

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

CITOTOKSIČNO DJELOVANJE FARNEZOLA I NEROLIDOLA
NA STANIČNU LINIJU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

ZAVRŠNI RAD

LUCIJA GUĆ

Matični broj: 275

Split, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

CITOTOKSIČNO DJELOVANJE FARNEZOLA I NEROLIDOLA
NA STANIČNU LINIJU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

ZAVRŠNI RAD

LUCIJA GUĆ

Matični broj: 275

Split, srpanj 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

**CYTOTOXIC ACTIVITY OF FARNESOL AND NEROLIDOL ON
HUMAN BLADDER CANCER CELL LINE**

BACHELOR THESIS

LUCIJA GUĆ

Parent number: 275

Split, July, 2018

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan

Pomoć pri izradi:

CITOTOKSIČNO DJELOVANJE FARNEZOLA I NEROLIDOLA NA STANIČNU LINIJU RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

Lucija Guć, broj indeksa 275

Sažetak:

Riječ tumor označava skup promijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast. Nastajanje tumora ne događa se odjednom, već je to proces koji se sastoji od genotipskih i fenotipskih promjena. Tumori mogu biti benigni ili maligni. Maligni tumori su agresivniji, metastaziraju šireći se u okolna zdrava tkiva preko krvožilnog sustava, dok benigni tumori ne stvaraju metastaze. Rak ili karcinom predstavlja maligni oblik tumora, on nastaje istodobnim ili sukcesivnim djelovanjem većeg broja uzročnika.

Karcinom mokraćnog mjehura je četvrti najčešći tip tumora koji je 2,7 puta učestaliji kod muškaraca nego kod žena i javlja se između 67. i 70. godine starosti. U 90% slučajeva on potječe iz prijelaznog epitela. Klinička slika je u 90% bolesnika bezbolna hematurija, a dijagnostika se vrši citoskopom u nekim slučajevima i magnetskom rezonancom.

Seskviterpenski alkoholi su sastavljeni od 15 C atoma i široko su rasprostranjeni u eteričnim uljima, ali njihov sadržaj nije toliko dominantan kao u slučaju monoterpenskih alkohola i fenola. Također je poznato da neki seskviterpenski alkoholi djeluju na stanice raka, tj. sprječavaju rast stanica raka i izazivaju apoptozu, te su upravo molekule tih spojeva zaslužne za razvoj antitumorskih lijekova.

Odabrani seskviterpenski alkoholi, farnezol i nerolidol, korišteni su kako bi se ispitalo njihovo citotoksično djelovanje na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura. Citotoksično djelovanje farnezola i nerolidola ispitano je MTT-testom.

Farnezol je, za razliku od nerolidola, pokazao izražajnije inhibicijsko djelovanje na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura. Porastom vremena raslo je i inhibicijsko djelovanje ispitivanih spojeva. Seskviterpenski alkoholi farnezol i nerolidol pokazali su dobro citotoksično djelovanje na ispitivanu staničnu liniju raka.

Ključne riječi: karcinom mokraćnog mjehura, farnezol, nerolidol, citotoksičnost, MTT-test

Rad sadrži: 41 stranica, 10 slika, 19 literalnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Doc. dr. sc. Mila Radan - član-mentor

Datum obrane: 19.07.1018.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BECHELOR THESIS

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

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan

Technical assistance:

*CYTOTOXIC ACTIVITY OF FARNESOL AND NEROLIDOL ON HUMAN BLADDER CANCER
CELL LINE*

Lucija Guć, index number 275

Summary:

The word tumor indicates a set of changed cells that show an irregular and progressive growth. Tumor formation does not happen suddenly, but it is a process that is consisted of genotype and phenotypic changes. Tumors can be benign or malignant. Malignant tumors are more aggressive and they metastasize, spreading into the surrounding healthy tissue through the bloodstream, while benign tumors do not produce metastases. Cancer is a malignant tumor which is caused by simultaneous or successive actions of a large number of agents.

Bladder cancer is the fourth most common type of tumor that is 2.7 times more common in men than in women and occurs between age of 67 and 70. In 90% of cases it comes from a transitional epithelium. Clinical picture is in 90% of patients painless hematuria, and the diagnosis is done by cystoscope, in some cases with magnetic resonance imaging.

Sesquiterpene alcohols are composed of 15 C atoms and are widely distributed in essential oils but their content is not as dominant as monoterpene alcohols and phenols. It is also well known that some sesquiterpene alcohols act on cancer cells, i.e. prevent cancer growth and cause apoptosis, and are precisely the molecules of these compounds that are responsible for the development of antitumor drugs.

Selected sesquiterpene alcohols, farnesol and nerolidol, were used to test their cytotoxic activity on the T24 bladder cancer cell line. The cytotoxic effect of farnesol and nerolidol was tested by the MTT assay.

In contrast to nerolidol, farnesol has shown more conspicuous inhibition of the T24 bladder cancer cell line. By the rise of time the inhibitory effect of the test compounds is also increased. Sesquiterpene alcohols farnesol and nerolidol showed good cytotoxic activity on the tested cellular line of cancer.

Keywords: bladder cancer, farnesol, nerolidol, cytotoxicity, MTT-assay

Thesis contains: 41 pages, 10 figures, 19 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Olivera Politeo –PhD, assistant prof. - chairperson
2. Franko Burčul – PhD, associate prof.- member
3. Mila Radan - PhD- full prof.- supervisor

Defence date: 19.07.2018.

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

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu
pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od travnja do srpnja 2018.
godine.*

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

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj potpori i vjeri u mene tijekom studiranja.

SAŽETAK

Riječ tumor označava skup promijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast. Nastajanje tumora ne događa se odjednom, već je to proces koji se sastoji od genotipskih i fenotipskih promjena. Tumori mogu biti benigni ili maligni. Maligni tumori su agresivniji, metastaziraju šireći se u okolna zdrava tkiva preko krvožilnog sustava, dok benigni tumori ne stvaraju metastaze. Rak ili karcinom predstavlja maligni oblik tumora, on nastaje istodobnim ili sukcesivnim djelovanjem većeg broja uzročnika.

Karcinom mokraćnog mjehura je četvrti najčešći tip tumora koji je 2,7 puta učestaliji kod muškaraca nego kod žena i javlja se između 67. i 70. godine starosti. U 90% slučajeva on potječe iz prijelaznog epitela. Klinička slika je u 90% bolesnika bezbolna hematurija, a dijagnostika se vrši citoskopom u nekim slučajevima i magnetskom rezonancom.

Seskviterpenski alkoholi su sastavljeni od 15 C atoma i široko su rasprostranjeni u eteričnim uljima, ali njihov sadržaj nije toliko dominantan kao u slučaju monoterpenskih alkohola i fenola. Također je poznato da neki seskviterpenski alkoholi djeluju na stanice raka, tj. sprječavaju rast stanica raka i izazivaju apoptozu, te su upravo molekule tih spojeva zaslužne za razvoj antitumorskih lijekova.

Odabrani seskviterpenski alkoholi, farnezol i nerolidol, korišteni su kako bi se ispitalo njihovo citotoksično djelovanje na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura. Citotoksično djelovanje farnezola i nerolidola ispitano je MTT-testom.

Farnezol je, za razliku od nerolidola, pokazao izražajnije inhibicijsko djelovanje na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura. Porastom vremena raslo je i inhibicijsko djelovanje ispitivanih spojeva. Seskviterpenski alkoholi farnezol i nerolidol pokazali su dobro citotoksično djelovanje na ispitivanu staničnu liniju raka.

Ključne riječi: karcinom mokraćnog mjehura, farnezol, nerolidol, citotoksičnost, MTT-test

SUMMARY

The word tumor indicates a set of changed cells that show an irregular and progressive growth. Tumor formation does not happen suddenly, but it is a process that is consisted of genotype and phenotypic changes. Tumors can be benign or malignant. Malignant tumors are more aggressive and they metastasize, spreading into the surrounding healthy tissue through the bloodstream, while benign tumors do not produce metastases. Cancer is a malignant tumor which is caused by simultaneous or successive actions of a large number of agents.

