Antiproliferativno djelovanje nootkatona na dvije stanične linije raka

Šunjerga, Antonia

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:215698

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE NOOTKATONA NA DVIJE STANIČNE LINIJE RAKA

ZAVRŠNI RAD

ANTONIA ŠUNJERGA

Matični broj: 349

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE NOOTKATONA NA DVIJE STANIČNE LINIJE RAKA

ZAVRŠNI RAD

ANTONIA ŠUNJERGA

Matični broj: 349

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF NOOTKATONE ON TWO CANCER CELL LINES

BACHELOR THESIS

ANTONIA ŠUNJERGA

Parent number: 349

Split, September 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan

ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE NOOTKATONA NA DVIJE STANIČNE LINIJE RAKA

Antonia Šunjerga, broj indeksa: 349

Sažetak:
Rak, neoplazma ili novotvorina općeniti je pojam za mnoge bolesti kod kojih se abnormalne stanice dijele bez kontrole te su u stanju napasti zdravo tkivo. U stanicama raka proliferacija i diferencijacija nisu regulirane. Stanice nekontrolirano rastu i dijele se, šire se naposljetku po čitavom tijelu te ometaju funkciju normalnih tkiva i organa. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu koja može biti dobroćudna (benigna) ili zloćudna (maligna). Benigni tumori se obično mogu ukloniti i ne šire se na druge dijelove tijela. Maligni tumori rastu agresivno i napadaju druga tkiva u tijelu, ulaze u krvotok ili limfni sustav (metastaze), a zatim na drugim mjestima u tijelu stvaraju nove tumore. Pojam rak ili karcinom odnosi se samo na zloćudne tumore koji nastaju djelovanjem različitih uzročnika.

Rak pluća je bolest u kojoj se stanice raka (maligne) nalaze u tkivima pluća. Predstavlja najčešći oblik raka u muškaraca i treći je po učestalosti rak u žena. Gotovo 70% ljudi s dijagnozom raka pluća su stariji od 65 godina, a manje od 3% se javlja u osoba mlađih od 45 godina. Vodeći je uzrok smrti od raka u svijetu.

Rak mokraćnog mjehura najčešća je maligna bolest mokraćnog sustava. Najčešće se javlja u dobi između 65 i 70 godina, trostruko češće kod muškaraca n ego kod žena. Benigni tumor mjehura je rijedak, gotovo 95% svih tumora mokraćnog mjehura su zloćudni tumori, tj. rak mokraćnog mjehura.

Seskviterpeni su klasa terpena koja se sastoji od tri izoprenske jedinice, molekulske formule $C_{15}H_{24}$. Odabrani biciklički seskviterpen nootkaton je kristalna kruta tvar, ali može biti i bezbojna do žuta tekućina. Ima miris i okus poput grejpa. Identificiran je kao bioaktivni spoj sa širokim rasponom korisnih primjena. Njegovo antiproliferativno djelovanje na dvije stanične linije raka ispitano je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)-testom.

Ključne riječi: rak pluća, rak mokraćnog mjehura, nootkaton, antiproliferativno djelovanje, MTT-test

Rad sadrži: 43 stranice, 15 slika, 5 tablica, 44 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 27. rujna 2019.
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study of chemistry, Orientation: chemistry

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

Mentor: Mila Radan, PhD, assistant prof.

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF NOOTKATONE ON TWO CANCER CELL LINES

Antonia Šunjerga, index number: 349

Abstract:
Cancer or neoplasm is a general term for many diseases in which abnormal cells divide without control and they are able to attack a healthy tissue. In cancer cells, proliferation and differentiation are not regulated. The cells uncontrollably grow, divide, eventually spread through the whole body and interfere with the function of normal tissues and organs. Tumor is an expression for any abnormal cell proliferation in the body that can be benign or malignant. Benign tumors can usually be removed and they do not spread to the other parts of the body. Malignant tumors grow aggressively, attack other tissues, enter the bloodstream or lymphatic system (metastases) and then create a new tumors. The term cancer or carcinoma refers only to malignant tumors which arise from various causes.

Lung cancer is a disease in which cancer cells (malignant) are found in lung tissues. It represents the most common type of cancer in men and is the third in women. Over 70% people with diagnose of lung cancer are older than 65 years and less than 3% occurs in persons younger than 45 years. It is the leading cause of cancer death worldwide.

Bladder cancer is the most common malignant disease of the urinary tract. It occurs between age of 65 and 70, three times more often in men than women. Benign bladder tumor is rare, almost 95% of all bladder tumors are malignant.

Sesquiterpenes are a class of terpenes consisting of three isoprene units with molecular formula $C_{15}H_{24}$. Selected bicyclic sesquiterpene nootkatone is a crystalline solid but it can also be a colorless to yellow liquid. It has an odor and taste like grapefruit. Nootkatone is identified as bioactive compound with wide range of useful applications. It's antiproliferative activity on two cancer cell lines is tested by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)-assay.

Keywords: lung cancer, bladder cancer, nootkatone, antiproliferative activity, MTT-assay

Thesis contains: 43 pages, 15 pictures, 5 tables, 44 literary references

Original in: Croatian

Defence Committee:

1. Olivera Politeo, PhD, associate prof.	chairperson
2. Marina Zekić, PhD, assistant prof.	member
3. Mila Radan, Ph, assistant prof.	supervisor

Defence date: September 27th, 2019.
Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Mili Radan na stručnim savjetima pri izradi ovog završnog rada te na pomoći pri obradi eksperimentalnih podataka.

Veliko hvala mojoj majci na uloženom trudu, ljubavi i strpljenju, a posebno na vjeri u mene i moj uspjeh. Bez tebe ovo ne bi bilo moguće.

Od srca se zahvaljujem svojim prijateljima na pruženoj potpori, razumijevanju i neprestanoj podršci tijekom studiranja.

Antonia Šunjerga

CILJ ZAVRŠNOG RADA

- Ispitati antiproliferativno djelovanje nootkatona na dvije stanične linije raka
- Odrediti IC_{50} vrijednosti, tj. koncentracije pri kojima je postignuta 50%-tna smrtnost stanice u funkciji vremena

SAŽETAK

Rak, neoplazma ili novotvorina je općeniti pojam za mnoge bolesti kod kojih se abnormalne stanice dijele bez kontrole te su u stanju napasti zdravo tkivo. U stanicama raka proliferacija i diferencijacija nisu regulirane. Stanice nekontrolirano rastu i dijele se, šire se naposljetku po čitavom tijelu te ometaju funkciju normalnih tkiva i organa. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu koja može biti dobroćudna (benigna) ili zloćudna (maligna). Benigni tumori se obično mogu ukloniti i ne šire se na druge dijelove tijela. Maligni tumori rastu agresivno i napadaju druga tkiva u tijelu, ulaze u krvotok ili limfni sustav (metastaze), a zatim na drugim mjestima u tijelu stvaraju nove tumore. Pojam rak ili karcinom odnosi se samo na zloćudne tumore koji nastaju djelovanjem različitih uzročnika.

Rak pluća je bolest u kojoj se stanice raka (maligne) nalaze u tkivima pluća. Predstavlja najčešći oblik raka u muškaraca i treći je po učestalosti rak u žena. Gotovo 70% ljudi s dijagnozom raka pluća su stariji od 65 godina, a manje od 3% se javlja u osoba mlađih od 45 godina. Vodeći je uzrok smrti od raka u svijetu.

Rak mokraćnog mjehura najčešća je maligna bolest mokraćnog sustava. Najčešće se javlja u dobi između 65 i 70 godina, trostruko češće kod muškaraca nego kod žena. Benigni tumor mjehura je rijedak, gotovo 95% svih tumora mokraćnog mjehura su zloćudni tumori, tj. rak mokraćnog mjehura.

Seskviterpeni su klasa terpena koja se sastoji od tri izoprenske jedinice, molekulske formule $C_{15}H_{24}$. Odabrani biciklički seskviterpen nootkaton je kristalna kruta tvar, ali može biti i bezbojna do žuta tekućina. Ima miris i okus poput grejpa. Identificiran je kao bioaktivni spoj sa širokim rasponom korisnih primjena. Njegovo antiproliferativno djelovanje na dvije stanične linije raka ispitano je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)-testom.

Ključne riječi: rak pluća, rak mokraćnog mjehura, nootkaton, antiproliferativno djelovanje, MTT-test

SUMMARY

Cancer or neoplasm is a general term for many diseases in which abnormal cells divide without control and they are able to attack a healthy tissue. In cancer cells proliferation and differentiation are not regulated. The cells uncontrollably grow, divide, eventually spread through the whole body and interfere with the function of normal tissues and organs. Tumor is an expression for any abnormal cell proliferation in the body that can be benign or malignant. Benign tumors can usually be removed and they do not spread to the other parts of the body. Malignant tumors grow aggressively, attack other tissues, enter the bloodstream or lymphatic system (metastases) and then create a new tumors. The term cancer or carcinoma refers only to malignant tumors which arise from various causes.

Lung cancer is a disease in which cancer cells (malignant) are found in lung tissues. It represents the most common type of cancer in men and is the third in women. Over 70% people with diagnose of lung cancer are older than 65 years and less then 3% occurs in persons younger than 45 years. It is the leading cause of cancer death worldwide.

Bladder cancer is the most common malignant disease of the urinary tract. It occurs between age of 65 and 70, three times more often in men than women. Benign bladder tumor is rare, almost 95% of all bladder tumors are malignant.

