signalni put

Protein kinaze su u stanicama sveprisutni enzimi s ulogom prilagođavanja aktivnosti drugih proteina prenoseći im fosfatnu grupu na tirozinsku, serinsku ili treoninsku amino kiselinu u procesu zvanom fosforilacija. MAPK (eng. *„Mitogen-Activated Protein Kinases*“) ili mitogenom aktivirane protein kinaze su velika skupina serin/treonin protein kinaza koja je evolucijski očuvana i nalazi se u brojnim skupinama organizama, od gljivica do sisavaca. MAPK prenose izvanstanične signale od aktiviranih receptora do raznih staničnih tvorevina, najčešće jezgre, gdje upravljaju provedbom naredbi zapisanih u genetskom kodu, uključujući aktivaciju transkripcije, sintezu proteina, procese staničnog ciklusa, apoptozu i diferencijaciju stanice. Jedinstvena sposobnost enzima koji pripadaju MAPK grupi enzima je sposobnost da i sami budu aktivirani fosforilacijom na njihovim tirozin i treonin aminokiselinskim ostatcima (dvostruka fosforilacija) nakon što receptor detektira signal. MAPK putovi kod sisavaca mogu biti aktivirani brojnim i različitim signalima koji se detektiraju većim brojem različitih receptora. U primarne glasnike koji donose signal do stanice i aktiviraju MAPK signalne putove ubrajamo: hormone i faktore rasta koji djeluju kroz receptor tirozin kinazu (npr. inzulin, epidermalni faktor rasta (EGF), PDGF (faktor rasta izveden iz trombocita), FGF (fibroblastni faktor rasta)) i preko citokinskih receptora (npr. hormon rasta) ili preko vazoaktivnih peptida koji djeluju putem G-protein spregnutih receptora, sedam-transmembranskih receptora (npr. ANGII, endotelin), TGF-β-srodnih polipeptida koji djeluju kroz serin/treonin protein kinazni receptor, putem inflamatornih citokina iz obitelji TNF-a (eng. „*Tumor Necrosis Factor*“) te putem okolišnog stresa poput: osmotskog šoka, ionizacijskog zračenja i ishemijske ozljede. MAPK djeluju u modulu sastavljenom od tri protein kinaze koje fosforiliraju i aktiviraju jedna drugu u kaskadi: MAPKKK (MAP kinaza kinaza kinaza) aktivira MAPKK (MAP kinazu kinazu), koja dalje aktivira MAP kinazu. Trenutno je otkriveno 14 različitih MAPKK kinaza, 7 MAPK kinaza i 12 MAP kinaza u stanicama sisavaca. Ovakav kinazni modul ponavlja se uz male varijacije, čineći tako široku mrežu koja

stanici dozvoljava višestruki biološki odgovor. Kod stanica sisavaca pronađene su tri specifične skupine MAP kinaza, a to su klasična MAPK ili ERK (eng: „*Extracellular signal-Regulated Kinase*“), JNK(SAPK) (eng: „*C-jun N-terminal Kinase / Stress-Activated Protain Kinase*“) i p38 kinaze.[3]




Slika 12: MAPK/ERK signalni put s do sada otkrivenim članovima

### 1.6.2. p38 MAPK signalni put

p38 MAPK je stresom aktivirana grupa MAP kinaza. Kod sisavaca, kinaze ove skupine aktivirane su UV zračenjem, toplinskim šokom, velikim osmotskim stresom, lipopolisaharidima, inhibitorima sinteze proteina, proupalnim citokinima (poput IL-1 i TNF-alfa) i određenim mitogenima. Danas su poznate četiri izoforme p38 MAP kinaza, a to su: p38-α, p38-β, p38-γ i p38-δ. Moguće je postojanje dodatnih kinaza u ovoj skupini, ali njihovo postojanje još nije dokazano. Sve navedene izoforme mogu biti aktivirane fosforilacijom od strane MAPK kinaze MKK6. I druge MAPK kinaze mogu fosforilirati neke p38 izoforme. MKK3 može aktivirati izoforme –α, -γ i -δ, MKK4 samo izoformu –α. TAK1 je novootkrivena MAPKK kinaza koja sudjeluje u transdukciji signala s TGF-β na p38 signalni put. -α i -β izoforme p38 odgovorne su za aktivaciju HSP25/27 (eng: „*Heat Shock Proteins*“) i MAPKAPK2 (eng:“*MAPK-Activated Protein Kinase*-2“). -γ i -δ izoforme p38 aktiviraju ATF2 (eng:“*Activating transcription factor* 2“). Ostali transkripcijski faktori na koje izoforme p38 mogu utjecati su STAT1 (eng: „*Signal Transducers and Activators of Transcription*-1“), Max/Myc kompleks, Elk-1 i CREB (eng: „*cAMP Response Element-Binding Protein*“) putem aktivacije MSK1 (eng: „*Mitogen- And Stress- Activated Kinase-1*“). Iz navedenih supstrata p38 vidljivo je da p38 podgrupa zadužena za mobilnost stanice, transkripciju i remodeliranje kromatina. Još neki supstrati na koje p38 djeluju uključuju CHOP (eng: „*C/EBP-Homologus Protein*“) koji je zadužen za regulaciju ekspresije gena, MAPKAPK3, MAPKAPK5 i MNK1 (eng: „*MAPK-Interacting Kinase*-1“). p38 MAPK je odlučujući medijator u NF-κB-ovisnoj genskoj aktivaciji koja je inducirana TNF-om. Sposobnost aktivacije ovog puta događa se neovisno o TRAF2 (eng:“*TNF Receptor-Associated Factor-1)-associated NIK (NF-κB-Inducing Kinase)*“), dodatnog MEKK-e koja je aktivirana putem dvije novootkrivene IK kinaze (I-κB kinaze).[37]

# 2. EKSPERIMENTALNI DIO

## 2.1. Metoda odabira ispitivanih spojeva (test citotoksične aktivnosti)

Ovom eksperimentalnom radu prethodilo je testiranje citotoksične aktivnosti brojnih kemijskih spojeva (većim dijelom seskviterpena dobivenih iz biljnih ekstrakata) korištenjem MTT testa. Iz dobivenih rezultata određene su koncentracije spojeva koje pokazuju citotoksičnu aktivnost za pojedine stanične linije u funkciji vremena (nakon 4, 24,48 i 72 sata). Spojevi koji su pokazali aktivnost pri koncentracijama većim od 90 μg/mL klasificirani su kao necitotoksični, oni s aktivnom koncentracijom od 89-2μg/mL klasificirani su kao umjereno citotoksični spojevi, a spojevi s aktivnom koncentracijom nižom od 2 μg/mL klasificirani su kao citotoksični spojevi.[38]Manji broj spojeva pokazao je zadovoljavajuću citotoksičnu aktivnost (aktivna koncentracija niža od 90 μg/mL) na korištene stanične linije.[39] Za daljnja istraživanja u ovom diplomskom radu odabrani su farnezol i nerolidol.