Bladder cancer is the fourth most common type of tumor that is 2.7 times more common in men than in women and occurs between age of 67 and 70. In 90% of cases it comes from a transitional epithelium. Clinical picture is in 90% of patients painless hematuria, and the diagnosis is done by cystoscope, in some cases with magnetic resonance imaging.

Sesquiterpene alcohols are composed of 15 C atoms and are widely distributed in essential oils but their content is not as dominant as monoterpene alcohols and phenols. It is also well known that some sesquiterpene alcohols act on cancer cells, i.e. prevent cancer growth and cause apoptosis, and are precisely the molecules of these compounds that are responsible for the development of antitumor drugs.

Selected sesquiterpene alcohols, farnesol and nerolidol, were used to test their cytotoxic activity on the T24 bladder cancer cell line. The cytotoxic effect of farnesol and nerolidol was tested by the MTT assay.

In contrast to nerolidol, farnesol has shown more conspicuous inhibition of the T24 bladder cancer cell line. By the rise of time the inhibitory effect of the test compounds is also increased. Sesquiterpene alcohols farnesol and nerolidol showed good cytotoxic activity on the tested cellular line of cancer.

Keywords: bladder cancer, farnesol, nerolidol, cytotoxicity, MTT-assay

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1 RAK	3
1.1.1. PODJELA TUMORA	4
1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA	5
1.2.1. ETIOLOGIJA.....	6
1.2.2. KLASIFIKACIJA TUMORA	7
1.2.3. STADIJ BOLESTI.....	8
1.3. ALKOHOLI	9
1.3.1. FARNEZOL.....	10
1.3.2. NEROLIDOL.....	12
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
2.1. STANIČNA LINIJA T24.....	15
2.2. MTT-TEST	17
3. REZULTATI.....	20
4. RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČAK	26
6.LITERATURA.....	28

UVOD

Riječ tumor (lat. *tumor* = otjecanje, otekline) označava skup promijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast. Proces nastanka tumora događa se na molekularnoj razini i obuhvaća oštećenje gena koje nastaje kao posljedica vanjskih kancerogenih faktora ili kao posljedica spontanih mutacija u organizmu. Nastajanje tumora ne događa se odjednom, već je to proces koji se sastoji od genotipskih i fenotipskih promjena. Tumorske stanice razlikuju se od normalnih stanica strukturno i funkcionalno. Tumorska masa stanica potječe od jedne jedine stanice u kojoj su se godinama nagomilavale razne genske mutacije odgovorne za reprodukciju i regulaciju rasta stanica. Tumori mogu biti benigni ili maligni. Razlika između njih je u agresivnosti rasta tj. u tome da maligni tumori metastaziraju šireći se u okolna zdrava tkiva preko krvožilnog sustava, dok benigni tumori ne stvaraju metastaze. Rak (lat. *cancer* = neizlječiva rana) predstavlja zloćudni oblik tumora. On nastaje istodobnim ili sukcesivnim djelovanjem većeg broja uzročnika. Rast i diferencijacija stanica su pod pozitivnom i negativnom kontrolom.

Postoje razni testovi kojima se mjeri proliferacija, vidljivost i citotoksičnost a služe kako bi se ustanovio odgovor i stanje stanica u staničnoj kulturi koje se tretira različitim spojevima. Odgovarajući test se odabire na temelju broja i vrste stanica te ovisi o očekivanom rezultatu. Bez obzira o kojoj vrsti testa se radi, važno je znati koji broj stanica će preživjeti na kraju eksperimenta. Postoje razne vrste testova kojim je moguće utvrditi broj živih eukariotskih stanica. Testovi stanične proliferacije mogu mjeriti broj stanica tokom vremena, broj staničnih podjela, metaboličku aktivnost ili DNA sintezu.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) je prvi test za homogenu održivost stanica razvijen za pločicu sa 96 jažica prikladan za HTS (engl. *high throughput screening*). Test zahtjeva inkubaciju reagensa sa populacijom stanica, kako bi se supstrat obojio i dao nam informaciju o inhibiciji stanica u uzorku.

U ovom radu je ispitano citotoksično djelovanje seskviterpenskih alkohola farnezola i nerolidola na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura. Za ispitivanje je korišten MTT- test i uzorci različitih koncentracija čija je inhibicija ispitana u različitim vremenskim razdobljima.

1. OPĆI DIO

1.1 RAK

Rak se klinički najčešće očituje kao nakupina velikog broja zloćudno preobraženih stanica čiji broj se nekontrolirano povećava diobom. Zloćudne stanice nastaju zbog neadekvatnog odgovora zdrave stanice na razne signalne putove u organizmu. Promjena koja je odgovorna za zloćudnu pretvorbu stanica je genska mutacija, tako da se može reći da je rak u osnovi genska bolest. Mutacije povezane s nastankom raka mogu se naslijediti, ali najčešće nastaju u somatskim stanicama kao posljedica djelovanja raznih mutagena. Biološki se stanica bori protiv mutacija tako da nastoji popraviti mutaciju, a ako je to nemoguće, onda se uključuje programska smrt tj apoptoza. ¹

Osim mutacija, dakle promjena u slijedu baza DNA, pokazalo se da su nastanak i progresija raka povezani i s epigenetskim promjenama, kao što je metilacija DNA. Epigenetske promjene su nasljedne promjene ekspresije gena koje nisu povezane s promjenama u slijedu baza DNA. Ulogu u nastanku i progresiji raka imaju mikro-RNA (miRNA) ne kodirajuće molekule, koje sudjeluju u regulaciji ekspresije gena. Za razvoj raka zaslužni su i mehanizmi povezani sa skraćivanjem kromosoma, telomera. Pokazalo se da je u 85 do 90% svih analiziranih stanica raka, za razliku od većine zdravih stanica, aktivan enzim telomeraza koji omogućuje produljenje telomera, što stanicama raka osigurava neograničen broj dioba.

Postoje i razni dokazi da je rak monoklonskog podrijetla, što bi značilo da nastaje zloćudnom transformacijom samo jedne zdrave stanice. Proces kojim iz zdravog tkiva nastaje rak je složen, dugotrajan i odvija se u više koraka te se naziva tumorska progresija. Za razumijevanje tog procesa važno je otkriće matičnih stanica raka. Smatra se da samo one mogu potaknuti razvoj novog raka kad ih se presadi u novog domaćina. Otkriće matičnih stanica ima važne implikacije za liječenje raka jer se smatra da samo lijek koji uništi sve matične stanice raka može dovesti do izlječenja, čak i ako veliki broj drugih stanica raka preživi. ²

1.1.1. PODJELA TUMORA

Tumori ili nakupine abnormalnih stanica mogu biti benigni ili maligni. Razlika između tih tumora je u agresivnosti rasta i širenju organizmom. Maligni tumori metastaziraju kroz limfni i krvožilni sustav, infiltrirajući se u okolno tkivo, te mogu nalikovati normalnom i zdravom tkivu, barem u početnoj fazi razvoja. Za razliku od benignih tumora, koji ne metastaziraju na druge organe i ne penetriraju u okolno zdravo tkivo, već ga potiskuju odnosno rastu ekspanzivno. Zloćudnost ili malignost nekog tumora odnosi se na svojstvo tog tumora da razara okolno tkivo i da stvara udaljene metastaze u organizmu.