Sesquiterpenes are a class of terpenes consisting of three isoprene units with molecular formula $C_{15}H_{24}$. Selected bicyclic sesquiterpene nootkatone is a crystalline solid but it can also be a colorless to yellow liquid. It has an odor and taste like grapefruit. Nootkatone is identified as bioactive compound with wide range of useful applications. It's antiproliferative activity on two carcinoma cell lines is tested by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)-assay.

Keywords: lung cancer, bladder cancer, nootkatone, antiproliferative activity, MTT-assay

SADRŽAJ

UVOD ... 1
1. OPĆI DIO ... 2
1.1. RAK ... 3
1.1.1. Vrste raka ... 5
1.1.2. Nastanak raka (karcinogeneza) ... 6
1.1.3. Uzroci nastanka raka ... 8
1.1.4. Simptomi, dijagnoza i liječenje raka ... 9
1.1.5. Epidemiologija raka ... 11
1.2. RAK PLUĆA ... 13
1.2.1. Etiologija ... 15
1.2.2. Simptomi, dijagnoza i liječenje ... 16
1.2.3. Epidemiologija ... 17
1.3. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA ... 18
1.3.1. Etiologija ... 20
1.3.2. Simptomi, dijagnoza i liječenje ... 21
1.3.3. Epidemiologija ... 22
1.4. KLASIFIKACIJA ZLOĆUDNIH TUMORA ... 23
1.5. TERPENI ... 24
1.5.1. Nootkaton ... 25
2. EKSPERIMENTALNI DIO ... 26
2.1. STANIČNE LINIJE ... 27
2.1.1. Stanične linije A549 i T24 ... 28
2.2. MTT-TEST ... 30
3. REZULTATI ... 32
4. RASPRAVA ... 36
5. ZAKLJUČAK ... 38
6. LITERATURA ... 40

UVOD

Rak, neoplazma ili novotvorina je općeniti pojam za mnoge bolesti kod kojih se abnormalne stanice dijele bez kontrole te su u stanju napasti zdravo tkivo. Rak se još naziva i karcinomom. Kancerogene bolesti imaju jednu zajedničku karakteristiku, a to je nekontrolirani rast tumorskih stanica. Tumor je naziv za abnormalnu nakupinu tkiva. Ona može biti maligna (zloćudna) ili benigna (dobroćudna). Samo maligni tumori napadaju okolna tkiva i metastaziraju. Promjena koja je odgovorna za malignu pretvorbu stanica je genska mutacija. Mutacije povezane s nastankom raka mogu se u manjem broju slučajeva naslijediti, ali najčešće nastaju u somatskim stanicama kao posljedica djelovanja raznih mutagena. Razvoj tumora ovisi o uključivanju brojnih čimbenika. Neki ovise o genetskoj konstituciji pojedinca, a drugi o načinu života, tj. o faktorima okoliša. Pojedini rizični čimbenici djeluju neposredno (npr. duhanski dim), a drugi kao tumorski promotori (hormoni). Karcinogeneza je stupnjeviti proces nastanka tumora. Reakcija kemijskih kancerogenih tvari s DNA najjednostavniji je mehanizam koji objašnjava indukciju nasljedne promjene u stanici.

Rak pluća je maligni tumor pluća i jedan je od najčešćih vrsta karcinoma. Vodeći je uzrok smrti i u muškaraca i u žena. Najčešće se javlja između 55. i 65. godine života, a većina karcinoma pluća je povezana s pušenjem. Rak mokraćnog mjehura deveti je najčešći zloćudni oblik bolesti na svijetu. Pušenje je najveći faktor rizika, a procjenjuje se da je uzročnik bolesti u 65% muškaraca i 30% žena u nekim razvijenim zemljama.

Proliferacija i citotoksičnost stanica može se mjeriti raznim testovima. U ovom radu se koristi MTT-test koji je razvijen za pločicu sa 96 jažica. To je kvantitativni test koji omogućuje brzo i praktično rukovanje s velikim brojem uzoraka. Važno je imati na umu da uvjeti ispitivanja mogu promijeniti metaboličku aktivnost stanica koje su prethodno inkubirane pri temperaturi od 37 ºC sa zasićenjem od 5% CO_2. Glavni zadatak MTT-testa je ispitati broj stanica u staničnoj kulturi koje su preživjele djelovanje određenog spoja u funkciji vremena. U ovom slučaju ispitano je antiproliferativno djelovanje bicikličkog seskviterpena nootkatona na stanične linije A549 raka pluća i T24 raka mokraćnog mjehura. Za ispitivanje MTT-testom korišteni su uzorci različitih koncentracija u određenim vremenskim intervalima i na kraju je potrebno odrediti IC_{50} vrijednost, tj. da li je 50% stanica preživjelo antiproliferacijski učinak nootkatona.

1. OPĆI DIO

1.1. RAK

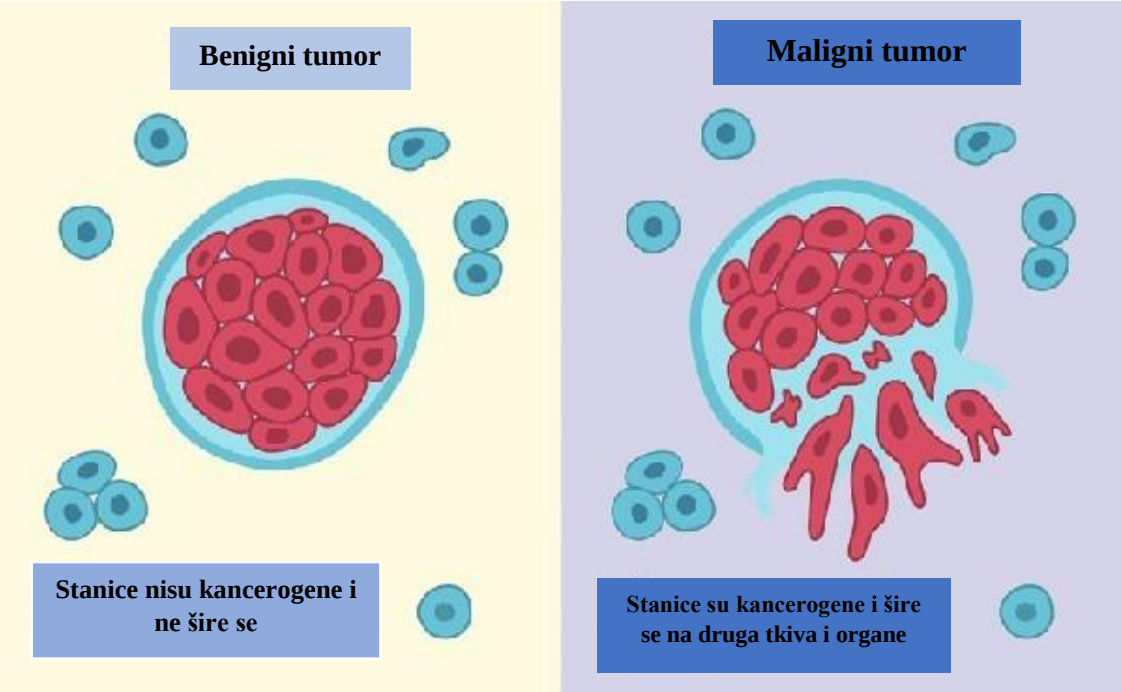
Rak se kao pojam koristi za bolesti u kojima se abnormalne stanice dijele bez kontrole i mogu napasti obližnja tkiva. Predstavlja bolest u kojoj skupina abnormalnih stanica nekontrolirano raste nepoštivanjem normalnih pravila diobe stanica. Normalne stanice su stalno podložne signalima koji govore treba li se stanica podijeliti, diferencirati u drugu stanicu ili umrijeti. Stanice raka razvijaju autonomiju tih signala, što rezultira nekontroliranim rastom i proliferacijom. [1]

Temelj moderne biologije raka počiva na jednostavnom principu: gotovo sve stanice sisavaca imaju slične molekularne mreže koje kontroliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i staničnu smrt. Prevladavajuća teorija koja podupire istraživanja geneze i liječenja raka jest da se normalne stanice pretvaraju u stanice raka kao rezultat promjena u ovim mrežama na molekularnoj, biokemijskoj i staničnoj razini, a za svaku stanicu postoji ograničen broj načina na koji se to može dogoditi.

Trenutna dogma kaže da je rak višestupanjska bolest koja potječe od jedne abnormalne stanice klonalnog podrijetla s promijenjenom sekvencom DNA (mutacijom). Nekontrolirana proliferacija ovih abnormalnih stanica popraćena je mutacijom koja dovodi do blago aberantnog stadija te rezultira formiranjem mase abnormalnih stanica koje se nazivaju tumori. Neke tumorske stanice prolaze daljnje mutacije, što dovodi do stvaranja malignih stanica koje uzrokuju metastazu. Kasniji krugovi mutacije dovode do rasta i napredovanja tumora koji se na kraju probija kroz bazalnu membransku barijeru koja okružuje tkiva i širi na druge dijelove tijela. Do smrti kao posljedice raka dolazi zbog invazije i nekontroliranog širenja tumora u normalno tkivo. Inicijacija i napredovanje raka također ovisi o vanjskim čimbenicima u okolišu kao što su duhan, kemikalije, zračenje, itd. te faktorima unutar stanice (nasljedne mutacije, hormoni, imunološka stanja i mutacije koje nastaju u metabolizmu). Ti čimbenici mogu djelovati zajedno ili u slijedu, što rezultira abnormalnim ponašanjem stanica i prekomjernim proliferacijom.