## 2.2. Nanošenje ispitivanih spojeva i proliferacija staničnih linija

Izračunata je prosječna koncentracija farnezola i nerolidola, dobivena na temelju MTT testa, približno potrebna da se postigne IC50 odnosno koncentracija pri kojoj se postiže 50% preživljavanja ispitivanih tumorskih stanica nakon 48 sati.Za sve korištene stanične linije upotrjebljena je ista prosječna koncentracija. Ovakav pristup neće omogućiti da se ostvari IC50 za sve stanične linije, ali je omogućena direktna usporedba citotoksičnosti farnezola i nerolidola na ispitivane stanične linije. Korištena koncentracija za farnezol je 0,035 mg/mL, a za nerolidol 0,05 mg/mL. Korištene koncentracije pripravljene su na način da su ispitivane tvari otopljene u hranjivom mediju koji se koristi za rast ispitivanih staničnih linija uz dodatak DMSO (konačna koncentracija DMSO mora biti manja od 1% jer je DMSO pri većim koncentracijama citotoksičan).[38,40]DMSO je korišten radi poboljšana topljivosti farnezola i nerolidola u vodenom mediju. Na prethodno nacijepljene tumorske stanice nanesena je otopina s ispitivanim kemikalijama. Pločice su stavljene u inkubator koji se koristi za simuliranje uvjeta koji se nalaze u ljudskom tijelu ne bi li se tumorske stanice razvijale u što prirodnijim uvjetima. Inkubator je podešen na temperaturu od 37°C i 5% mješavini zraka i $CO_2$. Stanice su ostavljene 48 sati da rastu.

Slika 13: Mikroskopiranje stanica prije početka rada da bi se utvrdila aktivnost i gustoća nasijanosti

Slika 14: Mikrobiološki digestor

## 2.3. Liziranje stanica

Nakon proliferacije stanica potrebno je izdvojiti proteine iz stanice pa je napravljena liza stanica. Prije izvođenja samog postupka izvršena je priprema radnog mjesta. Termostatirana centrifuga je upaljena i namještena na 4°C te je puštena da postigne potrebnu temperaturu. Led je stavljen u polistirensku kadicu u kojoj će se izvoditi postupak da bi se osigurala potrebna temperatura koja osigurava minimalnu enzimsku aktivnost nakon lize stanica. Pločice za uzgoj stanica stavljene su na led pod blagim kutom te je iz njih odstranjena hranjiva podloga korištenjem sisaljke. Na stanice je nanesen PBS pufer (izotonična vodena otopina natrijevog hidrogen fosfata i natrijevog klorida s dodatcima)[41] kojim se ispiru jažice na pločicama. Nakon temeljitog ispiranja pufer se isisao do suha i u svaku jažicu se dodalo 250 μL pufera za lizu stanica s inhibitorom proteaze.

Tablica 3:Sastav puferske otopine korištene za liziranje stanica

| | |
|---|---|
| **HEPES** | 50 mM |
| **NaCl** | 150 mM |
| **EDTA** | 1 mM |
| **EGTA** | 1 mM |
| **glicerola** | 10% |
| **TRITON X-100** | 1% |
| **NaF** | 25mM |
| **$ZnCl_2$** | 10 μM |
| **pH** | 7 |

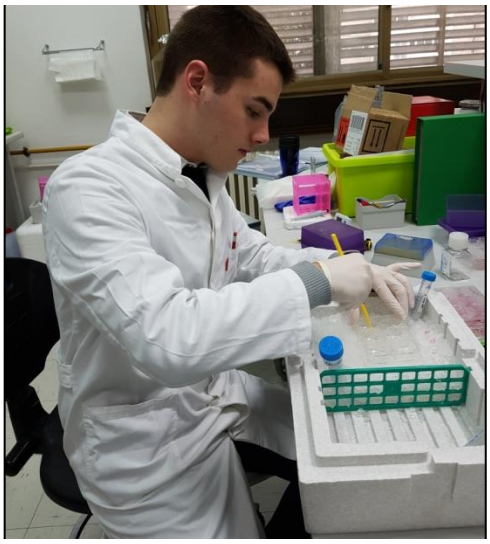
Korištenjem specijalno dizajnirane strugalice skinute su stanice sa stjenke pločice. Nakon 10 minuta od dodatka pufera došlo je do lize stanica. Dobivena otopina prebačena je u prethodno ohlađene mikrocentrifugalne epruvetice s čepom. Dobivene otopine su centrifugirane na 12000 rpm-a 10 minuta pri 4 °C nakon čega je supernatant prebačenu novu prethodno ohlađenu epruveticu. Prebacivanje se vrši oprezno dekantiranjem da bi se izbjeglo unošenje DNA koji je istaložen na dnu epruvetice nakon centrifugiranja.

Uzorci su pripremljeni na način da je uzeto 48 μL lizata i u njega dodano 12μL 5× SDS-*sample* pufera[42]te je smjesa grijana pri 95°C 3-5 minuta. Napravljeno je novo centrifugiranje pri sobnoj temperaturi. Ovako pripremljeni uzorci čuvani su na -20 °C.

Tablica 4: Sastav 5× SDS-sample pufera korištenog u eksperimentu

| | |
|---|---|
| **TRIS-HCl** | 0,125 M |
| **SDS** | 4% |
| **glicerol** | 2% |
| **bromfenol plavo** | 0,004% |
| **β-merkaptoetanol** | 5% |

Slika 16: Priprema opreme i radnog prostora prije početka liziranja stanica



Slika 15: Skidanjestanica s podloge

## 2.4. SDS-elektroforeza i Western bloting

Za provedbu elektroforeze potrebno je izraditi gel za elektroforezu kroz koji će na osnovu veličine i naboja biti razdvojeni u lizatu prisutni proteini. Gel se sastoji od dva dijela: gela za sabijanje („*stacking gel*“) i gela za razdvajanje („*running gel*“).

Tablica 5:Gel za sabijanje (4%)

| | |
|---|---|
| **Akril amid (40%)** | 1mL |
| **tris-HCl** | 1,875 mL |
| **SDS** | pH 6,8 |
| **Autoklavirana voda** | 6 mL |
| **Amonijev persulfat (20%)** | 37,5 μL |

SDS se koristi kao pufer koji održava željenu pH vrijednost unutar gelova za elektroforezu te kao tvar koja održava konstantan negativni naboj na proteinima omogućavajući razdvajanje na temelju veličine, a ne na temelju naboja.