Mogućnost razlikovanja benignih i malignih tumora ključna je u određivanju primjerenog tretmana liječenja. Pravodobnom dijagnozom i dobrim odabirom terapije izlječenje je moguće kod nekih malignih tumora. Maligni tumor, poznatiji kao rak, je često smrtonosan upravo zbog toga što metastazira i širi se na okolno tkivo.³

Razlikujemo dvije vrste malignih tumora:

- Neinvazivni maligni tumor (lat. *carcinoma in situ*) je tumor u kojem stanica ima morfološke i druge osobine malignosti, čiji je međusobni odnos izmijenjen, ali koji ne probija bazalnu membranu. U visokom postotku prerasta u pravu invazivnu neoplazmu, ali je ponekad moguće i njeno spontano povlačenje.
- Invazivni maligni tumor je tumor kod kojeg postoji umnožavanje epitelnih ćelija sa malignim osobinama koje probijaju bazalnu membranu te prodiru u okolno tkivo.³

1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

Karcinom mokraćnog mjehura je čest urološki tumor i gotovo svi nastaju u urotelu, koji se sastoji od 3 do 7 slojeva stanica sluznice na mišićnom mjehuru. Najčešći oblik je rak prijelaznog epitela koji se uglavnom pojavljuje kod muškaraca. Četvrti je najčešći tumor u muškaraca nakon karcinoma prostate, pluća i kolorektalnog karcinoma, te na njega otpada oko 10% svih malignih tumora. Karcinom mokraćnog mjehura najzastupljeniji je između 67. i 70. godine starosti, a može biti prisutan u bilo kojoj životnoj dobi pa čak i u djece. U 90% bolesnika karcinom se očituje bezbolnom hematurijom, također se pojavljuje učestalo mokrenje zbog smanjenog kapaciteta mjehura ili rjeđe, simptomi urinarne infekcije. Dijagnoza se postavlja intravenskom urografijom te citoskopijom. ⁴



Slika 1. Cistoskopski prikaz raka mokraćnog mjehura

1.2.1. ETIOLOGIJA

Dokazani etiološki čimbenici rizika za nastanak raka mokraćnog mjehura su pušenje, izlaganje aromatskim aminima, azo-bojama, lijekovima kao što su ciklofosamid i fenacetin, kamenci, kronična upala te shistosomijaza koja je povezana s rakom pločastih stanica. Mnogo podataka govori da su mnogi tumori mokraćnog mjehura karcinogeno inducirani. Karcinogeni izazivaju oštećenja u genetskom materijalu stanica prijelaznog epitela, započinjući tako proces karcinogeneze. ²

Prevladava mišljenje da su za razvoj karcinoma mokraćnog mjehura odgovorna tri osnovna mehanizma:

- Mehanizam indukcije onkogen. Onkogen je izmijenjen gen koji normalnu stanicu transferira u maligni fenotip.
- Mehanizam inaktivacije supresorskog gena. Supresorski gen je gen koji regulira normalni stanični rast i diferencijaciju stanica, te sprječava nekontroliranu staničnu proliferaciju karakterističnu za tumorske stanice.
- Mehanizam prekomjerne aktivnosti gena koji regulira receptore čimbenika rasta. Prekomjerna aktivnost gena rezultira kroničnom staničnom proliferacijom koja uzrokuje karcinom. ⁵

1.2.2. KLASIFIKACIJA TUMORA

Zbog odgovarajućeg izbora terapije te prognoze bolesnika potrebna je što točnija procjena stupnja proširenja bolesti. Procjenu bolesti najčešće izražavamo TNM-klasifikacijom Američkog združenog komiteta za rak (*American Joint Committee on Cancer; AJCC*). Tablica 1. ⁴

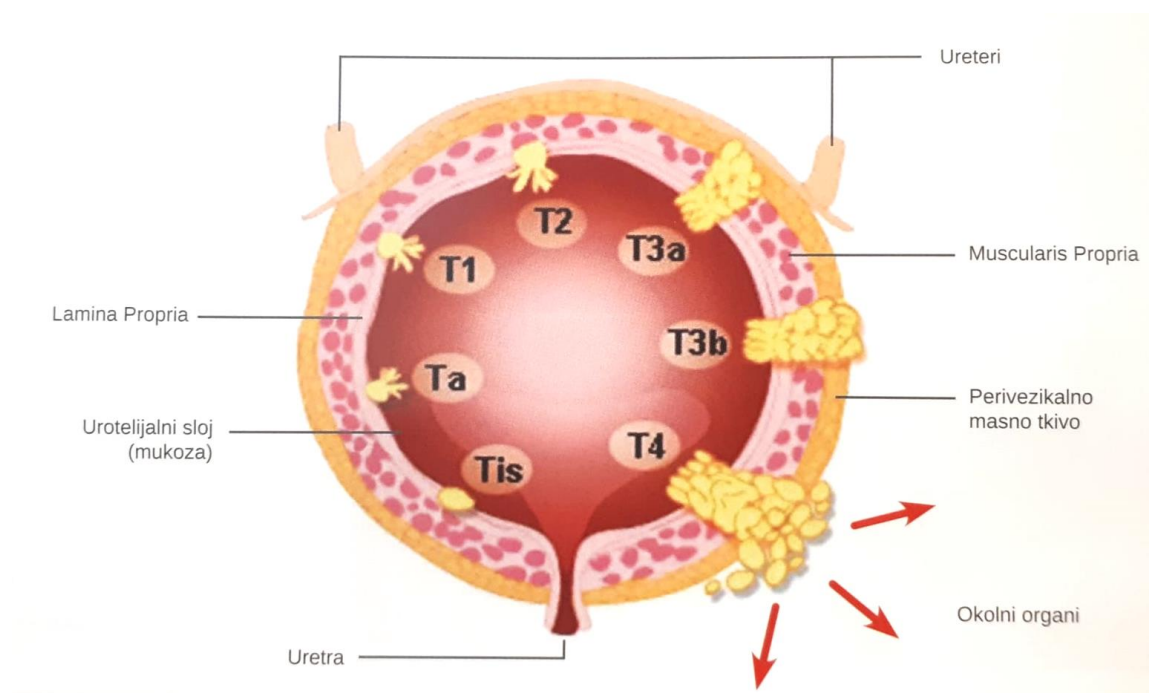
Tablica. 1 TNM- klasifikacija

Primarni tumor (T)	
Tx	primarni se tumor ne može opisati
T0	nema dokaza primarnog tumora
Ta	neinvazivni papilarni karcinom
Tis	karcinom <i>in situ</i>
T1	tumor invadira subepitelno vezivno tkivo
T2	tumor invadira mišićni sloj
T2a	tumor invadira površinski mišićni sloj (unutarnja polovica)
T2b	tumor invadira duboki mišićni sloj (vanjska polovica)
T3	tumor invadira perivezikalno tkivo
T3a	mikroskopska invazija perivezikalnog tkiva
T3b	makroskopska invazija perivezikalnog tkiva
T4	tumor invadira jedno od navedenog: stroma prostate, sjemeni mjehurić, maternica, vagina, zdjelična stijenka, trbušna stijenka
T4a	tumor invadira jedno od navedenog: stroma prostate, sjemeni mjehurić, maternica, vagina
T4b	tumor invadira zdjeličnu stijenk, trbušnu stijenk
Limfni čvorovi (N)	
Tx	limfni čvorovi ne mogu biti određeni
N0	nema zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova
N1	jedan zahvaćeni regionalni limfni čvor
N2	više od jednog zahvaćenog limfnog čvora u zdjelici
N3	metastaze u zajedničkim ilijačnim limfnim čvorovima
Udaljene presadnice (M)	
M0	nema udeljenih presadnica
M1	udaljene presadnice

1.2.3. STADIJ BOLESTI

Prognostička klinička informacija koju dobijemo transuretralnom resekcijom, koja nam služi kao inicijalna dijagnostika, nam prikazuje stadij, odnosno progresiju bolesti. Stadij bolesti se definira anatomskom dubinom invazije i ne uzima u obzir biologiju tumora.

Urotelijalna membrana dijeli tumore na neinvazivne (Tis, Ta) i invazivne (T1). Stadij T2 i viši T vrše invaziju na mišić zida mokraćnog mjehura. Tumor koji probija cijeli zid i ulazi u serozu, klasificira se kao T3, dok se tumor koji probija okolne strukture kao što su prostata, vagina i uterus klasificira kao T4.