S obzirom u kojem dijelu tijela se razvio, rak se može manifestirati na različite načine. Za konačnu dijagnozu najčešće je potrebna mikroskopska analiza tkiva dobivenog biopsijom. Kada se jednom dijagnosticira, terapija se najčešće sastoji od kirurške operacije, kemoterapije i zračenja. Ukoliko se ne liječi, većina formi raka izaziva smrt. Rak predstavlja jedan od glavnih uzročnika smrti u razvijenim zemljama. Mnogi oblici su lječivi, a neki i potpuno izlječivi, pogotovo ako se rano otkriju.

Rak pogađa otprilike jednog od tri pojedinca. Prosječan broj stanica formiranih od bilo kojeg pojedinca tijekom prosječnog životnog vijeka je 10 milijuna stanica koje se zamjenjuju svake sekunde. Stoga bi bilo logično pretpostaviti da bi ljudska populacija bilo gdje u svijetu trebala pokazati slične učestalosti raka. Međutim, stopa obolijevanja od raka (broj dijagnosticiranih pojedinaca) vrlo je različita u svim zemljama. Čini se da neki čimbenici interveniraju kako bi dramatično povećali učestalost raka kod neke populacije. Čimbenici koji uzrokuju rak su nasljedni ili okolišni. To znači da određena populacija nosi veliki broj gena osjetljivosti na rak ili da okoliš u kojem živi uvelike doprinosi stopi obolijevanja od raka. [2]



Slika 1. Benigni i maligni tumori

1.1.1. Vrste raka

Rak može nastati zbog poremećaja proliferacije bilo koje vrste stanica u tijelu, tako da postoji više od stotinu vrsta raka koje se jako razlikuju po ponašanju i odgovoru na liječenje. Najvažnije u patologiji raka jest razlikovati benigne (dobroćudne) od malignih (zloćudnih) tumora. Tumor je izraz za svaku nenormalnu proliferaciju stanica u tijelu koja može biti dobroćudna ili zloćudna. Dobroćudni tumor, primjerice kožna bradavica, ostaje ograničen na mjesto na kojem je nastao, ne širi se u susjedna normalna tkiva niti u udaljene dijelove tijela. Naprotiv, zloćudni tumor je u stanju proširiti se na susjedna normalna tkiva i čitavo tijelo preko krvožilnog ili limfatičkog sustava (metastaze). Pojam rak odnosi se samo na zloćudne tumore, a njihova sposobnost da se šire i metastaziraju čini ih opasnima. Dok je dobroćudne tumore obično moguće kirurški ukloniti, zloćudne se tumore zbog širenja u udaljene dijelove tijela često ne može izliječiti ovakvim lokalnim metodama liječenja.

I dobroćudni i zloćudni tumori klasificiraju se prema vrsti stanica iz kojih nastaju. Većina ih se može svrstati u jednu od tri glavne skupine: karcinome, sarkome i leukemije ili limfome. Karcinomi, na koje otpada otprilike 90% slučajeva raka u ljudi, zloćudne su bolesti epitelnih stanica. Sarkomi, rijetki u ljudi, solidni su tumori vezivnih tkiva poput mišića, kosti, hrskavice i veziva u užem smislu. Leukemije i limfomi, na koje otpada otprilike 8% zloćudnih bolesti u ljudi, nastaju iz krvotvornih stanica i iz stanica imunosustava.

Tumori se dalje klasificiraju prema tkivu iz kojeg nastaju (primjerice karcinom pluća ili dojke) i vrsti zahvaćenih stanica. Primjerice, fibrosarkomi nastaju iz fibroblasta, a eritroidne leukemije iz preteča eritrocita (crvenih krvnih stanica). Iako postoji puno različitih vrsta raka, samo neke su česte. Više od 80% svih novih slučajeva potječe iz 11 različitih dijelova tijela. Četiri najčešće vrste raka, na koje otpada preko polovice slučajeva, jesu rak prostate, dojke, pluća i debelog crijeva. Rak pluća je najsmrtonosniji i uzrokuje gotovo 30% svih smrtnih slučajeva. [3]

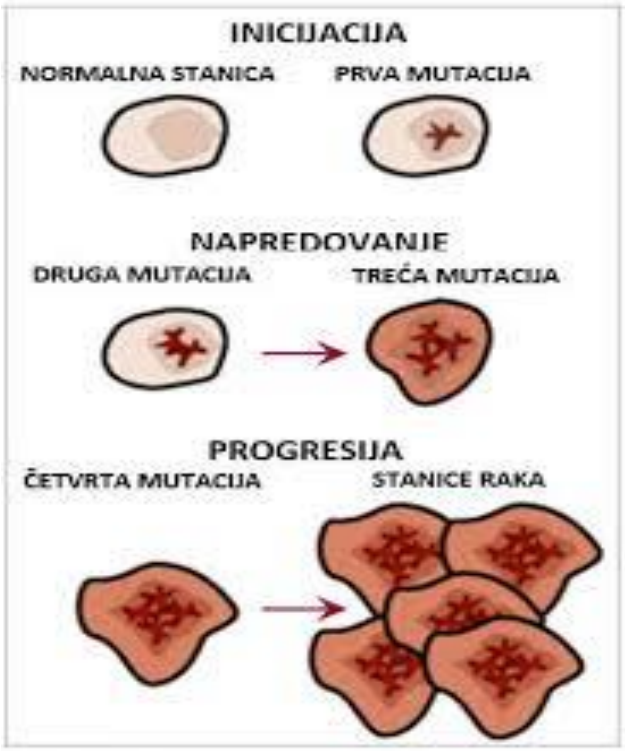
1.1.2. Nastanak raka (karcinogeneza)

Kako su napredovala istraživanja o reakcijama karcinogena (tvari koje uzrokuju rak) sa staničnim makromolekulama, postalo je očito da je većina tih interakcija rezultat kovalentne veze između elektrofilnog oblika karcinogena i nukleofilnih mjesta u proteinima (npr. sumporovi, kisikovi i dušikovi atomi u cisteinu, tirozinu i histidinu) ili nukleinskim kiselinama (npr. atomi dušika i kisika u prstenu purina ili pirimidina). Ova istraživanja su dovela do spoznaje da je metabolička aktivacija određenih kancerogenih uzročnika nužna za proizvodnju "krajnjeg karcinogena" koji zapravo reagira s ključnim molekulama u ciljanim stanicama. Većina poznatih kemijskih kancerogena prolazi kroz neke metaboličke pretvorbe koje su potrebne za kancerogeno djelovanje.

Dakle, jedna od dugogodišnjih teorija karcinogeneze jest da je rak uzrokovan genetskom mutacijom, međutim sada je poznato da su također uključeni epigenetski mehanizmi. Zbog genetske nestabilnosti, koja je karakteristična za većinu karcinoma, u kasnijim fazama progresije često se primjećuje mnogo više genetskih promjena. Budući da većina kemijskih kancerogena reagira s DNA i djeluje mutageno, interakcije s DNA smatraju se najznačajnijim reakcijama tih uzročnika sa staničnim makromolekulama. Reakcija kemijskih kancerogenih tvari s DNA najjednostavniji je mehanizam koji objašnjava indukciju nasljedne promjene u stanici, što dovodi do maligne transformacije. [4]

Štetni čimbenici mogu djelovati zasebno ili udruženo, ali najvažnije svojstvo jest da dolazi do oštećenja staničnog genoma, odnosno DNA. Karcinogene tvari koje ne oštećuju DNA i uzrokuju nastanak tumora drugačijim epigenetskim mehanizmima nazivaju se ko-karcinogeni. Tumor nastaje stupnjevitim procesom i to u najmanje tri stadija: inicijacija (upućivanje), promocija (promicanje) i progresija (napredovanje). Važno je naglasiti da su stadij inicijacije i progresije nastali zbog promjena u DNA, dok stadij promocije ne uključuje izravne strukturne promjene u staničnom genomu nego mu je osnovna značajka promijenjeno izražavanje genoma inicirane stanice. Kritični molekularni ciljevi u stadijima inicijacije, promocije i progresije, odnosno geni gdje se zbivaju promjene izazvane karcinogenima jesu protoonkogeni, stanični onkogeni i tumor-supresorski geni. Protoonkogeni i stanični onkogeni normalno postoje u većini sisavaca. Njihova aktivacija se najčešće ostvaruje jednim od oblika mutacije kao npr. jednostavnom transverzijom, delecijom ili translokacijom. Treća glavna skupina gena koji su u procesu karcinogeneze jesu tumor-supresorski geni, odnosno geni koji sprječavaju izražavanje onkogena. U

mnogim ljudskim tumorima kao glavni tumor-supresorski gen opisan je gen p53, a njegovom mutacijom gubi se funkcija koja omogućava proces apoptoze, tj. programirane stanične smrti kao zaštite od maligne preobrazbe. [5]