Tablica 6:Gel za razdvajanje (12%)

| | |
|---|---|
| **Akril amid (40%)** | 3 mL |
| **tris-HCl** | 2,5 mL |
| **SDS** | pH 8,8 |
| **Autoklavirana voda** | 4,5 mL |
| **APS (20%)** | 50 μL |

Kalup za izlijevanje gela za elektroforezu sastavljen je od dva pravokutno izrezana stakla koja se postave na gumenu brtvu i učvrste kopčama tako čineći posudu u koju će se izliti gel. Bitno je da kalup nema pukotina kroz koje gel može isteći pa se prije ulijevanja gela kalup provjeri ulijevanjem destilirane vode. U pripremljenu otopinu gela za razdvajanje doda se 10 μL TEMED-a[43] kao polimerizacijskog agensa te se što brže smjesa prelije u kalup tako da izliveni gel tvori vodoravnu gornju površinu što je veoma bitno za pravilno razdvajanje proteina. Nakon očvršćivanja gela za razdvajanje u smjesu gela za sabijanje doda se TEMED (2,5 μL) koji djeluje kao polimerizacijski agens. Gel

se izlije u kalup te se u njega umetne „češalj“, komad plastike koji zbog specifičnog oblika radi pravilne utore u gelu (jažice) koji nam služe sa nanošenje uzoraka. Nakon očvršćivanja gela, gel se izvadi iz kalupa (ne odvaja se od stakala) i češalj se pažljivo ukloni da ne dođe do oštećenja. Gel se prenese u ćeliju za elektroforezu, učvrsti kopčama te se u ćeliju ulije puferska otopina („*running buffer*“ 1×)[44] tako da prekrije gelove.

Tablica 7:Sastav „running buffer“-a 1×

| | |
|---|---|
| **Glicin** | 28,8 g |
| ***Tris*-HCl** | 6,04 g |
| **SDS** | 2 g |
| **Autoklavirana voda** | 1,8 L |

Uzorci lizata koji su prethodno pripravljeni i smrznuti se zagrijavaju na 95 °C tijekom 5 minuta nakon čega se centrifugiraju da se prisutna DNA slegne na dno mikrocentrifugalne epruvete. Potom se iz svake epruvete prebaci 48 µL lizata u nove mikrocentrifugalne epruvete i u svaku se doda 12 µL LB 5× pufera (plavi). Korištenjem mikropipete s posebnim produljenim nastavkom se uzorci unesu u jažice (15µL) pazeći da se jažice ne oštete u postupku. Važno je u jednu jažicu unijeti 4 µL markera jer njegovim razdvajanjem elektroforezom dobijemo mrlje poznate veličine proteina u kilodaltonima (kDa). Nakon dovršetka unošenja uzoraka u jažice ćelija se sastavi do kraja pazeći da se elektrode spoje pravilno jer promjenom polariteta će se proteini kretati u suprotnom smjeru od željenog. Za početak elektroforeze postavi se napon od 80 V, a nakon sabijanja proteina na vrh gela za razdvajanje (nastaje karakteristična crta) napon se poveća na 100 V. Nakon otprilike jedan sat plava crta koja se kretala po gelu stigla je do dna gela nakon čega se elektroforeza zaustavlja i ćelija se rastavi.

Nakon razdvajanja proteini se prenose na nitroceluloznu membranu. Postupak se sastoji od odvajanja gelova od stakala među kojima su napravljeni te se gel za sabijanje odreže jer ne sadrži proteine. Sastavlja se nosač za prijenos tako da se na perforirani kalup postavi spužvica, na spužvicu filtar-papir, na papir ide gel s razdvojenim proteinima, gel se prekrije nitroceluloznom membranom, na membranu se stavi filtar-papir, na papir ide spužvica i nakon toga se kalup zatvori. Tako sastavljeni nosač se prenese u ćeliju za

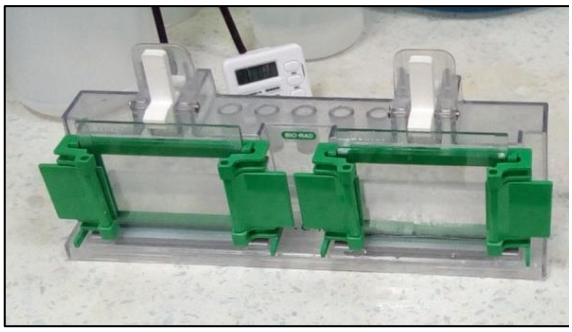
elektroforezu koji ispunimo puferom za prijenos („*transfer buffer*“ 1×)[45] otopljenim u metanolu.

Tablica 8:Sastav „transfer buffer“-a 1×

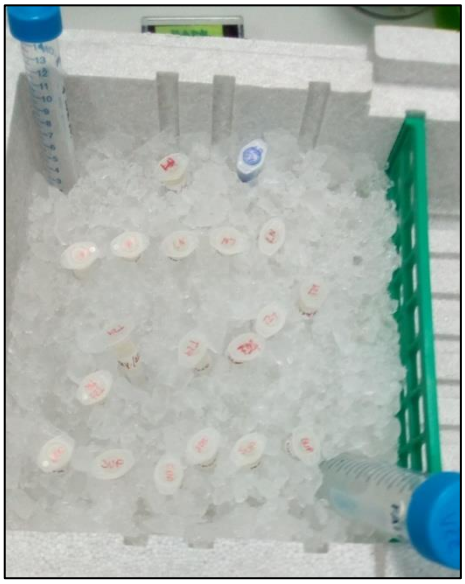
| | |
|---|---|
| **Glicin** | 28,8 g |
| ***Tris*-HCl** | 6,04 g |
| **Metanol** | 200 mL |
| **Autoklavirana voda** | 1,6 L |

U ćeliju se postavi i kadica s ledom jer dolazi do razvijanja topline u postupku. Ćelija se sastavi do kraja pažljivo spajajući polove na elektrodama jer suprotnom strujom proteini neće preći na nitroceluloznu membranu već će se osloboditi u pufer i cijeli postupak elektroforeze mora se ponoviti. Provodi se elektroforeza pri 400 mA tijekom90minutapri čemu se mora paziti da napon u ćeliji ne padne ispod 60 V. Pad napona uzrokovan je propadanjem pufera pod utjecajem napona.