Slika 2. Faze rasta karcinoma mokraćnog mjehura (transuretralna resekcija)

1.3. ALKOHOLI

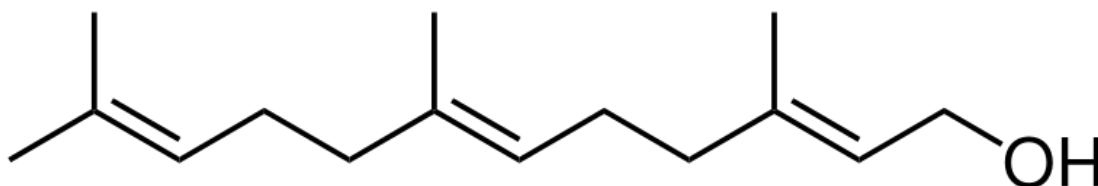
Riječ alkohol jedan je od nastarijih kemijskih termina i izveden je iz staroarapske riječi *al-kuhl*, čije je izvorno značenje „prašak“, a poslije „bît“ zbog toga što se, etil-alkohol, destilirana iz vina smatrao „bîti“ vina. Ubrajaju se među najkorisnije i najzastupljenije spojeve u prirodi, industriji ali i u kućanstvu.

Alkoholi su organski spojevi koji sadržavaju hidroksilnu skupinu (-OH) koja ih čini hidrofilnima te zbog toga imaju veći afinitet prema vodi i ostalim polarnim tvarima. Alkilna skupina u alkoholu je hidrofobna jer prekida vodikove veze i privlačne interakcije dipol-dipol u polarnim otapalima kao što je voda, te ona uzrokuje smanjenje hidrofilnosti alkohola, pa su alkoholi topljivi i u nepolarnim organskim otapalima. Topljivost alkohola se smanjuje kako se alkilna skupina povećava. Mogu se sintetizirati različitim metodama, a hidroksilna skupina može biti pretvorena u većinu funkcijskih skupina i upravo zbog toga su alkoholi i sintetički međuprodukti.⁷

SESKVITERPENSKI ALKOHOLI

Seskviterpenski alkoholi su sastavljeni od 15 C atoma i široko su rasprostranjeni u eteričnim uljima, ali njihov sadržaj nije toliko dominantan kao u slučaju monoterpenskih alkohola i fenola. Primjerice, eterično ulje nerolija gorke naranče sadrži samo 4% seskviterpenskog alkohola farnezola. Unatoč malom sadržaju seskviterpenskih alkohola u eteričnim uljima, imaju učinak na patogene mikroorganizme, ali je to djelovanje malo drugačije od klasičnog djelovanja monoterpenskih alkohola. Najviše istražen je farnezol, jedan od spojeva koje proizvodi naše tijelo. Farnezol smanjuje stvaranje biofilma kojeg bakterije stvaraju u nepovoljnim životnim uvjetima čime se omogućava napad imunološkog sustava i antibiotika na bakterije. Neki seskviterpenski alkoholi imaju i protuupalno djelovanje, najpoznatiji je (-)- α -bisabolol koji je u eteričnom ulju prisutan u visokim koncentracijama. Također je poznato da neki seskviterpenski alkoholi djeluju na tumorske stanice, tj. sprječavaju rast tumorskih stanica i izazivaju apoptozu, te su upravo molekule tih spojeva zaslužne za razvoj antitumorskih lijekova.⁸

1.3.1. FARNEZOL



Slika 3. Farnezol

Farnezol ((2*E*,6*E*)-3,7,11-trimetildodeka-2,6,10,-trien-1-ol) je aciklički seskviterpenski alkohol koji ima cvjetni miris i često se koristi za poboljšanje mirisa parfema s cvjetnom notom te kao antibakterijski spoj u kozmetici. Farnezol utječe na stvaranje biofilma kod bakterija, dokazano je da smanjuje stvaranje biofilma *Staphylococcus epidermis*, koji često uzrokuje infekcije i otporan je na antimikrobne lijekove, te se pokazalo da je farnezol potencijalni terapeutik za kliničku *S. epidermis* infekciju.⁹

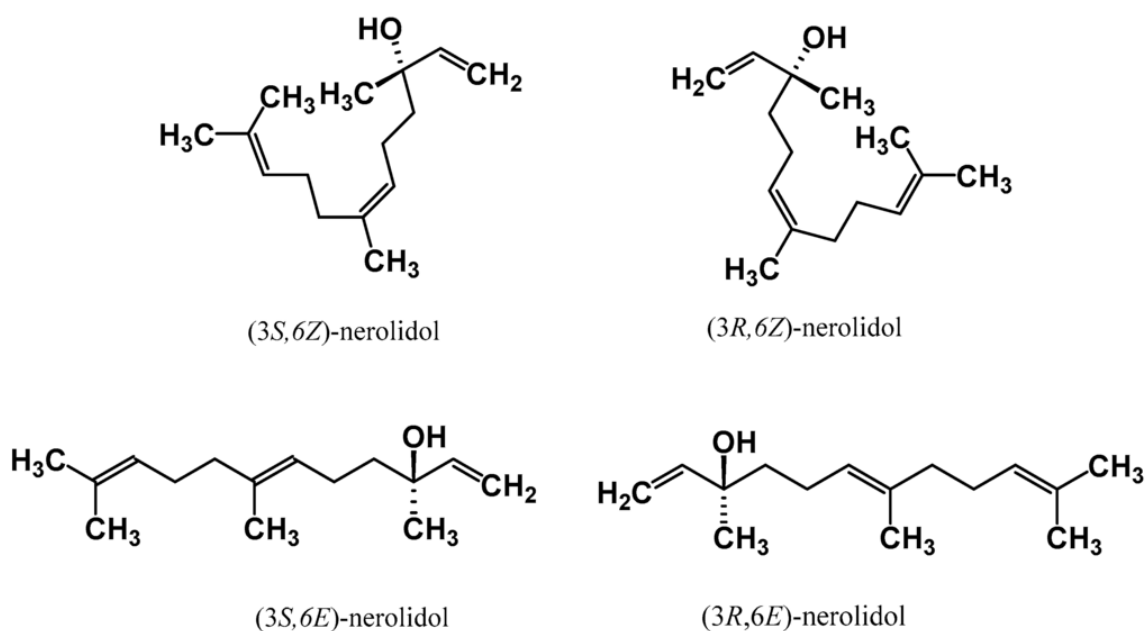
Hyuck Joo i Jetten u svom radu izvještavaju o antikancerogenom i kemoprotektivnom učinku farnezola te su napravili sažetak mehanizma njegovih aktivnosti koji potiču apoptozu. Farnezol je *in vitro* testovima pokazao inhibicijsko djelovanje na proliferaciju stanice i indukciju apoptoze u različitim vrstama malignih stanica. Farnezol je također pokazao anti-tumorske učinke *in vivo*. U jetri tretiranih štakora farnezolom bilo je veće količine enzima koji metaboliziraju lijekove, tako da farnezol može ometati metabolizam, toksičnost ili karcinogenezu lijekova. Činjenica da farnezol ima inhibitorne učinke na Hidroksimetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktazu može biti povezana s njegovim antitumorskim učinkom. Farnezol-inducirani endoplazmatski stres retikuluma je glavni čimbenik koji dovodi do stanične smrti. Autori također navode da farnezol inhibira fosfatidilkolin koji je važan u održavanju strukture membrana i prekursor je nekoliko sekundarnih glasnika koji kontroliraju neke od staničnih putova, uključujući proliferaciju i staničnu smrt. Antitumorski učinci uključuju nekoliko mehanizama, a farnezol djeluje u fazi inicijacije ili progresivnoj fazi razvoja tumora.¹⁰