Slika 2. Stupnjeviti proces nastanka tumora

Jedno od temeljnih svojstava raka je klonalnost tumora, nastanak tumora iz jedne stanice koja počinje nenormalno proliferirati, ali klonalno podrijetlo tumora ne implicira da je ishodišna stanica u početku stekla sve značajke stanice raka. Prvi korak u procesu nastanka tumora, inicijacija, djeluje kao rezultat genetičke promjene koja dovodi do abnormalne proliferacije jedne jedine stanice. Proliferacija stanica zatim dovodi do prekomjernog rasta monoklonske populacije tumorskih stanica. Progresija tumora se nastavlja nakupljanjem dodatnih mutacija u populaciji tumorskih stanica. Neke od njih, poput onih koje rezultiraju bržim rastom, dovode do selektivne prednosti stanice u kojoj su se pojavile i njezini potomci s vremenom postaju dominantna populacija u tumoru. Taj se postupak naziva klonskom selekcijom jer novi klon tumorskih stanica nastaje zbog bržeg rasta ili nekog drugog svojstva (poput metastaziranja). [3]

1.1.3. Uzroci nastanka raka

Koncept uzročnosti dugo je imao središnju ulogu u primjeni epidemioloških dokaza za kontrolu raka. Imenovanje rizičnih faktora kao "uzročnika" raka bilo je polazna točka za pokretanje programa za prevenciju raka, temeljenih na smanjenju izloženosti rizičnim faktorima. Tijekom posljednjih 50 godina, identifikacija uzroka raka bila je glavno žarište epidemiološkog istraživanja raka; tek se nedavno pažnja preusmjerila na identifikaciju genetskih odrednica osjetljivosti i markera u ranijim fazama procesa nastanka tumora, tj. karcinogeneze. Postoje brojni primjeri koji prikazuju kako je prepoznavanje uzroka raka dovelo do intervencije i smanjenja pojave raka. [6]

Tvari koje uzrokuju rak nazivaju se karcinogeni. Otkrivene su istraživanjima na pokusnim životinjama i epidemiološkom analizom učestalosti pojedinih vrsta raka u određenim populacijama ljudi. Budući da je nastanak zloćudne bolesti složen proces koji se sastoji od više koraka, mnogi čimbenici mogu utjecati na vjerojatnost nastanka raka pa je u većini slučajeva pojednostavljeno govoriti o jednom uzroku. Bez obzira na to, mnogi agensi, uključujući zračenje, kemikalije i viruse, uzrokuju rak u pokusnih životinja i ljudi. [3]

Zračenje i mnogo kemijskih kancerogena djeluje tako da oštećuju DNA i induciraju mutacije. Karcinogeni, koji pridonose pojavi raka u ljudi su primjerice, UV zračenje (glavni uzrok raka kože) i karcinogene kemikalije iz duhanskog dima. Pušenje uzrokuje najveći postotak svih slučajeva raka pluća, a uz to i rak usne šupljine, ždrijela, grla, jednjaka i drugih organa. Ostali karcinogeni ne uzrokuju mutacije, već pridonose nastanku raka stimulirajući proliferaciju stanica. Takve spojeve nazivamo promotorima tumora i oni uzrokuju povećanje broja dioba stanica. Hormoni (pogotovo estrogeni) su važni promotori nastanka nekih vrsta raka u ljudi jer stimuliraju proliferaciju stanica endometrija. Neki virusi uzrokuju rak u pokusnih životinja i ljudi, a infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* uzrokuje rak želuca. U ljudi su najčešće vrste raka uzrokovane virusima, rak jetara i grlića maternice. Takvi virusi nisu važni samo kao uzročnici raka, već imaju ključnu ulogu u razjašnjavanju molekularnih mehanizama odgovornih za nastanak raka, kako onih induciranih virusima, tako i onih induciranih nevirusnim karcinogenima. [7]

1.1.4. Simptomi, dijagnoza i liječenje raka

Simptomi koje pojedine vrste raka mogu izazvati, razlikuju se u mnogočemu i često nisu specifični za određenu vrstu. Poseban problem je to što se simptomi, pogotovo malignih bolesti unutarnjih organa, često osjete kada je bolest već uznapredovala, kada je terapija složenija, dugotrajnija, a mogućnost izlječenja sve manja. Simptomi raka obično stvaraju promjene u tijelu koje se ne odnose na konkretan ili utvrđen uzrok. Najčešći simptomi su:

- Rane

  Ukoliko se pojavi rana koja nije nastala uslijed neke ozljede ili povrede, a ne zarasta i ne povlači se, može upućivati na rak . Rak kože i usta može se pojaviti u obliku rane.
- Promuklost

  Ona koja traje duži period (preko mjesec dana) može biti simptom raka u grlu i zahtjeva obavezan pregled otorinolaringologa. Promuklost je najčešće uzrokovana drugim bolestima, npr. infekcijom, ali je ne smijemo zanemariti kao mogući simptom raka grla.
- Kašalj

  Vjerojatno jedan od najčešćih simptoma zbog kojih ljudi posjećuju liječnika, obično je posljedica neke infekcije, astme, pušenja, srčane slabosti i sl. Međutim, ukoliko se kašalj promijeni te se ne povuče u roku od mjesec dana, to može biti i simptom raka pluća.
- Poteškoće s gutanjem

  Trajne ili povećane poteškoće mogu biti znak koji ukazuje na rak jednjaka, želuca ili grla. U većini slučajeva prouzrokovane su drugim bolestima, npr. upalom grla.
- Krv u mokraći

  Može biti simptom raka bubrega ili mjehura, ali se može pokazati i kod upale mjehura. Pregled treba obaviti i u slučaju poteškoća s pražnjenjem mjehura, što može upućivati na benigno povećanje prostate ili rak prostate.
- Bolovi

  Mogu biti simptom raka, primjerice bolovi u trbuhu, iako su rijetko jedini simptom raka. Bol koja traje duže vrijeme, a ne može se objasniti nekim uobičajenim uzrocima mora se ispitati.

- Gubitak na težini

  Ako nije uzrokovan nekim posebnim režimom prehrane, vježbom i slično, zahtjeva daljnje ispitivanje.
- Opći simptomi

  Temperatura, umor, gubitak apetita ili nesvjestica u periodu od nekoliko tjedana, mogu biti simptomi raka. Ovi simptomi su sasvim uobičajeni kada su u pitanju mnoge druge bolesti, ali ukoliko se nastave i traju u periodu od nekoliko tjedana, treba otići liječniku. [8]

Ne postoji niti jedan test koji može točno dijagnosticirati rak. Kompletna procjena pacijenta obično zahtijeva iscrpnu anamnezu i fizički pregled, zajedno s dijagnostičkim testiranjem. Potrebni su mnogi testovi kojima se može utvrditi da li osoba ima rak ili neka druga bolest (poput infekcije) oponaša simptome raka. Učinkovito dijagnostičko testiranje koristi se za potvrđivanje ili uklanjanje prisutnosti bolesti, praćenje procesa bolesti te za planiranje i procjenu učinkovitosti liječenja. Dijagnostički postupci raka mogu uključivati: snimanje, laboratorijske testove (uključujući testove za tumorske markere), biopsiju tumora, operaciju ili genetsko testiranje. Klinička kemija koristi kemijske procese za mjerenje razine kemijskih komponenata u tjelesnim tekućinama i tkivima. Najčešći uzorci koji se koriste u kliničkoj kemiji su krv i urin. Laboratorijski testovi uključuju niz ispitivanja krvi i urina. Rad na krvi može uključivati testiranje na genetiku (nasljedni poremećaji) ili određivanje količine kisika u krvi. Ispitivanja mokraće mogu se provesti radi provjere krvi, kemikalija i bakterija na infekciju ili druge nepravilnosti. Najčešćim laboratorijskim testovima za dijagnosticiranje raka pripadaju: krvni testovi, analiza urina i tumorski markeri. [9]

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. Važni savjeti u prevenciji, otkrivanju i liječenju raka još uvijek nisu uspjeli utjecati na smanjivanje visoke učestalosti i niske stope preživljavanja od mnogih vrsta tumora. [10]

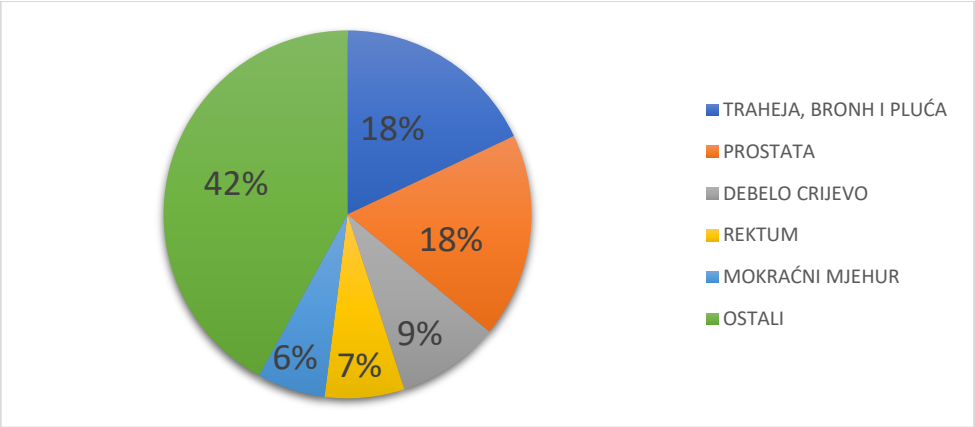
1.1.5. Epidemiologija raka

Rak je vodeći uzrok smrti u 70% slučajeva u svijetu. Rastući udio starijih u ukupnoj populaciji odgovara porastu bolesti od raka. Bolesti s najvećom incidencijom uključuju rak pluća, dojke, debelog crijeva i prostate. [11] Procjenjuje se da se globalni teret raka 2018. godine povećao na 18,1 milijun oboljelih i 9,6 milijun smrtnih slučajeva. Porast oboljelih od raka uzrokovan je mnogim faktorima, uključujući porast broja stanovnika, starenje i promjenjivu rasprostranjenost određenih uzročnika povezanih sa društvenim i ekonomskim razvojem. Učinkoviti napori u prevenciji mogu objasniti smanjenje stope incidencije za neke vrste raka, poput karcinoma pluća (npr. kod muškaraca u sjevernoj Europi i Sjevernoj Americi) i karcinoma vrata maternice (npr. u većini regija osim podsaharske Afrike). Međutim, novi podaci pokazuju kako se većina zemalja i dalje suočava s porastom broja slučajeva kojima se dijagnosticira rak.