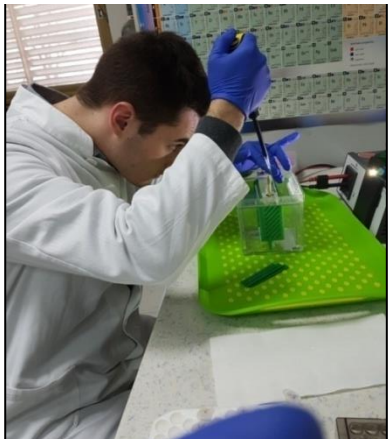
Nakon provedenog transfera ćelija se rastavi i gel se baci, a svi proteini prisutni u gelu su sada na nitroceluloznoj membrani. Njihova prisutnost potvrđena jebojanjem membrane *Ponceau S* bojom za proteine koja ih boji u crveno.



Slika 17: Izrada gelova za elektroforezu



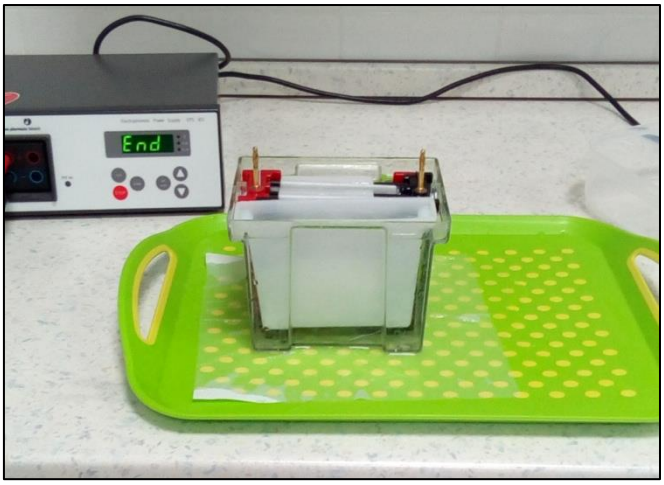
Slika 18: Stanični lizati spremni za gel elektroforezu



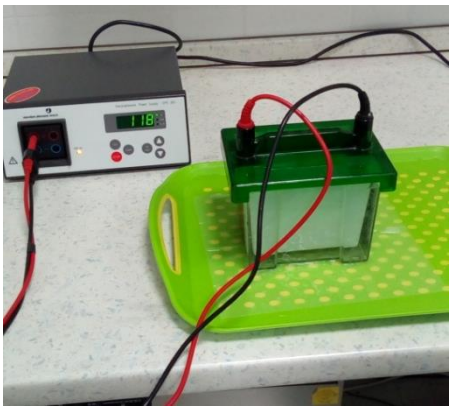
Slika 19: Nanošenje obojenih uzoraka staničnih lizata na gel

Slika 20: Pogled na dva gela s već nanesenim uzorcima prije početka elektroforeze

Slika 21:Pogled na gelove nakon provedene gel elektroforeze



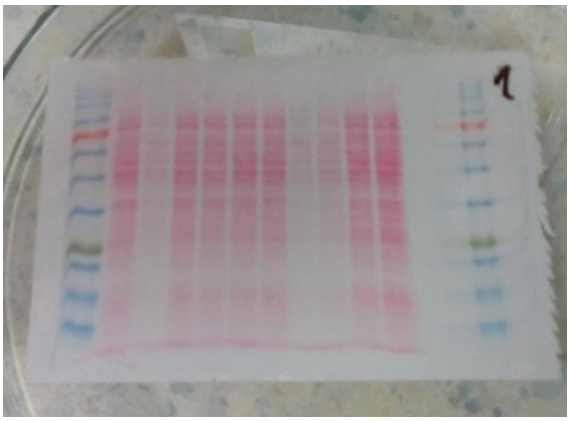

Slika 22: Sastavljena aparatura za provedbu transfera proteina s gela na membranu



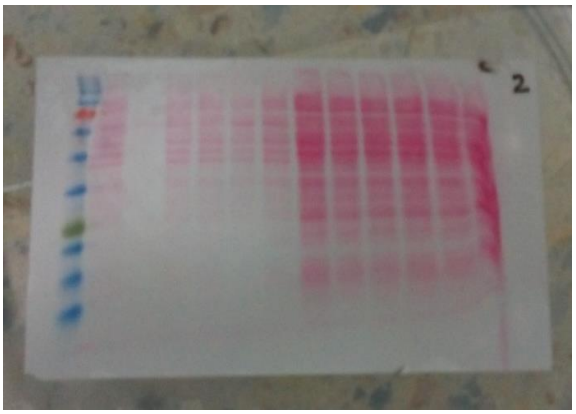
Slika 23: Provedba elektrotransfera proteina

Slika 25: Označavanje membrana

Slika 24: Bojanje membrana s *Ponceou*S bojom




Slika 26:Membrane nakon bojanja




Slika 27:Membrane nakon bojanja

## 2.5. Imunobojanje

Ostatci *Ponceau S* boje se temeljito ispiru s TBS-Tween[46] otopinom do potpunog obezbojenja membrana. Vrši se blokiranje membrane s puferom za blokiranje (TBS + 5% BSA + 0,1% natrijev azid) što nam služi da smanjimo potrošnju antitijela u daljnjem postupku rada tako da se ispune sva slobodna mjesta na nitroceluloznoj membrani na kojima nisu vezani proteini. Nakon jedan sat blokiranja membranu se ispire u puferu za blokiranje i BSA te nakon toga tri puta u TBS-Triton[47] otopini i na kraju samo u TBS-u. Drugi dio postupka sastoji se od natapanja membrane s dva antitijela: prvo s R1:2000 Rb-anti-RNASE7[48] (u puferu za blokiranje i BSA)koji je primarno antitijelo, a nakon toga s R1:3000 anti-Rabbit IgG-HRP[49] (10 mL blokirajućega pufera s mlijekom i 3,33 µL antitijela) koji je sekundarno antitijelo. Nakon dovoljno dugog namakanja membrane se ponovo ispiru da se skine višak antitijela. Vrši se detekcija proteina korištenjem elektrokemoluminiscencije i snimanjem fotografija u ultraljubičastom području kroz duži vremenski period (oko 5 minuta). Nakon detekcije vrši se čišćenje membrane 0,1 M otopinom glicina (pH 2,5) u *stripping* puferu tijekom 1 sata s više obroka otopine. Nakon toga slijedi ispiranje tri puta s TBS-Tween te ponovno blokiranje membrane. Nakon blokiranja primjenjuju se nova antitijela: primarno antitijelo anti-Vinculin[50], te sekundarno antitijelo anti-mouse-HRP[51] (u 10 mL TBS, 0,5g mlijeka i 1,33 µL antitijela = R 1:7500). Nakon vezivanja antitijela membrana se ispire tri puta s TBS-Tween i jednom s otopinom TBS-a te se ponovno vrši detekcija elektrokemoluminiscencijom.