Farnezol je vrlo zanimljiv spoj zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih i kemoprevencijskih svojstava. Khan i Sultan su u svom istraživanju pokazali kako profilaktičko liječenje farnezolom povećava antioksidacijske enzime superoksid dismutazu, katalazu, glutation-peroksidazu, glutation-reduktazu, glutation-S-reduktazu i kinon reduktazu, te da ublažavanjem oksidativnog oštećenja i upalnih procesa potiskuje početnu fazu kancerogeneze debelog crijeva. ¹¹

Oliviera Júnior i suradnici su istražili antioksidativni učinak farnezola na mozgu odraslih miševa. Dokazali su da farnezol ima antioksidativni učinak i da antioksidativni agens može imati zaštitni učinak protiv neurotoksičnosti odnosno da ne pokazuje značajnu neurotoksičnost. ¹²

Postoji nekoliko studija koji dokazuju da farnezol ima učinak i na metabolizam lipida te da može regulirati koncentraciju lipida u serumu. Farnezol regulira gene za oksidaciju masnih kiselina i sintezu masnih kiselina u stanicama jetre , što za posljedicu ima smanjenje razine mRNA i proteina kao i smanjenje aktivnosti sinteze masnih kiselina. Farnezol je također pokazao da snižava razinu triglicerida u serumu, što bi značilo da je on potencijalni zaštitni faktor za hipertrigliceridemiju odnosno povećanu razinu triglicerida u krvi. ¹³

1.3.2. NEROLIDOL



Slika 4. Nerolidol (izomerni oblici)

Nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodekatrien-3-ol), poznati i kao peruviol, je prirodni alifatski seskviterpenski alkohol prisutan u raznim biljkama s cvjetnim mirisom. Poznat je u četiri različita izomera, koji su prisutni zbog postojanja dvostruke veze na C-6 položaju i asimetričnog centra na C-3 položaju. Nerolidol je glavna komponenta eteričnog ulja ekstrahiranog iz mnogih biljaka, ima drvenu aromu koja podsjeća na svježa stabla. Koristi se u kozmetici, kao miris u parfemima, šamponima ali i kućanskim proizvodima. Poznat je i njegov antibakterijski učinak koji je istražen na *Staphylococcus aureus*, čiji je mehanizam djelovanja oštećenje stanične membrane.¹⁴

Razna istraživanja su potvrdila da je upravo dugi seskviterpenski lanac nerolidola pojačivač za transdermalnu isporuku terapijskih lijekova i za tvari koje općenito opskrbljuju membrane ljudske kože.¹⁵

U svojim istraživanjima, Farrerira i suradnici, govore o učinku nerolidora u mitohondrijima te je svoje rezultate usporedio s njegovim citotoksičnim učinkom na HepG2 stanice jetre. Razna eterična ulja izazivaju promjene u mitohondrijima, vode do enzimske inhibicije ili stanične smrti. Nerolidol, kao hidrofobni spoj, može s lakoćom

proći plazmatsku membranu i biti u interakciji sa staničnim proteinima, te ovisno o koncentraciji, potiče smanjenje mitohondrijskog transmembranskog električnog potencijala. Također je pokazao povećanje aktivnosti respiratornog lanca i smanjenje učinkovitosti fosforilata koji je povezan sa smanjenom koncentracijom ATP-a u stanicama.¹⁶

Pículo i suradnici su istražili genotoksičnost nerolidola *in vivo* te može li pojedinačni tretman s ovim spojem inducirati oštećenje DNA u perifernoj krvi, stanicama jetre miševa i eritrocitima njihovih stanica koštane srži. Istraživanje je dovelo do zaključka da nerolidol ima slabe genotoksične učinke, ali je imao klastogeni učinak na stanice koštane srži miševa povećanjem prosječnog broja mikronukleinskih stanica u testiranim dozama.¹⁷

2. EKSPERIMENTALNI DIO

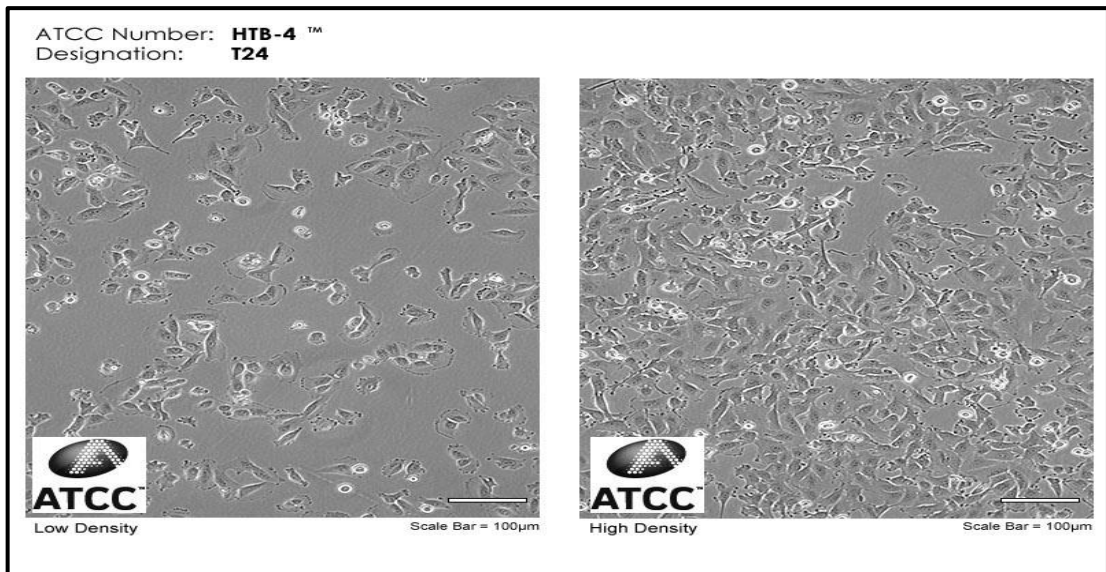
2.1. STANIČNA LINIJA T24

Stanice se čuvaju u inkubatoru na temperaturi od 37 °C sa zasićenjem od 5% s CO₂ kako bi se održala pH vrijednost koja mora biti niža kako bi stanice mogle rasti. Koristi se fenolno crvenilo kao pH indikator. Stanice se uzgajaju u navedenom mediju do približno 80% konfluentnosti nakon čega se tretiraju mikotoksinima kako bi ih presadili. Tijekom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS; pH=7,4) i tretiraju enzimom tripsinom (EDTA) koji kida peptidne veze, broje pod mikroskopom te resuspendiraju u novom mediju.

Tablica 2. Karakteristike T24 stanične linije.

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	mokraćni mjehur
Formula proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznih stanica
Etnitet	Euroljanka
Dob i spol	81., žena

Podaci preuzeti s: www.lgcstandards-atcc.org



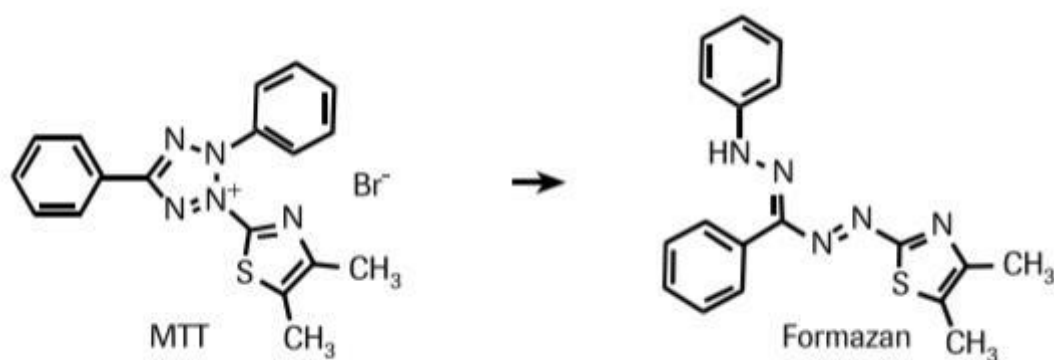
Slika 5. Stanice karcinomske linije T24.
Slika preuzeta s: www.lgcstandards-atcc.org