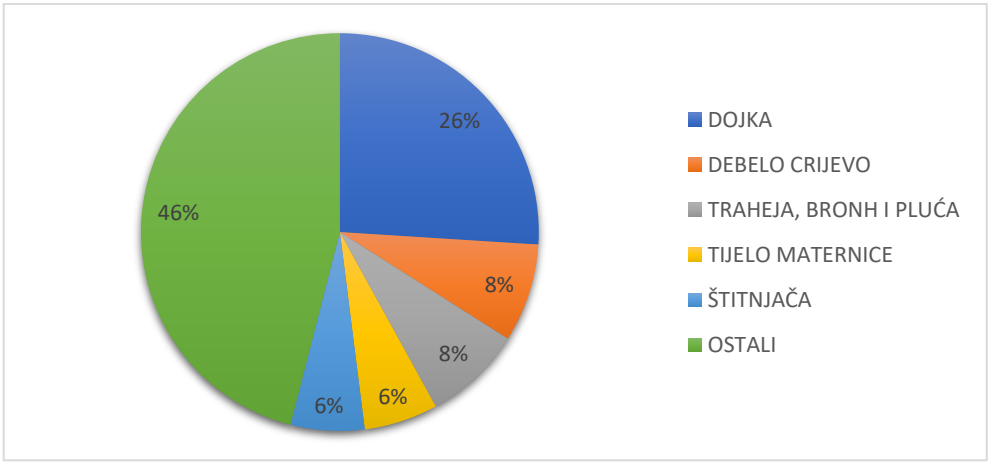
Rak pluća, dojke i debelog crijeva, tri su najčešće vrste karcinoma u smislu incidencije i svrstavaju se među prvih pet po stopi smrtnosti (prva, peta i druga). Zajedno, ove tri vrste raka odgovorne su za jednu trećinu incidencija i tereta smrtnosti u cijelom svijetu. Rak pluća i dojke vodeća je vrsta u svijetu po broju novih slučajeva; za svaku od ovih vrsta procjenjuje se oko 2,1 milijun dijagnoza u 2018. godini. Rak debelog crijeva (1,8 milijuna slučajeva, 10,2% ukupnog broja) je treći najčešće dijagnosticirani karcinom, rak prostate je četvrti (1,3 milijuna slučajeva, 7,1% ukupnog broja) i rak želuca je peti (1 milijun slučajeva, 5,7% ukupnog broja). Rak pluća odgovoran je i za najveći broj smrtnih slučajeva (1,8 milijuna smrti, 18,4% ukupnog broja), a rak dojke je rangiran kao peti vodeći uzrok smrti (627 000 smrti, 6,6% ukupnog broja) jer je prognoza relativno povoljna, barem u razvijenijim zemljama.

Rak pluća je najčešće dijagnosticiran rak kod muškaraca (14,5% od ukupnog broja slučajeva kod muškaraca i 8,4% kod žena) i vodeći uzrok smrti od raka. U muškaraca slijedi rak prostate (13,5%), debelog crijeva (10,9%), jetre (10,2%) i želuca (9,5%) koji uzrokuju smrt. Rak dojke je najčešće dijagnosticiran rak kod žena: 24,2%, tj. otprilike jedan od 4 svih novih slučajeva karcinoma dojke dijagnosticiranih kod žena širom svijeta. Rak dojke je također vodeći uzrok smrti od raka kod žena (15%), a slijedi rak pluća (13,8%) i debelog crijeva (9,5%), koji su ujedno treća i druga najčešća vrsta raka, odnosno rak grlića maternice zauzima četvrto mjesto po učestalosti (6,6%) i smrtnosti (7,5%). [12]

Rak je značajan javnozdravstveni problem stanovništva Hrvatske. Drugi je najvažniji uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila pa je vrlo važno raspolagati odgovarajućim podacima koji će pomoći u izradi strategije za prevenciju te odgovarajuću onkološku službu i zaštitu. Pet najčešćih vrsta raka čine ukupno 58% novih slučajeva raka u muškaraca: traheja, bronh i pluća (18%), prostata (18%), debelo crijevo (9%), rektum (7%) i mokraćni mjehur (6%). Pet najčešćih vrsta raka u žena: dojka (26%), debelo crijevo (8%), traheja, bronh i pluća (8%), tijelo maternice (6%) i štitnjača (6%), čine 53% novih slučajeva raka u žena. Ukupan broj novodijagnosticiranih zloćudnih bolesti 2015. godine bio je 22 503, 11 969 muškaraca i 10 534 žena. [13]



Grafikon 1. Najčešći tipovi raka kod muškaraca u Hrvatskoj (2015. godina)



.

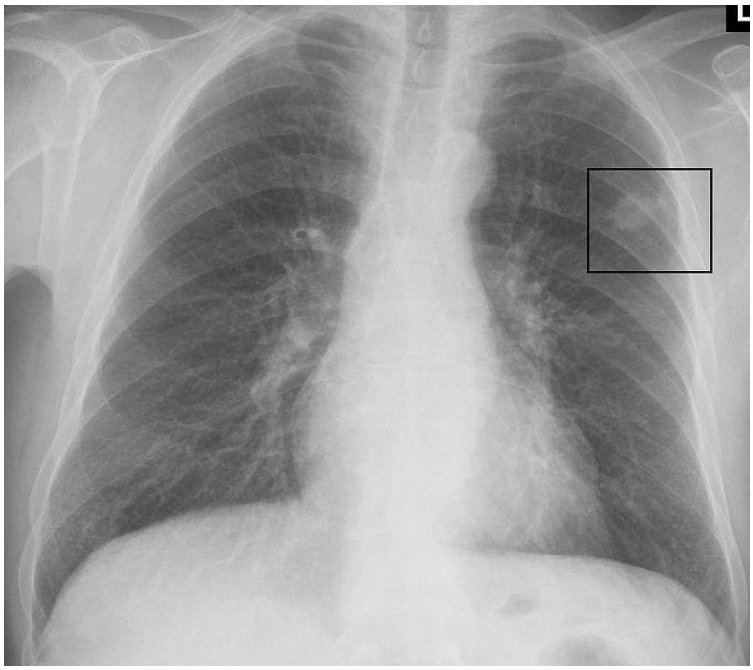
Grafikon 2. Najčešći tipovi raka kod žena u Hrvatskoj (2015. godina)

1.2. RAK PLUĆA

Rak pluća je maligni tumor pluća i jedan je od najčešćih vrsta karcinoma. Vodeći je uzrok smrti i u muškaraca i u žena. Po pojavnosti raka pluća, Hrvatska je na visokom devetom mjestu u Europi. Najčešće se javlja između 55. i 65. godine života, a većina karcinoma pluća je povezana s pušenjem. Važno je pravodobno utvrditi dijagnozu, no nažalost najveći broj bolesti otkrije se u uznapredovalom stadiju. Razlog tome je da početni stadij bolesti ne uzrokuje simptome koji bi potaknuli bolesnika da zatraži liječničku pomoć i podvrgne se pretragama. Tako pojava simptoma obično ukazuje na to da je bolest uznapredovala. Oko 25 % karcinoma pluća otkriva se slučajno kod snimanja pluća. Simptomi i znakovi ovise o tome da li je u pitanju lokalni tumor, regionalno širenje ili metastaze. Opći simptomi mogu se javiti u bilo kojem stadiju bolesti. Najčešći simptomi su dugotrajni kašalj, iskašljavanje krvi, bol u prsnom košu, smetnje disanja, gubitak apetita, mršavljenje, glavobolja, itd. [14]

Više od 90% raka pluća počinje u bronhima (veliki dišni putovi koji pluća opskrbljuju zrakom). Takav se rak zove bronhogeni karcinom (karcinom bronha). Tipovi karcinoma pluća su: karcinom pločastih stanica (planocelularni karcinom), karcinom malih stanica (tzv. mikrocelularni karcinom), karcinom velikih stanica i adenokarcinom. Karcinom pluća se kliničkom podjelom dijeli na karcinom pluća malih stanica i karcinom pluća ne-malih stanica. Karcinom pluća malih stanica je agresivniji i češće metastazira, a kada se bolest otkrije, već je uglavnom uznapredovala pa su prognoze lošije. Karcinom pluća ne-malih stanica sporije raste i sporije se širi pa ga je moguće kirurški odstraniti. Stoga je bitno pravovremeno postaviti dijagnozu i što ranije početi sa liječenjem. Rak pluća može se širiti i putem krvotoka u jetru, mozak, nadbubrežne žlijezde i kosti. To se može dogoditi u ranom stadiju bolesti, naročito u slučaju karcinoma malih stanica.