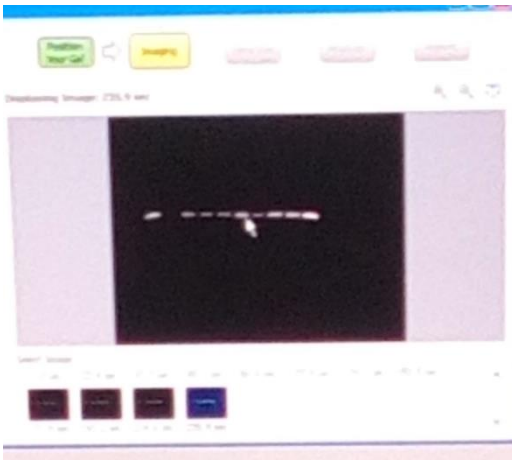
Slika 28: Aparatura i kemikalije za imunobojanje

## 2.6. Detekcija

Proces detekcije vršen je više puta tijekom izvođenja eksperimentalnog rada. Zasnovan je na enzimski kataliziranoj reakciji luminola (5-amino-2,3-dihidroftalazin-1,4-dion) i vodikova peroksida uz hrenovu peroksidazu (*horseradish peroxidase*, HRP) kao katalizator. Da bi ova reakcija pokazala samo traženi protein na nitroceluloznoj membrani na traženi protein vezano je njegovo antitijelo, a na to antitijelo vezano je sekundarno antitijelo specifično za korišteno primarno antitijelo. Na sekundarno antitijelo vezan je HRP čime se osigurava da će do reakcije luminola doći samo na dijelu membrane gdje je vezan istraživani protein. Postupak detekcije proteina ovom metodom vrši se prelijevanjem membrane otopinom luminola i namakanjem 1-2 minute. Potom se višak luminola odstrani i na membranu se nanese vodikov peroksid tako pokrećući enzimsku reakciju. U što kraćem vremenu membrana se ocijedi i položi između dva komada prozirne plastične folije i unese u tamnu komoru uređaja za snimanje (*ChemiDoc$^{TM}$ XRS+ System*). Tamna komora se zatvori i pokrene se program produženog snimanja (ekspozicija 500 sekundi) u ultraljubičastom području. Kao nusprodukt reakcije dolazi do emisije svijetla pri 425 nm koji detektiramo kamerom, a produljena ekspozicija nam omogućava sakupljanje i koncentraciju emitiranih fotona. Rezultat detekcije su kontrastne mrlje vidljive kameri, ali nevidljive golim okom, koje pokazuju područje na kojemu se dogodila katalitička reakcija, odnosno područje na kojemu je prisutan ispitivani protein.

Slika 29: Uređaj za snimanje s tamnom komorom (ChemiDocTM XRS+ System)

Slika 30: Imunobojanje



Slika 31: Pojava vrpci na računalnom ekranu

## 2.7. Obrada rezultata

Dobivene fotografije obrađene su računalnim programom (*ImageJ*) za obradu fotografija kojim je kvantificirana prisutna količina proteina u obliku površine koju ti proteini zauzimaju na samoj membrani. Dobiveni podaci uneseni su u računalni program *Microsoft Office Excel 2007* gdje su računski obrađeni. Prvo je napravljena normalizacija uzoraka tako da je napravljen omjer površina prisutnih proteina i površine kontrolnog uzorka za svaku staničnu liniju čime smo iz daljnjeg rada izuzeli površine, a dobili omjere čime se olakšava daljnji rad. Dobiveni su omjeri količina prisutnog *housekeeping* proteina GAPDH koji je prisutan u svakoj stanici jer izgrađuje citoskelet, te omjer prisutnog MAPK proteina koji sudjeluje u staničnom signalnom putu p38. Usporedbom ta dva omjera dobiven je odnos količine MAPK proteina i housekeeping proteina koji nam govori o utjecaju ispitivanih spojeva na inhibiciju ili aktivaciju p38 signalnog puta.

# 3. REZULTATI I RASPRAVA

## 3.1. Rezultati eksperimentalnog rada

Rezultati odrađenog eksperimentalnog rada obrađeni su računalnim programom (*ImageJ*). Program mjeri gustoću osvijetljene mrlje na potpuno crnoj podlozi, jer je slika snimljena unutar tamne komore, a jedino osvjetljenje stvarala je kemoluminiscencijska reakcija. Količina razvijenog svjetla proporcionalna je količini p38 MAP kinaza i GAPDH koji su određivani na membrani. Usporedbom gustoće svjetla svake mrlje na koju su primijenjeni farnezol i nerolidol s njihovim kontrolnim uzorcima dobiveni su omjeri količine proteina koji su prikazani u tablici 3. Prikazani omjeri mogu se shvatiti na način da kontrolni uzorci imaju gustoću mrlje 1 pa sve gustoće manje od 1 znače da je količina određivanog proteina bila manja od količine proteina u kontrolnom uzorku. Brojevi veći od 1 pokazuju da je ekspresija određenog proteina bila veća od količine proteina pronađena u kontrolnim uzorcima. Razlika te količine do 1 pokazuje nam količinsku razliku u postotcima (razliku uzoraka s primijenjenom testnom tvari i uzoraka na koji nije primijenjena testirana tvar). Da bi odredili jesu li farnezol i nerolidol aktivni prema p38 MAPK staničnom signalnom putu potrebno je napraviti usporedbu količine *housekeeping* proteina GAPDH i količine određivanih proteina p38 MAPK. Iz odnosa ta dva broja moguće je zaključiti da li je neka tvar utjecala na signalni put i na koji način. Ukoliko omjer pokazuje veličine od 0,95 do 1,05 tada možemo zaključiti da određivana tvar nema utjecaja na p38 MAPK stanični signalni put. Ukoliko je broj manji od 0,95 tada možemo zaključiti da se određivana tvar ponašala kao inhibitor signalnog puta, a ukoliko je omjer veći od 1,05 tada se tvar ponaša kao aktivator signalnog puta.