2.2. MTT-TEST

Testovi koji mjere proliferaciju, vidljivost i citotoksičnost se često koriste da bi se utvrdili odgovori i stanje stanica u kulturi nakon što ih se tretira s različitim tvarima. Odabir odgovarajućeg testa ovisi o broju i vrsti stanica, ali i o očekivanom rezultatu. Testovi stanične proliferacije mogu mjeriti broj stanica tokom vremena, broj staničnih podjela, metaboličku aktivnost ili DNA sintezu. Brojenje stanica korištenjem boja za održivost kao što je tripan blue ili Calcein-AM mogu dati podatke o brzini proliferacije, kao i postotku živih stanica u uzorku. Bez obzira o kojoj vrsti testa se radi, važno je znati koliko živih stanica će ostati na kraju eksperimenta. Postoji mnogo vrsta testova kojima je moguće utvrditi broj živih eukariotskih stanica.¹⁸

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) je prvi test za homogenu održivost stanica razvijen za pločicu sa 96 jažica prikladan za HTS (engl. *high throughput screening*). MTT podloga je pripremljena u uravnoteženoj fiziološkoj otopini, dodana kulturama stanica, najčešće u koncentraciji od 0,2-0,5 mg/ml i inkubirana 1-4 sata. Mjerenja apsorbancije se vrše pri 570 nm, nekada se mjerenja vrše i na 630 nm, ali to ovisi o uvjetima testa.

Žive stanice sa aktivnim metabolizmom pretvaraju MTT u ljubičasto obojeni formazan sa maksimalnom apsorbancijom od 570 nm (Slika 6.). Nakon što dođe do smrti stanica, one gube sposobnost pretvaranja MTT-a u formazan, tako da boja služi kao marker samo za žive stanice. Točan stanični mehanizam redukcije MTT-a u formazan nije do kraja razjašnjen, vjeruje se da uključuje reakciju sa NADH ili sličnim redukcijskim molekulama koje prenose elektrone do MTT-a.



Slika 6. Redukcija MTT-a (žuto) u formazan (ljubičasto)

Formazan koji je produkt MTT tetrazoliuma se nakuplja kao netopivi talog unutar stanice ili se odlaže blizu površine stanice i u staničnom mediju. Formazan mora biti otopljen prije početka mjerenja apsorbancije kako bi se izbjegle neželjene smetnje pri mjerenju. Za otapanje se koriste: zakiseljeni izopropanol, DMSO (dimetil sulfoksid), dimetilformaamidi, natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) i različite kombinacije deterdženata i organskih otapala. Zakiseljavanjem otopine mijenja se boja fenol crvenog pH indikatora u žutu i time se smanjuje moguća interferencija prilikom mjerenja. Također se može prilagoditi i pH otopine kako bi se osigurala maksimalna apsorbancija ako je osjetljivost u pitanju.

Količina signala ovisi o nekoliko parametara uključujući: koncentraciju MTT-a, duljinu inkubacije, količinu živih stanica i njihov metabolizam. Svi parametri se moraju uzeti u obzir kada se optimiziraju uvjeti testa kako bi se rezultati prikazali što vjernije.

Pretvorba MTT-a u formazan je ovisna o vremenu, duže vrijeme inkubacije rezultira nakupljanjem boje i povećanjem osjetljivosti do neke točke, međutim vrijeme inkubacije je ograničeno zbog citotoksične prirode reagensa koji koriste energiju iz stanice kako bi proizveli signal. Količina formazana je proporcionalna broju metabolički aktivnih živih stanica i prikazuje se linearno. Uvjeti koji mijenjaju stanični metabolizam će utjecati na i brzinu redukcije MTT-a u formazan. Na primjer, kada rast adherentnih stanica u kulturi postane inhibiran, metabolizam se može usporiti i redukcija MTT-a po stanici će biti manja, što dovodi do gubitka linearnosti između apsorbancije i broja stanica. Drugi štetni uvjeti kao što je izmijenjen pH ili potrošnja esencijalnih hranjivih tvari kao što je glukoza mogu dovesti do promjena u redukciji MTT-a.

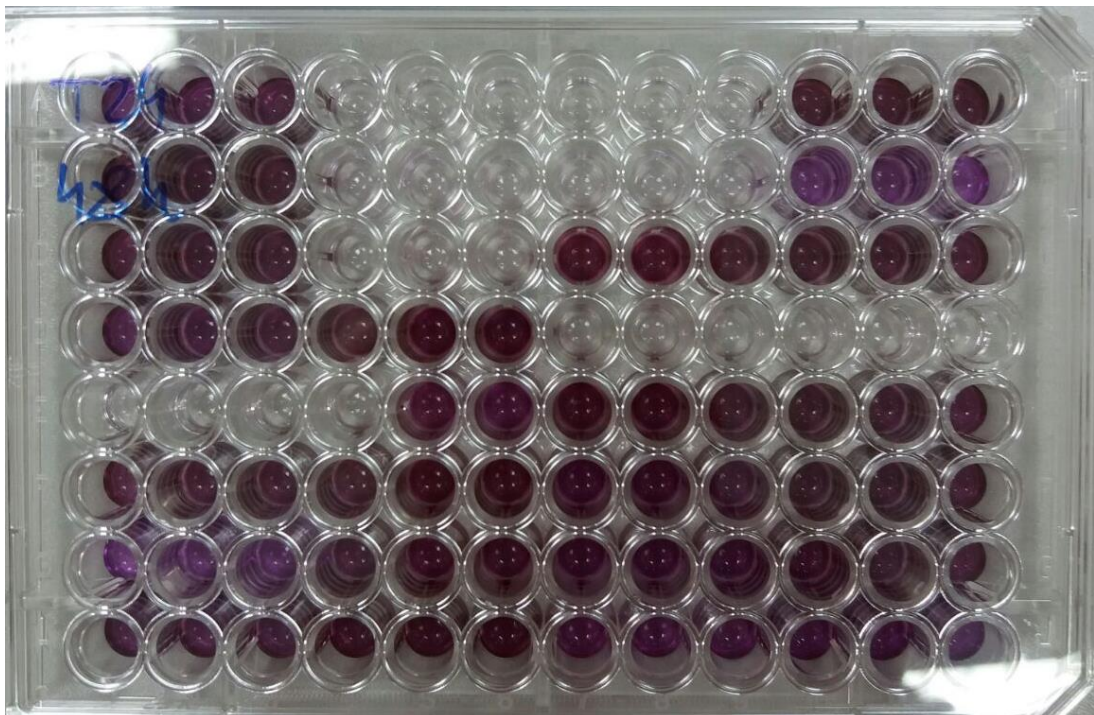
Promjenom fizioloških uvjeta, nedugo nakon dodatka MTT-a, morfologija nekih staničnih linija se može promijeniti drastično. Toksičnost MTT komponente je vjerojatno povezana s koncentracijom dodanom stanicama, može doći do smanjenja toksičnosti u koliko se koncentracija optimizira. Nedavna istraživanja su pokazala da kristali formazana sudjeluju u oštećivanju stanica tako što probiju membranu tijekom egzocitoze.