Opći podaci i informacije o dosadašnjim i obiteljskim bolestima uvelike pomažu u postavljanju dijagnoze. Ako se otkrije da se radi o karcinomu pluća, treba odrediti stadij i proširenost bolesti da bi se počelo planirati liječenje. Način liječenja karcinoma pluća uvjetovan je brojnim čimbenicima, uključujući vrstu karcinoma, njegovu veličinu, smještaj, proširenost te opće zdravstveno stanje bolesnika. Brojni različiti načini liječenja mogu se koristiti u liječenju karcinoma pluća i/ili u svrhu poboljšanja kvalitete života i smanjenja simptoma. [15]



Slika 3. Rendgenska slika raka pluća



Slika 4. Pluća pušača i nepušača

1.2.1. Etiologija

Upotreba duhana čini čak 90% svih slučajeva raka pluća širom svijeta. Manje od 20% pušača razviju rak pluća, što sugerira da i drugi faktori igraju ulogu u bolesti. Dijeta i postojeća benigna bolest pluća također su povezani s rizikom za razvoj raka pluća. Ostali uzroci raka pluća uključuju pasivno pušenje te faktore iz okoliša, poput izloženosti radioaktivnim česticama, radonu, azbestu i raznim profesionalnim izlaganjima. [16]

- Pušenje cigareta
  Više od 90% svih slučajeva raka pluća uzročno je povezano s pušenjem cigareta. Rizik od nastanka raka povećava se s brojem svakodnevno konzumiranih cigareta i trajanjem izloženosti duhanskom dimu. Prestanak pušenja smanjuje rizik od raka pluća.
- Pasivno pušenje
  Pušenje je rizično i za osobe koje su izložene duhanskom dimu, a nisu pušači. Incidencija raka pluća u osoba koje žive u istom kućanstvu s pušačem veća je za 30% u odnosu prema osobama koje nisu izložene takvim uvjetima.
- Izloženost radioaktivnim česticama i radonu
  Rudari u rudnicima urana izloženi radioaktivnoj prašini i plinu radonu učestalije obolijevaju od raka pluća. Istraživanja su pokazala da je povezanost raka pluća i izloženosti radonu podrijetlom iz građevinskog materijala ugrađivanog u stambene zgrade.
- Izloženost azbestu
  Stopa incidencije ekstremno je visoka u osoba izloženih azbestu. Azbestna prašina u visokom postotku uzrokuje rak pluća. [17]

S obzirom na nabrojane uzroke, može se zaključiti da se velika većina smrti od raka pluća može pripisati pušenju cigareta jer duhanski dim sadrži vrlo složenu mješavinu karcinogena koji mogu oštetiti DNA. To su policiklički aromatski ugljikovodici, aromatski amini i nitrozamini koji su specifični za duhan te su primijenjeni kao glavni mutageni kancerogeni. [18] Genetska predispozicija također je važan čimbenik u etiologiji raka pluća. [19] Procjenjuje se kako se 8 do 14% karcinoma pluća razvija uslijed nasljednih čimbenika. [20]

1.2.2. Simptomi, dijagnoza i liječenje

Simptomi raka pluća su različiti, ovise o tome gdje je tumor smješten i do kuda se proširio. Upozoravajući znakovi nisu uvijek prisutni i nije ih lako identificirati. U do 25% ljudi koji su dobili rak pluća, rak se otkrio slučajno na rutinskoj RTG snimci pluća ili CT-om. Postoje simptomi koji se odnose isključivo na rak pluća; rast raka pluća i invazija plućnog i okolnog tkiva može ometati disanje, što dovodi do simptoma kao što su kašalj, otežano disanje, bol u prsima i iskašljavanje krvi. Simptomi koji se odnose na metastaziranje, uključuju rak pluća koji se proširio na kosti te može proizvesti jaku bol na mjestima koja su zahvaćena tumorom. Rak koji se proširio na mozak može prouzročiti niz neuroloških simptoma koji mogu uključivati smetnje vida, glavobolje, epileptičke napadaje ili simptome. Nespecifični simptomi koji se mogu naći kod svih oblika raka javljaju se i kod bolesnika s rakom pluća, a uključuju gubitak težine, slabost i umor. Psihološki simptomi kao što su depresija i promjene raspoloženja također su uobičajeni. [21]

U gotovo 70% bolesnika prođe šest ili više mjeseci od pojave prvih simptoma do postavljanja dijagnoze. Temeljna dijagnostika maligne bolesti pluća jest histološka ili citološka. Najčešće se počinje s citološkim pregledom iskašljaja, koji je pozitivan u 60% bolesnika sa karcinomom pluća. Kada se u iskašljaju nađu maligne stanice, to određuje tip karcinoma, ali ne i lokalizaciju i proširenost tumora. Najčešće metoda vizualizacije promjene na plućima je radiografija. Kompjuterizirana tomografija (CT) je važna u detekciji promjena manjih od 10 mm, uvećanih limfnih čvorova, zahvaćenosti pleure, zida grudnog koša, kao i žilnih struktura. Magnetna rezonancija (MR) ima prednosti u odnosu na CT, kod zahvaćenosti struktura zida prsnog koša, pleure, koštanih struktura i dijafragme. [22]

Liječenje raka pluća može uključivati kirurško odstranjenje raka, kemoterapiju ili zračenje, kao i kombinacije tih tretmana. Odluka o tome koji su terapijski oblici najbolji za oboljelu osobu donosi se nakon procjene lokalizacije i opsega tumorske bolesti, kao i cjelokupnog zdravstvenog stanja pacijenta. Prognoza raka pluća ukazuje na šansu za izlječenje od raka ili produljenje života, a ovisi o lokalizaciji, veličini raka, prisutnosti simptoma, vrsti raka pluća te ukupnom zdravstvenom statusu bolesnika. [21]

1.2.3. Epidemiologija

Rak pluća je vodeći uzrok smrti od raka u svijetu. U 2008. godini 1,6 milijuna ljudi dobilo je novu dijagnozu, koja je činila 13% svih novih dijagnoza raka, a 1,4 milijuna umrlo je od raka pluća, što je 18% svih slučajeva raka. Rak pluća je relativno rijedak prije 50-tih godina života; rizik se povećava s godinama nakon toga. Zanimljivo je da iako je pušenje najviše povezano s rakom pluća (procjenjuje se da je 80% - 90% slučajeva uzrokovano tim), tek oko 15% pušača razvije rak pluća. [23]

Globalna geografska distribucija raka pluća pokazuje izrazite regionalne razlike. Kod muškaraca, najveća stopa incidencije zabilježena je u srednjoj i istočnoj Europi te u istočnoj Aziji. Kod žena je stopa incidencije niža nego kod muškaraca te najviši procijenjeni postotci su zabilježeni u Sjevernoj Americi, sjevernoj Europi i istočnoj Aziji. Najniže stope incidencije i za muškarce i žene zabilježene su na Afričkom kontinentu. Stope incidencije i smrtnosti od raka pluća imaju tendenciju da se zrcale jedna od druge jer većina pacijenata s karcinomom pluća na kraju umre od njega. [24]

U Hrvatskoj je prema podacima Registra za rak pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo 2012. godine među novootkrivenim malignim tumorima, karcinom bronha i pluća kod muškaraca bio na prvom mjestu (18% svih slučajeva), a kod žena na trećem (7% novootkrivenih tumora). Pritom karcinom pluća postaje najčešći tumor kod muškaraca nakon 40. godine života, a kod žena doseže treće mjesto nakon karcinoma dojke i tijela maternice nakon 50. godine. Godišnje je dijagnosticirano oko 3000 novih bolesnika s rakom pluća, a prema dostupnim statistikama, petogodišnje preživljenje pacijenata u Hrvatskoj je ispod 10%, što nas svrstava na samo dno ljestvice europskih zemalja. [21]

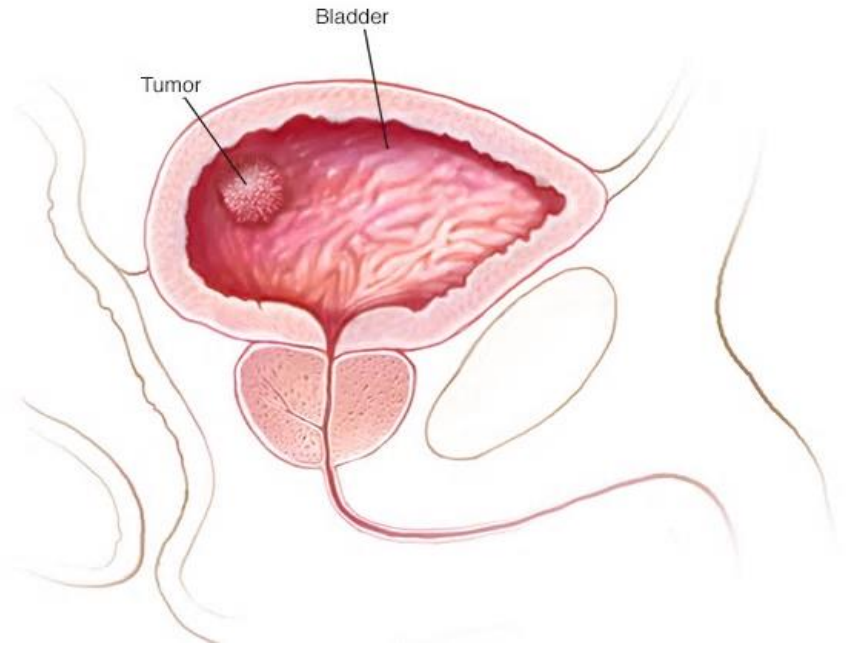
1.3. RAK MOKRAĆNOG MJEHURA

Rak mokraćnog mjehura deveti je najčešći zloćudni oblik bolesti na svijetu. Pušenje je najveći faktor rizika, a procjenjuje se da je uzročnik u 65% muškaraca i 30% žena u nekim razvijenim zemljama. Najčešće se javlja u dobi između 65. i 70. godine starosti. Čimbenici rizika za rak mokraćnog mjehura uključuju i obiteljsku anamnezu, prethodnu terapiju zračenjem, česte infekcije mokraćnog mjehura i izloženost određenim kemikalijama. Predstavlja bilo koju od nekoliko vrsta raka koje proizlaze iz tkiva mokraćnog mjehura. To je bolest u kojoj stanice rastu nenormalno i mogu se proširiti na druge dijelove tijela. [25]