Tablica 9: Rezultati eksperimentalnog dijela rada izraženi u obliku omjera gustoće emitiranog svjetla kemoluminiscencijom za uzorke na koje su primijenjeni farnezol i nerolidol te njihovih kontrola

| | Stanične linije | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **T24** | | | **TCC SUP** | | | **LN-229** | | |
| **Ispitivana tvar** | GAPDH | MAPK | Odnos | GAPDH | MAPK | Odnos | GAPDH | MAPK | Odnos |
| Farnezol | 0,7797 | 0,6911 | 0,8864 | 0,9147 | 0,8706 | 0,9517 | 0,5639 | 0,7496 | 1,3293 |
| Nerolidol | 0,9887 | 0,5853 | 0,5920 | 0,4354 | 0,5451 | 1,2519 | 0,9552 | 0,6232 | 0,6524 |

### 3.2. Utjecaj farnezola na p38 MAPK signalni put

Za uzetu masenu koncentraciju farnezola od 0,035 mg/mL koja je primijenjena na sva tri uzorka vidljivo je da, gledajući količinu *housekeeping* proteina GAPDH, nije došlo do očekivane smrtnosti stanica od 50%, već da su stanične linije T24 i TCC-SUP bile rezistentne prema djelovanju farnezola kao citotoksičnog sredstva. Stanična linija LN-229 pokazala je osjetljivost na farnezol s ~43% manje stanica u uzorcima. Utjecaj na p38 MAPK stanični signalni put pokazuje veoma jasnu sliku dobivenih rezultata smrtnosti stanica gdje je p38 MAPK aktiviran samo u slučaju LN-229 stanične linije dok je u druga dva slučaja, kod T24 i TCC SUP, inhibiran u iznosima od ~11% odnosno~5%. Aktivacija p38 MAPK kod LN-229 stanične linije je veoma izražena s ~33% većom količinom p38 MAP kinaza u stanicama ove stanične linije nego u stanicama iste stanične linije na koje nismo djelovali farnezolom (kontrola). Ovakav rezultat sugerira veoma ciljano djelovanje farnezola na staničnu liniju LN-229 izazivajući smanjenje broja stanica za uzetu količinu farnezola preko p38 MAPK signalnog puta tih stanica.

### 3.3. Utjecaj nerolidola na p38 MAPK signalni put

Za uzetu masenu koncentraciju nerolidola od 0,05 mg/mL koja je primijenjena na sva tri uzorka staničnih linija vidljivo je da, prema količini *housekeeping* proteina GAPDH,nerolidol nije citotoksičan za stanične linije T24 i LN-229 gdje je stanična smrtnost ili inhibicija rasta bila manja od 5% pa se može zaključiti da nerolidol nema citotoksični utjecaj na te stanične linije. S druge strane stanična linija TCC SUP veoma je dobro reagirala na korištenu količinu nerolidola s ~56% manje stanica u uzorku za razliku od kontrolnog uzorka (istih stanica na koji nerolidol nije bio primijenjen). Utjecaj na p38 MAPK stanični signalni put je veoma izražen kod svih ispitivanih uzoraka na nerolidol. Kod staničnih linija T24 i LN-229 ispitivani signalni put snažno je inhibiran u iznosima od ~41% odnosno~35%. Stanična linija TCC SUP koja je pokazala dobar odgovor na nerolidol pokazuje i značajan porast p38 MAP kinaza u uzorcima s porastom od ~25% u odnosu na kontrolne uzorke. Ovakav rezultat sugerira na veoma ciljanu reakciju TCC SUP stanične linije na nerolidol koji antiproliferacijsku aktivnost ostvaruje preko p38 MAPK staničnog signalnog puta.

# 4. ZAKLJUČAK

Rak je genetsko oboljenje i kao takvo veoma se teško liječi. Iako se razvijaju manje invazivne metode, najefikasnije metode koje danas imamo su kirurško odstranjivanje oboljelog dijela tijela, radijacijska terapija i kemoterapija veoma otrovnim tvarima tijekom koje se tijelo natječe sa stanicama raka u preživljavanju. Sve ove metode su jako invazivne i onesposobljavaju oboljelog, čak i u slučaju potpunog izlječenja, da ima normalan život. Pronalazak lijeka koji bi omogućio liječenje neinvazivnom metodom, gdje bi pacijent bio u mogućnosti nastaviti s normalnim životom bez većih nuspojava, uvelike bi povećao standard života oboljelih. Rak danas predstavlja veliki socijalni i ekonomski problem. Prema statistici iz 2015. godine (najnovija službena verzija u trenutku pisanja rada) 208,3 milijuna radnika pogođeno je rakom i postterapijskom invalidnošću.

Rezultati izneseni u ovom diplomskom radu pokazuju da postoji mogućnost selektivnog djelovanja prirodnim organskim spojevima, kao što su korišteni seskviterpeni−farnezol i nerolidol, na određene linije raka. Farnezol i nerolidol su pokazali ciljano i specifično djelovanje na ispitivane stanične linije. Farnezol je pokazao povoljno djelovanje na LN-229 staničnu liniju smanjujući proliferaciju za veoma značajan iznos od ~43% nakon 48 sati primjene, dok je nerolidol pokazao povoljno djelovanje na TCC SUP staničnu liniju smanjujući proliferaciju za ~56% nakon 48 sati. Oba ispitivana spoja su pokazala veoma mali utjecaj na količinu stanica u ostale dvije stanične linije što sugerira specifičnost njihova djelovanja. Pošto su farnezol i nerolidol izomeri, koji se razlikuju samo u položaju dvostruke veze i hidroksilne skupine, može se zaključiti da je njihovo djelovanje na stanične linije LN-229 i TCC SUP specifično za svaku od primijenjenih molekula te da to vezivanje utječe na smrtnost tih stanica. Važan zaključak može se izvesti iz količine p38 MAPK u staničnim linijama. Stanične linije koje su pokazale smrtnost imale su povećanu količinu p38 MAP kinaza u stanicama dok su stanične linije koje nisu pokazale značajnu smrtnost imale manju količinu p38 MAP kinaza u stanicama u usporedbi s kontrolnim uzorcima istih stanica na koje ispitivane tvari nisu primijenjene. Ispitivanja[52] pokazuju da p38 MAPK stanični signalni put ima ulogu u sprječavanju nastanka malignih promjena na zdravim stanicama te da ima utjecaj na poticanje apoptoze maligne stanice. Aktivacija p38 MAPK signalnog puta tada dovodi do smrti stanica što je vidljivo u rezultatu ovoga

rada. Pošto su samo određene stanične linije pokazale da ispitivane tvari na njih djeluju aktivatorski prema p38 MAPK staničnom signalnom putu, dok ostale pokazuju inhibiciju istog pri istoj koncentraciji, možemo zaključiti da se farnezol i nerolidol ponašaju kao aktivatori i inhibitori p38 MAPK staničnog signalnog puta i njihovo djelovanje je uvjetovano primijenjenom količinom na stanične linije. Sve tri ispitivane stanične linije dolaze iz pokrovnih staničnih linija, gdje T24 i TCC SUP dolaze iz raka mokraćnog mjehura, a LN-229 iz glioblastoma. S obzirom na tu činjenicu očekivano je veoma slično djelovanje na sve stanične linije. Međutim, rezultati opovrgavaju ovo očekivanje donoseći još jednu potvrdu o specifičnosti djelovanja farnezola i nerolidola prema stanicama raka. Cilj budućih istraživanja trebao bi biti usmjeren na *in vivo* testiranje farnezola i nerolidola tj. na pokusnim životinjama.