Tvari kao što su askorbinska kiselina, reducirani glutation, koenzim A mogu reducirati tetrazolijeve soli, bez enzima, povećavajući apsorbancijsku vrijednost u jažicama. Povećana vrijednost pH (kiselo ili bazično) ili izloženost reagensa direktnom svjetlu

može uzrokovati spontanu redukciju tetrazolijeve soli što također rezultira povećanom apsorbancijom. Kemijske interferencije mogu se potvrditi apsorbancijskim vrijednostima kontrolnih jažica. ¹⁹

Protokol:

Prethodno pripremljene stanice isperu se PBS-om (engl. *phosphate-buffered saline*; fosfatni pufer) i namjeste na pH vrijednost 7.4. Zatim se tretiraju enzimom tripsinom koji ih uklanja sa podloge. Prebacuju se na pločicu sa 96 jažica, nadopune se medijem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) do 100 μ l te se ostave u inkubatoru 24h. Sljedećeg dana se medij isisa iz jažica te se dodaju tri ponavljanja uzorka otopljenog u mediju za svaku koncentraciju na pločicu sa 96 jažica, uključujući i kontrole u prve tri jažice koje ne sadrže uzorak. Tretirane stanice se inkubiraju na 4, 24, 48 i 72 h, dodaje se 100 μ l MTT-a te se uzorak ponovno inkubira minimalno sat vremena. Nakon toga MTT se isisa iz jažica, otapa se u 50 μ l DMSO (dimetil sulfoksid, zapaljiva, higroskopna tekućina, višenamjensko otapalo) te se izmjeri apsorbancija na 570 nm. Iz dobivenih rezultata izračunamo polovicu maksimalne inhibitorске koncentracije (IC_{50}) koja označava mjeru jačine tvari u inhibiranju specifične biološke ili biokemijske funkcije.



Slika 7. Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO-a u otopinu MTT-a

3. REZULTATI

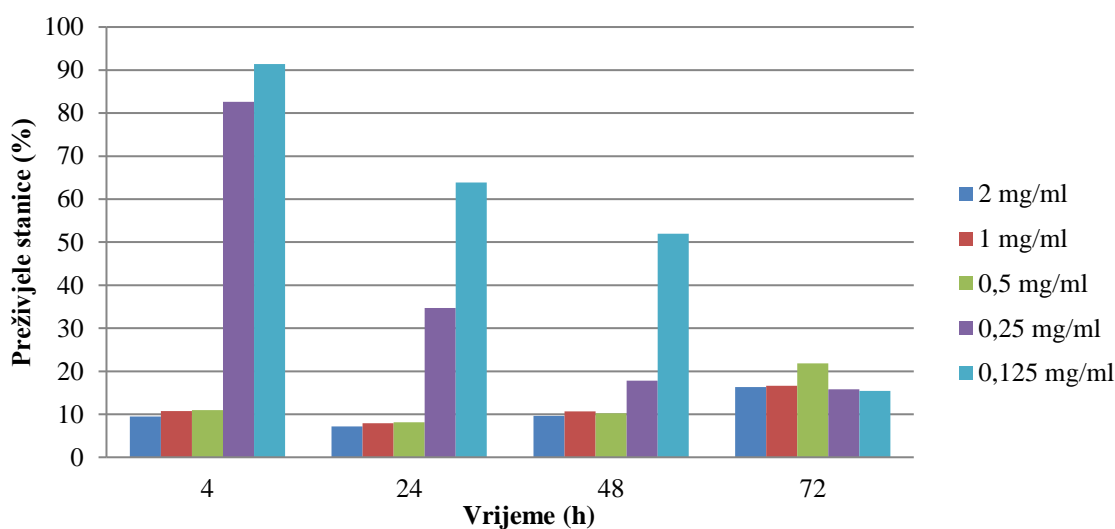
Rezultati ispitivanja citotoksičnog djelovanja seskviterpenskih alkohola farnezola i nerolidola na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura. Za farnezol su korištene koncentracije 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml i 0,125 mg/ml, a za nerolidol su korištene koncentracije 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml i 0,25 mg/ml. Spektrofotometrijskom metodom je izmjerena apsorbancija na 570 nm.

FARNEZOL

Tablica 3. Održivost stanice izražena u postotku za različita vremenska razdoblja

Koncentracija	4 h	24 h	48 h	72 h
2 mg/ml	9,45	7,17	9,66	16,33
1 mg/ml	10,72	7,9	10,65	16,60
0,5 mg/ml	10,99	8,13	10,25	21,86
0,25 mg/ml	82,59	34,73	17,84	15,81
0,125 mg/ml	91,38	63,85	51,97	15,39

T24 FARNESOL



Slika 8. Djelovanje farnezola na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura

IC₅₀ VRIJEDNOST

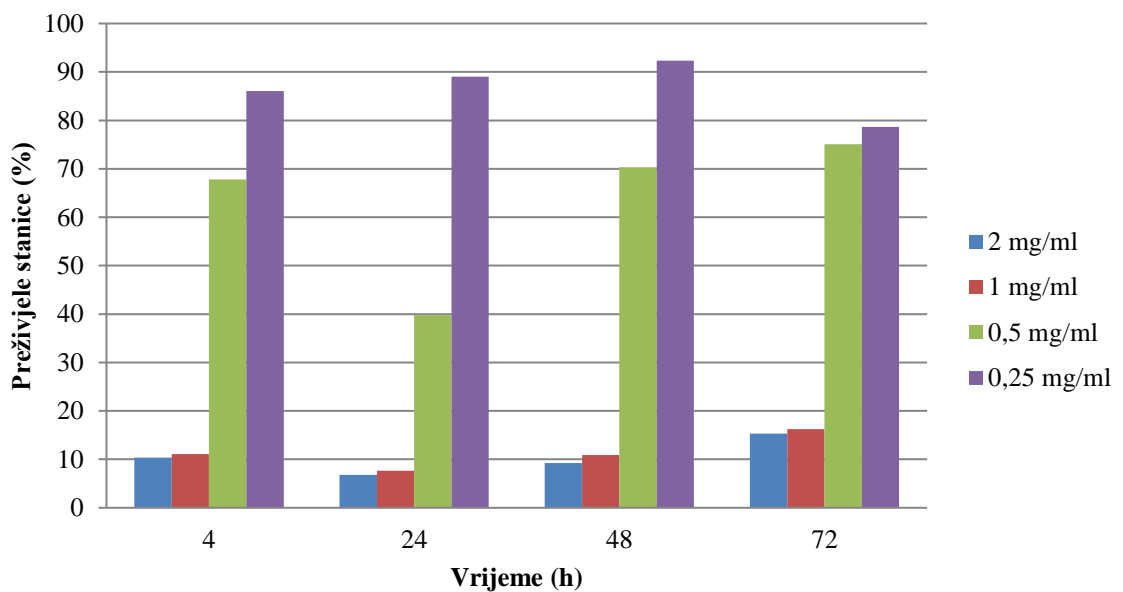
Za koncentracijski raspon nakon 72 sata nije bilo moguće odrediti IC₅₀ vrijednost zbog toga što smo imali jako slične apsorbancije za različite koncentracije.

NEROLIDOL

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

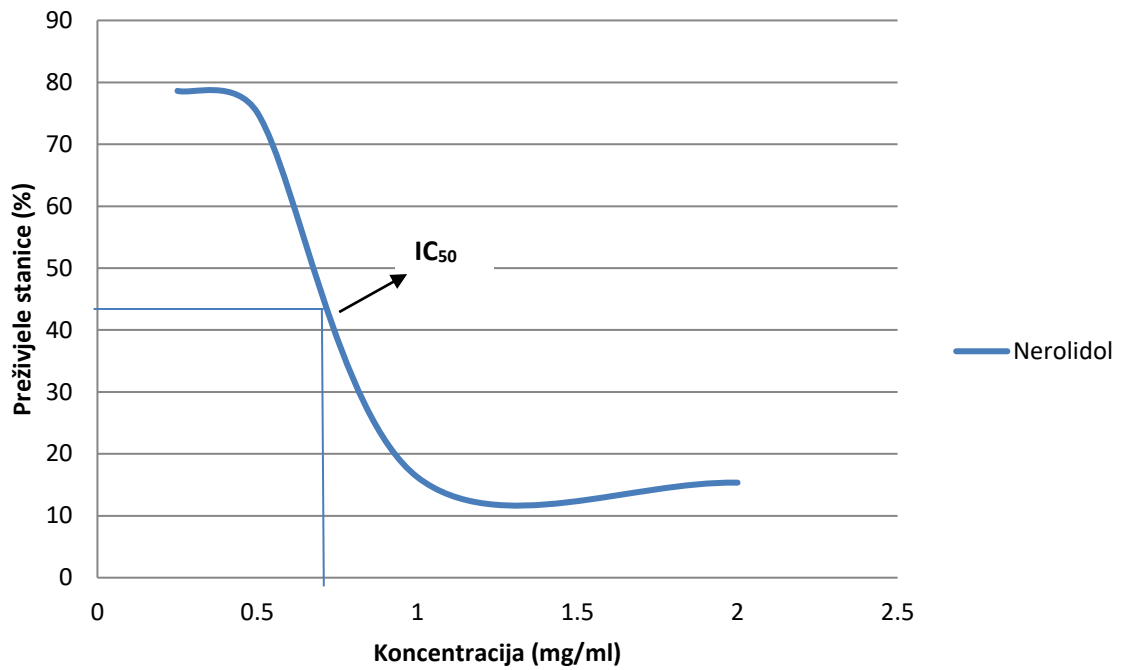
Koncentracija	4 h	24 h	48 h	72 h
2 mg/ml	10,36	6,8	9,26	15,35
1 mg/ml	11,08	7,63	10,92	16,23
0,5 mg/ml	67,8	39,8	70,33	75,07
0,25 mg/ml	86,02	89	92,35	78,63