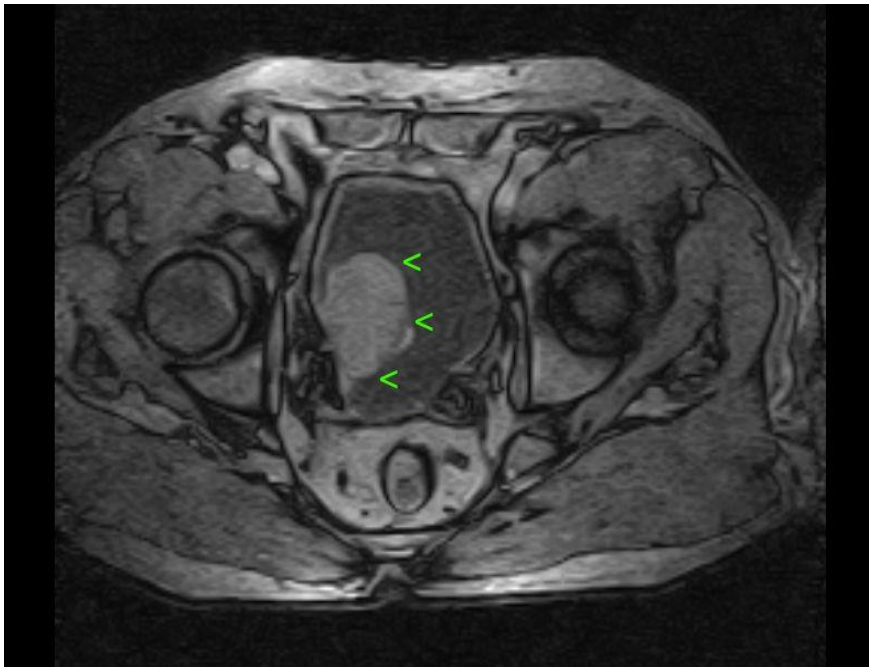
Simptomi uključuju krv u mokraći, bol pri mokrenju i bolove u donjem dijelu leđa. Dijagnoza se obično vrši cistoskopijom s biopsijama tkiva. Stadij karcinoma obično se određuje medicinskim slikama kao što su računalna tomografija (CT), magnetska rezonanca (MR) i skeniranje kostiju. Liječenje ovisi o stadiju raka. To može uključivati kombinaciju operacije, zračenja, kemoterapije ili imunoterapije. [26]

Temeljna je klinička podjela te bolesti na mišićno-invazivne i mišićno-ne-invazivne karcinome, ovisno o zahvaćenosti mišićnog sloja stijenke mokraćnog mjehura. Otprilike 20% svih novih slučajeva raka mokraćnog mjehura uključuje mišićno-invazivni karcinom mokraćnog mjehura, a 20% mišićno-ne-invazivnih karcinoma mokraćnog mjehura na kraju napreduje do mišićno-invazivne bolesti. Mišićno-invazivni karcinomi mokraćnog mjehura su neliječeni, površni tumori koji mogu postupno početi prodirati u mišićnu stijenku mokraćnog mjehura i predstavljaju češći uzrok smrti nego mišićno-ne-invazivni koji ne prodiru u mišićnu stijenku te su rijetko uzrok smrti. Bolesnici s invazijom karcinoma u mišićnoj stijenci mokraćnog mjehura imaju 5–godišnje preživljavanje oko 50%, što se poboljšava kemoterapijskim liječenjem. [27]

Rak koji zahvaća samo sluznicu mjehura ili urasta samo u površinski sloj mišića, može se u potpunosti odstraniti pri cistoskopiji. Rak koji urasta dublje u stijenku mjehura ili kroz nju, ne može se u potpunosti odstraniti kroz cistoskop, nego se obično liječi djelomičnim ili potpunim odstranjivanjem mjehura. [28]



Slika 5. Mokraćni mjehur i karcinom mokraćnog mjehura



Slika 6. Karcinom na desnoj strani mokraćnog mjehura (MR-prikaz)

1.3.1. Etiologija

Rak mjehura se razvija kada stanice u mjehuru počnu nenormalno rasti. Umjesto da rastu i dijele se na uredan način, ove stanice razvijaju mutacije zbog kojih rastu van kontrole i ne umiru. Ove abnormalne stanice tvore tumor. Nije uvijek jasno što uzrokuje rak mokraćnog mjehura, a neki ljudi koji boluju od raka mokraćnog mjehura nemaju očigledne čimbenike rizika. Najčešći uzroci nastanka raka uključuju: pušenje cigareta, izloženost kemikalijama, prethodnu izloženost zračenju i infekcije.

- Pušenje cigareta
  Prepoznato je kao najvažniji čimbenik rizika povezan s razvojem raka mokraćnog mjehura. Gotovo polovica svih slučajeva pripisuje se pušenju cigareta jer mogu uzrokovati nakupljanje štetnih kemikalija u urinu. Tada tijelo obrađuje kemikalije iz dima i neke od njih izlučuje u mokraći. Te štetne kemikalije mogu oštetiti sluznicu mjehura, što može povećati rizik od raka.
- Izloženost kemikalijama
  Bubrezi igraju ključnu ulogu u filtriranju štetnih kemikalija iz krvotoka i premještanju istih u mokraćni mjehur. Zbog toga se smatra da neke kemikalije mogu povećati rizik od raka mokraćnog mjehura. Kemikalije povezane s rizikom od raka mjehura uključuju arsen te kemikalije koje se koriste u proizvodnji boja, gume, kože, tekstila i proizvoda od boja.
- Prethodna izloženost zračenju
  Ljudi koji su bili podvrgnuti radijacijskom tretmanu zbog prethodnog karcinoma imaju povišen rizik od razvoja raka mokraćnog mjehura.
- Infekcije
  Mokraćne infekcije mogu se dogoditi kod dugotrajne uporabe mokraćnog katetera te mogu povećati rizik od raka stanica mokraćnog mjehura.

Od svih navedenih uzročnika raka mokraćnog mjehura, pušenje predstavlja najveći faktor rizika. Nasljedni faktori također mogu utjecati na razvoj bolesti. Ako netko od bliže rodbine ima povijest raka mokraćnog mjehura, postoji mogućnost povećanog rizika od bolesti. Ipak, još uvijek nije poznato je li povećan rizik zbog zajedničkih gena ili izloženosti karcinogenima. [26]

1.3.2. Simptomi, dijagnoza i liječenje

Znakovi i simptomi raka mokraćnog mjehura mogu uključivati: krv u mokraći (hematurija), bolno mokrenje i bol u leđima. No, ti se simptomi često javljaju zbog nečeg drugog osim raka mokraćnog mjehura. [26] Hematurija se opaža u preko 80% slučajeva i otkriva se samo laboratorijskim istraživanjem te može predstavljati česti simptom nemalignih stanja, poput infekcije mokraćnog sustava. Kada je povezana s rakom mokraćnog mjehura, ima tendenciju pojavljivanja tijekom terminalnog mokrenja; može biti povremena ili postojana i ima promjenjivi intenzitet. [29]

Testovi i postupci koji se koriste za dijagnosticiranje raka mokraćnog mjehura uključuju najčešće citoskopiju i biopsiju. Citoskopija je postupak gledanja unutar mokraćnog mjehura i uretre radi provjere abnormalnih područja, a biopsija je uklanjanje stanica ili tkiva kako bi ih patolog pregledao pod mikroskopom da provjeri znakove raka. Biopsija karcinoma mokraćnog mjehura obično se obavlja tijekom cistoskopije. Tijekom biopsije moguće je ukloniti i cijeli tumor. Također se koriste slikovne dijagnostičke metode: ultrazvuk (UZV), intravenska urografija, računalna tomografija (CT) i magnetska rezonanca (MR). CT je postupak koji čini niz detaljnih slika trbuha, preuzet iz različitih kutova. Slike su napravljene pomoću računala povezanih s rendgenskim strojem. MR koristi magnet, radio valove i računalo kako bi se dobila serija detaljnih slika područja unutar tijela.