**Literaturni izvori:**


1. URL: https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer (19.5.2018.)
2. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Cancer#Pathophysiology (19.5.2018.)
3. *N. Oršolić*, Temeljne značajke tumora (predavanje 1 i 2), Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
4. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_cancer_types (28.5.2018.)
5. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):524–548. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018.
7. URL: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment (9.6.2018)
8. URL: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types (9.6.2018.)
9. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture (11.6.2018.)
10. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Immortalised_cell_line (11.6.2018.)
11. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Hayflick_limit (15.6.2018.)
12. URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-4.aspx?geo_country=hr#generalinformation (15.6.2018.)
13. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Transitional_cell_carcinoma (15.6.2018.)
14. URL: file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/30-2007.pdf (17.6.2018.)
15. URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-5.aspx?geo_country=hr#culturemethod (17.6.2018.)
16. URL: file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/30-2003.pdf (17.6.2018.)
17. URL: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1738 (17.6.2018.)
18. URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2611.aspx#culturemethod (17.6.2018.)
19. URL: file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/30-2002.pdf (17.6.2018.)
20. URL: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0393 (17.6.2018.)
21. *I. Jerković*, Kemija i tehnologija aromatičnog bilja (skripta), Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet
22. *Maurice D. Awouafack, Pierre Tane, Victor Kuete, Jacobus N. Eloff*, Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa, Medicinal Plant Research in Africa 2 (2013) 33-103, doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00002-3
23. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Farnesol (17.6.2018.)
24. *Anja Ilic* (2013), Biological Activities of Selected Mono- and Sesquiterpenes: Possible Uses in Medicine, diplomski rad, Beč, Sveučilište u Beču
25. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Nerolidol (17.6.2018.)

26. W.K. Chan, Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faced Pharmacological and Biological Activities, Molecules 2016, 21, 529; doi: 10.3390/molecules21050529
27. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay (19.6.2018.)
28. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot (20.6.2018.)
29. URL: https://people.umass.edu/~mcclemen/581Proteins.html (27.6.2018.)
30. URL: https://www.mcgill.ca/biochemistry/files/biochemistry/458_silvius_17.pdf (27.6.2018.)
31. URL: https://www.atascientific.com.au/3-protein-analysis-techniques/ (27.6.2018.)
32. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_signaling (25.7.2018.)
33. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Signal_transduction (4.8.2018.)
34. Kung, Ching (4 August 2005), A possible unifying principle for mechanosensation, *Nature* 436 (7051): 647–654 doi:10.1038/nature03896
35. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Transient_receptor_potential_channel (8.8.2018.)
36. Rosen OM (Sep 1987), After insulin binds, *Science*. 237 (4821): 1452–8. doi:10.1126/science.2442814
37. URL: https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/cell-signaling-pathways/mapk-family-pathway.html (10.8.2018.)
38. URL: http://www.who.int/tdr/grants/workplans/en/cytotoxicity_invitro.pdf (14.9.2018.)
39. *Mila Radan, Vedrana Čikeš Čulić, Franko Burčul*, Antiproliferative of three sesquiterpenes on human bladder cancer cell lines, *6th Edition of International Conference on Pharmacolognosy and Meditinal Plants*, April 16-17, 2018, Amsterdam, Netherlands
40. *Hajighasemi F, Tajik S*, Assessment of Cytotoxicity of Dimethyl Sulfoxide in Human Hematopoietic Tumor Cell Lines, IJBC 2017; 9(2): 48-53.
41. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate-buffered_saline (15.9.2018.)
42. URL: http://www.genecopoeia.com/product/sds-page-sample-loading-buffer-5x/ (17.9.2018.)
43. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Tetramethylethylenediamine (17.9.2018.)
44. URL: https://www.cytographica.com/lab/solutions/towbin.htm (17.9.2018.)
45. URL: https://www.cytographica.com/lab/solutions/transfer.htm (17.9.2018.)
46. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/TBST (17.9.2018)
47. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Triton_X-100 (17.9.2018.)
48. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/hpa005690?lang=en&region=HR (17.9.2018.)
49. URL: https://www.cellsignal.com/products/secondary-antibodies/anti-rabbit-igg-hrp-linked-antibody/7074 (17.9.2018.)
50. URL:https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v9131?lang=en&region=HR&gclid=Cj0KCQjwof3cBRD9ARIsAP8x70P2wikiI7cjcCOPiAE4xms9NUWndVjrD1SzfT82svWQcuzzIXmLiD4aAlbBEALw_wcB (17.9.2018.)

51. URL:https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9044?lang=en&region=HR&gclid=EAIaIQobChMIgb-pqNnB3QIVQqMYCh0KYADsEAAYAiAAEgLCSvD_BwE (17.9.2018.)
52. *T. Zarubin, J. Han*, Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway, *Cell Research* volume15, pages11–18 (2005) DOI: https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290257

**Popis tablica:**

Tablica 1: Sastojci medija i njihova uloga ..... 18
Tablica 2: Najčešće korišteni uvjeti za uzgoj u inkubatoru ..... 18
Tablica 3:Sastav puferske otopine korištene za liziranje stanica ..... 52
Tablica 4: Sastav 5× SDS-sample pufera korištenog u eksperimentu ..... 52
Tablica 5: Gel za sabijanje (4%) ..... 54
Tablica 6: Gel za razdvajanje (12%) ..... 54
Tablica 7: Sastav „running buffer“-a 1× ..... 55
Tablica 8:Sastav „transfer buffer“-a 1× ..... 56
Tablica 9: Rezultati eksperimentalnog dijela rada izraženi u obliku omjera gustoće emitiranog svjetla kemoluminiscencijom za uzorke na koje su primijenjeni farnezol i nerolidol te njihovih kontrola ..... 62

**Popis grafikona:**

Grafikon 1: Najčešći tipovi raka kod muškaraca u Hrvatskoj za 2015. godinu ..... 9
Grafikon 2: Najčešći tipovi raka kod žena u Hrvatskoj za 2015. godinu ..... 10