T24 NEROLIDOL



Slika 9. Djelovanje nerolidola na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura

IC₅₀ VRIJEDNOST



Slika 10. Linearni prikaz ovisnosti koncentracije i preživjelih stanica

Za koncentracijski raspon nakon 72 sata izračunali smo relativni IC₅₀ koji je aritmetička sredina gornje i donje vrijednosti i iznosi 0,72 mg/ml.

4. RASPRAVA

Karcinom mokraćnog mjehura je četvri najčešći tip tumora koji je 2,7 puta učestaliji kod muškaraca nego kod žena i javlja se između 67. i 70. godine starosti. U 90% slučajeva on potječe iz prijelaznog epitela. Etiološki čimbenici nastanka karcinoma su razni, a jedan od njih je i pušenje, što ukazuje na povećan rizik nastanka tumora kod pušača. Klinička slika je u 90% bolesnika bezbolna hematurija, a dijagnostika se vrši citoskopom, a u nekim slučajevima i magnetskom rezonancom. Terapija raka prijelaznog epitela je nefroureterektomija, a kod uznapredovalih slučajeva kemoterapija temeljena na cisplatinu.

Odabrani seskviterpenski alkoholi korišteni su kako bi se ispitalo njihovo citotoksično djelovanje na staničnu linije T24 karcinoma mokraćnog mjehura. Korišteni su farnezol i nerolidol koje nalazimo u eteričnim uljima. Poznato je citotoksično djelovanje mnogih seskviterpenskih. Citotoksično djelovanje farnezola i nerolidola ispitano je MTT-testom.

Mjerenja su provedena u funkciji različitih koncentracija te u funkciji vremena nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Za oba uzorka uočena je linearna ovisnost povećanja inhibicije s povećanjem koncentracije inhibitora te porast postotka inhibicije s porastom vremena inkubacije. Z nerolidol je izračunata IC_{50} vrijednost, tj. koncentracija kod koje je postignuta 50%-tna smrtnost stanica nakon 72 sata inkubacije. Kod većine stanica nastupila je smrt za sve korištene koncentracije farnezola nakon 72 sata inkubacije.

Farnezol je pokazao izražajnije inhibicijsko djelovanje na stanice karcinoma mokraćnog mjehura što nam dokazuju rezultati mjerenja nakon 48 i 24 sata za koncentraciju od 0,5 mg/ml. Smanjenjem koncentracije farnezola imamo nešto slabije inhibicijsko djelovanje. Nerolidol je također pokazao dobro inhibicijsko djelovanje za veće koncentracije (2 mg/ml i 1 mg/ml), dok je za niže koncentracije to djelovanje slabije izraženo što možemo vidjeti na linearnom prikazu ovisnosti koncentracije i preživjelih stanica (Slika 10.). Porastom vremena raslo je i inhibicijsko djelovanje ispitivanih spojeva, najbolje inhibicijsko djelovanje uočeno je nakon 48 sati kod farnezola. Seskviterpenski alkoholi farnezol i nerolidol pokazali su dobro citotoksično djelovanje na ispitivanu staničnu liniju raka.

5. ZAKLJUČAK

- Ispitano je citotoksično djelovanje seskviterpenskih alkohola farnezola i nerolidola na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura MTT- testom.
- Izraženije citotoksično djelovanje na staničnu liniju T24 karcinoma mokraćnog mjehura pokazao je farnezol.
- Nerolidol je također pokazao dobro citotoksično djelovanje na ispitivanu staničnu liniju karcinoma.
- Odabrani seskviterpenski alkoholi su općenito pokazali dobro citotoksično djelovanje u ovisnosti o vremenu i koncentraciji.

6.LITERATURA

1. *Bešlija S., Vrbanec D.*; Karcinogeneza ili nastanak raka, u Medicinska/internistička onkologija; Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, 2014. 7-9
2. *Vrdoljak E., Šamija M., Kusić Z., Petković M., Gugić D., Krajina Z.*; Biologija raka u, Klinička onkologija; Medicinska naklada, Zagreb, 2013. 1-13
3. *Ruddon, R. W.*, Cancer Biology 4th Edition, Oxford University Press, New York, 2007 9-13
4. *Vrdoljak E., Šamija M., Kusić Z., Petković M., Gugić D., Krajina Z.*; Tumori mokraćnog sustava u, Klinička onkologija; Medicinska naklada, Zagreb, 2013. 143-149
5. *Turić M., Kolarić K., Eljuga D.*; Tumori urogenitalnih sustava, u Klinička onkologija; Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1997. 479-496
6. *Bešlija S., Vrbanec D.*; Karcinom mokraćnog mjehura, u Medicinska/internistička onkologija; Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, 2014. 397-402
7. *L.G. Wade, ml.*; Struktura i sinteza alkohola, u Organska kemija; Školska knjiga, Zagreb, 2017. 421-429
8. URL: <http://www.plantagea.hr/aromaterapija/etericna-ulja/kemizam-i-djelovanje-eterienih-ulja-2/seskviterpenski-i-diterpenski-alkoholi-i-fenoli-2/> (11.07.2018.)
9. *Pammi M, Liang R, Hicks JM, Barrish J, Versalovic J*; Farnesol decreases biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and exhibits synergy with nafcillin and vancomycin. (2010.) 578-583
10. *Joo JH, Jetten AM*; Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett* 287 (2010.) 123-135
11. *Khan R, Sultana S*; Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. *Chem Biol Interact* (2011.)
12. *de Oliveira Júnior WM, Benedito RB, Pereira WB, de Arruda Torres P, Ramos CA, Costa JP, da Rocha Tomé A, de Sousa DP, de Freitas RM, de Fatima Formiga Melo Diniz M, de Almeida RN*; Farnesol: antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. *Fundam Clin Pharmacol* (2012.)

13. *Duncan RE, Archer MC*; Farnesol decreases serum triglycerides in rats: identification of mechanisms including up-regulation of PPARalpha and down-regulation of fatty acid synthase in hepatocytes. *Lipids* 43 (2008.)
14. *Weng-Keong Chan, Loh Teng-Hern Tan, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee and Bey-Hing Goh*; Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities; *Molecules* (2016.)
15. *Moser K., Kriwet K., Naik A., N Kalia Y., HGuy R*; Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2001.)
16. *Ferreira FM, Palmeira CM, Oliveira MM, Santos D, Simões AM, Rocha SM, Coimbra MA, Peixoto F*; Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics; *Toxicol In Vitro* 26 (2012.)
17. *Pículo F, Guiraldeli Macedo C, de Andrade SF, Luis Maistro E*; In vivo genotoxicity assessment of nerolidol; *J Appl Toxicol* (2011.)
18. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html> (14.07.2018.)
19. *Riss T.L.; Moravec R.A.; Niles A.L.; Benink H.A.; Worzella T.J.*; Cell Viability Assays: Promega Corporation; (2015.)