**Popis slika:**

Slika 1:Proces kancerogeneze ..... 3

Izvor: https://media.springernature.com/original/springer-static/image/prt%3A978-3-642-16483-5%2F16/MediaObjects/978-3-642-16483-5_16_Part_Fig1-4724_HTML.gif

Slika 2: Molekularna osnova raka ..... 4

Slika 3: Karcinogeneza ..... 5

Slika 4: Inkubator za stanične linije ..... 17

Slika 5: Mikroskopska slika stanične linije T24 ..... 19

Izvor:https://www.lgcstandards-atcc.org/~/media/Attachments/9/C/2/6/25933.ashx

Slika 6:Mikroskopska slika stanične linije TCC SUP ..... 20

Izvor: *S.K. Nayak, C. O´Toole, Z. H. Price*, A cell line from an anaplastic transitional cell carcinoma of human urinary bladder, *Br. J. Cancer (1977)* ***35****, 142*, September 1976, Los Angeles, California

Slika 7: Mikroskopska slika stanične linije LN229 ..... 21

Izvor: https://www.reprocell.com/pub/media/wysiwyg/alvetex_pdfs/PR-SC-22_Alvetex_Scaffold_Cell-Specific_LN-229_A4.pdf

Slika 8: Molekula farnezola u ispruženom položaju ..... 23

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Farnesol#/media/File:Farnesol.svg

Slika 9: *cis*-Nerolidol ..... 24

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Nerolidol#/media/File:Nerolidol_-_cis.png

Slika 10: *trans*-Nerolidol ..... 24

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Nerolidol#/media/File:Nerolidol.png

Slika 11: Oksidoredukcijska reakcija MTT (žuto) pri čemu nastaje ljubičasto obojeni formazan ..... 25

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay#/media/File:MTT_reaction.png

Slika 12: MAPK/ERK signalni put s do sada otkrivenim članovima ..... 48

Izvor:https://en.wikipedia.org/wiki/MAPK/ERK_pathway#/media/File:MAPKpathway.jpg

Slika 13: Mikroskopiranje stanica prije početka rada da bi se utvrdila aktivnost i gustoća nasijanosti ..... 51
Slika 14: Mikrobiološki digestor ..... 51
Slika 15: Priprema opreme i radnog prostora prije početka liziranja stanica ..... **Error! Bookmark not defined.**
Slika 16: Skidanje stanica s podloge ..... 53
Slika 17: Izrada gelova za elektroforezu ..... 57
Slika 18: Stanični lizati spremni za gel elektroforezu ..... 57
Slika 19: Nanošenje obojenih uzoraka staničnih lizata na gel ..... 57
Slika 20: Pogled na dva gela s već nanesenim uzorcima prije početka elektroforeze ..... 57
Slika 21:Pogled na gelove nakon provedene gel elektroforeze ..... 57
Slika 22: Sastavljena aparatura za provedbu transfera proteina s gela na membranu ..... 57
Slika 23: Provedba elektrotransfera proteina ..... 58
Slika 24: Bojanje membrana s *Ponceou* S bojom ..... 58
Slika 25: Označavanje membrana ..... 58
Slika 26:Membrane nakon bojanja ..... 58
Slika 27:Membrane nakon bojanja ..... 58
Slika 28: Aparatura i kemikalije za imunobojanje ..... 59
Slika 29: Uređaj za snimanje s tamnom komorom (ChemiDocTM XRS+ System) ..... 60
Slika 30: Imunobojanje ..... 60
Slika 31: Pojava rezultata na računalnom ekranu ..... 61

Slike kojima nije naveden literaturni izvor izrađene za korištenje u ovom radu!

**Popis kratica:**

HIV – eng: „*human immunodeficiency virus*“ (virus humane imunodeficijencije)

CT – eng: „*Computed tomography*“

PET - eng: „*Positron-emission tomography*“

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

NAD(P)H – eng: „nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase“

BSE – eng: „*Bovine spongiform encephalopathy*“ – kravlje ludilo

PVDF - Polivinilidenfluorid

SDS-PAGE – eng: „*sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*“

SDS - eng: „*sodium dodecyl sulfate*“

BSA – eng: „*Bovine serum albumin*“

ELISPOT - eng. „*Enzyme-Linked Immuno Spot assay*“

ELISA - eng. „*enzime-linked imunosorbent assey*“

TRP - eng. „*transient receptor potential*“

Hsp – eng: „*heat shock proteines*“

TLR – eng: „*toll-like receptores*“

MAPK - eng. „*Mitogen-Activated Protein Kinases*“

EGF – eng: „*Epidermal growth factor*“

PDGF – eng: „*Platelet-derived growth factor*“

FGF – eng: „*fibroblast growth factors*“

TNF - eng. „*Tumor Necrosis Factor*“

ERK - eng: „*Extracellular signal-Regulated Kinase*“

JNK(SAPK) - eng: „ *C-jun N-terminal Kinase / Stress-Activated Protain Kinase*“

PBS – eng: „*Phosphate-buffered saline*“

TEMED – eng: „*Tetramethylethylenediamine*“

YAP1 – eng: „*yes-associated protein* 1“

ANGII – eng: „*angiotensin II*“

TGF-β – eng: „*Transforming growth factor beta*“

MKK6 – eng: „*Mitogen-activated protein kinase kinase* 6“

MKK3 – eng: „*mitogen-activated protein kinase kinase 3*“

MKK4 – eng: „*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase* 4“

TAK1 – eng: „*Transforming growth factor β-activated kinase* 1“

MAPKAPK2 – eng: „*MAP kinase-activated protein kinase* 2“

ATF2 – eng: „*Activating transcription factor* 2“

STAT1 – eng: „*Signal Transducers and Activators of Transcription*-1“

Max/Myc – eng: „*MYC associated factor X*“

CREB – eng: „*cAMP response element binding protein*“

MSK1 – eng: „*Mitogen- And Stress- Activated Kinase-1*“

CHOP - eng: „*C/EBP-Homologus Protein*“

MAPKAPK3 – eng: „*MAP kinase-activated protein kinase* 3“

MAPKAPK5 - eng: „*MAP kinase-activated protein kinase* 5“

MNK1 – eng: „*mitogen-activated protein kinase (MAPK)-interacting serine/threonine-protein kinase 1*“

NF-κB – eng: „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“

TRAF2 - eng:“*TNF Receptor-Associated Factor-1)-associated NIK (NF-κB-Inducing Kinase)*“

MEKK – eng: „*MAP kinase kinase kinase*“

I-κB kinaze – eng: „*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*“