Mogućnosti liječenja ovise o brojnim čimbenicima, uključujući vrstu, stupanj i stadij raka. Liječenje može uključivati: kemoterapiju mokraćnog mjehura (intravezikularna kemoterapija) za liječenje tumora koji su ograničeni na sluznicu mjehura, ali koji imaju visoki rizik od napredovanja u viši stadij, kemoterapiju za cijelo tijelo (sistemska kemoterapija) kako bi se povećala šansa za izlječenje kod osobe koja je imala operaciju uklanjanja mjehura ili kao primarni tretman u slučajevima kada operacija nije moguća. Terapija zračenjem za uništavanje stanica raka često je primarno liječenje u slučajevima kada operacija nije opcija ili nije poželjna i imunoterapija, kako bi se aktivirao imunološki sustav tijela da se bori protiv raka, bilo u mjehuru ili u cijelom tijelu. [30]

1.3.3. Epidemiologija

Rak mokraćnog mjehura četvrta je najčešća zloćudna bolest muškaraca u zapadnom svijetu, nakon karcinoma prostate, pluća i debelog crijeva. U Europi i SAD-u čini 5-10% svih malignih oboljenja kod muškaraca i do 1% kod žena, npr. u usporedbi s rizikom od raka pluća, koji je 8% za muškarce i 2% za žene. Pojavljuje se između 65. i 70. godine života. Rak mjehura je 3 do 4 puta češći kod muškaraca nego kod žena. S druge strane, istraživanja su pokazala da je preživljavanje raka mokraćnog mjehura lošije kod žena nego kod muškaraca.

Postoje populacije s visokom stopom pušača, ali niskom stopom obolijevanja od raka mokraćnog mjehura. Ovo sugerira razlike u metabolizmu kancerogena povezanih sa duhanskim dimom. U cijelom svijetu vremenski trendovi raka mokraćnog mjehura prate trendove u pušenju, a u većini zapadnih zajednica učestalost i smrtnost kod muškaraca smanjili su se u posljednjem desetljeću. [31]

U Hrvatskoj je rak mokraćnog mjehura tijekom posljednjeg desetljeća u posebno velikom porastu. Broj novih slučajeva je u zadnjih 15 godina porastao za 100%. Ukupno rak mokraćnog mjehura čini 4,3% od svih tumora 2003. godine u Hrvatskoj, 6% u muškaraca i 2,4% u žena. Zahvaljujući boljoj medicinskoj skrbi, koja je i dostupnija, danas se s lakoćom može dokazati rak mokraćnog mjehura. [32] U 2016. godini u Hrvatskoj je dijagnosticirano 860 novih slučajeva oboljelih, a u 2018. godini je zabilježeno 549 393 novodijagnosticiranih te 199 922 smrtnih slučajeva. Otkrivanje bolesti u ranom stadiju i nove mogućnosti liječenja mogu poboljšati stopu preživljenja. [33]

1.4. KLASIFIKACIJA ZLOĆUDNIH TUMORA

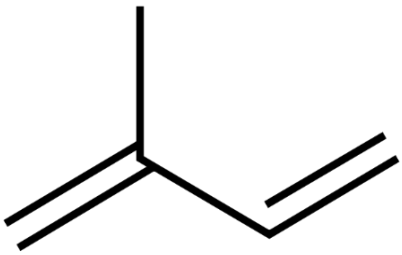
Sustav klasifikacije metastaza tumorskog čvora (TNM) temelji prognoze bolesnika na veličini tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova i metastazama. Izdanje TNM-klasifikacije zloćudnih tumora (TNM Classification of Malignant Tumours, UICC) usvojio je Američki združeni komitet za rak (American Joint Committee on Cancer, AJCC). TNM-klasifikacija uzima u obzir stanje prije liječenja te se primjenjuje kako bi se odredila početna strategija u liječenju osobe s tumorom. Proširenost karcinoma definira se TNM-klasifikacijom gdje T označava invazivnost tumora, N zahvaćenost limfnih čvorova, a M postojanje metastaza. **Tablica 1.** [18]

T (primarni tumori)	
T1	mali tumor koji još ne urasta u tkivo
T2	srednje veliki tumor koji lagano urasta u okolno tkivo
T3	veliki tumor koji dijelom urasta u okolno tkivo
T4	vrlo veliki tumor koji snažno urasta u okolno tkivo
N (metastaze limfnih čvorova)	
N0	nema metastaza u limfnim čvorovima
N1	regionalne, vrlo bliske, pokretne metastaze limfnih čvorova
N2	regionalne, nepokretne metastaze limfnih čvorova
N3	opsežne, nepokretne metastaze limfnih čvorova
M (udaljene metastaze)	
M0	nema metastaza
M1	prisutne metastaze u udaljenim organima

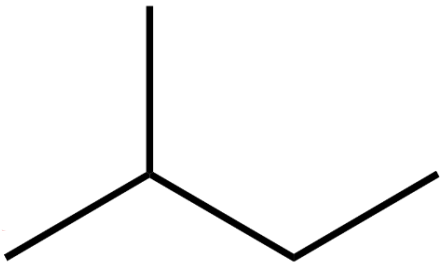
Tablica 1. TNM-klasifikacija

1.5. TERPENI

Terpeni (terpenoidi, izoprenoidi) su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodna mirisa. [34] Pojam terpeni potječe od terpentina (lat. *Balsamum terebinthinae*), a to je svijetla do tamno obojena gusta otopina smola u eteričnim uljima. Dakle, terpeni su hlapljive tvari koje daju biljkama i cvijeću njihov karakterističan miris. Poznato je oko 30 000 terpena, a njihovu osnovnu strukturu izgrađuje 2-metilbuta-1,3-dienska jedinica koja se često naziva izoprenska jedinica (C_5), stoga je izopren (2-metilbuta-1,3-dien) osnovni strukturni element terpena. Dijele se na temelju broja n u općoj formuli $(C_5 H_8)n$ ili broja C-atoma na: semiterpene (C_5), monoterpene (C_{10}), seskviterpene (C_{15}), diterpene (C_{20}), sesterpene (C_{25}), triterpene (C_{30}), tetraterpene (C_{40}) i politerpene (> C_{40}). U prirodi su uglavnom ugljikovodici, alkoholi i njihovi glikozidi, eteri, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri. [35]



Slika 7. Izopren



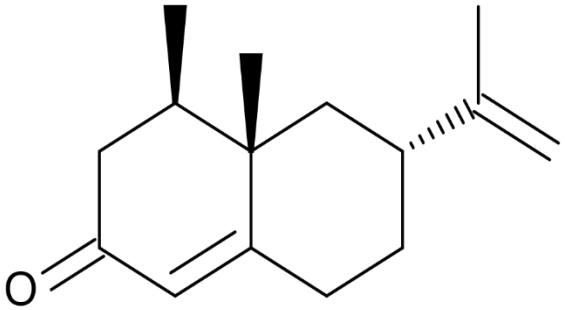
Slika 8. Izoprenska jedinica

SESKVITERPENI

Seskviterpeni su klasa terpena koja se sastoji od tri izoprenske jedinice i imaju molekulsku formulu $C_{15}H_{24}$. [34] Dolaze u višim frakcijama eteričnih ulja. Brojni seskviterpeni djeluju kao fitoaleksini, tj. antibiotski spojevi koje biljke proizvode kao odgovor na napade mikroorganizama. Nastaju iz zajedničkog prekursora, farnezil-pirofosfata te se dijele na acikličke, monocikličke i bicikličke. Najvažniji predstavnici acikličkih seskviterpena su farnezen i farnezol. Predstavnici monocikličkih seskviterpena su bisabolen i zinziberen, a bicikličkih kadinen. [35] Također bicikličkim seskviterpenima pripada i slabo istraženi nootkaton, najvažniji i najskuplji aromatik grejpa. [36]

1.5.1. Nootkaton

Nootkaton je biciklički seskviterpen i keton s molekulskom formulom $C_{15}H_{22}O$. Ranije se smatrao jednim od glavnih kemijskih sastojaka mirisa i okusa grejpa. [36] Također je sastavni dio biocida koji se koriste za ubijanje mrava, termita, komaraca, žohara i krpelja. Pronađen je u vrsti *Alpinia oxyphylla* koja se koristi u biljnoj istočnoazijskoj medicini. Nootkaton je kristalna kruta tvar pri uvjetima visoke čistoće. Može biti i bezbojna do žuta tekućina. Temperatura taljenja nootkatona je 36 ºC, a temperatura vrenja 170 ºC. Netopljiv je u vodi, a topljiv u organskim otapalima (etanolu, diklorometanu, etil-acetatu, itd.). Sirovi ekstrakti su tekući, viskozni i žuti. Obično se ekstrahira iz grejpa, ali može se proizvesti i s genetski modificiranim organizmima te kemijskom ili biokemijskom oksidacijom valencena. [37] Identificiran je kao bioaktivni spoj sa širokim rasponom korisnih primjena. Jedna od prednosti korištenja nootkatona je zaštita pluća. Može zaštititi pluća od ozljeda izazvanih udisanjem ispušnih plinova, uključujući promjene u funkciji pluća, upale i oksidativni stres. [38] Osim u soku grejpa, nalazi se i u uljima limuna, limete, naranče i mandarina. Pojavljuje se u vrstama cedrovine i nekim vrstama trava. Potencijal nootkatona da proizvodi toksične učinke na ljude nije proučen. [37]



Slika 9. Nootkaton



Slika 10. Kristali nootkatona

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. STANIČNE LINIJE

Stanična linija je populacija stanica koja se uzgaja u kontroliranim uvjetima, uglavnom izvan svog prirodnog okruženja. U osnovi, stanična kultura uključuje raspodjelu stanica u umjetnom okruženju. Nakon što su stanice od interesa izolirane iz živog tkiva, one se mogu naknadno održavati u pažljivo kontroliranim uvjetima koji se razlikuju za svaku vrstu stanice, ali obično se sastoje od prikladne posude sa supstratom ili medijem koji opskrbljuje stanice bitnim hranjivim tvarima kao što su aminokiseline, ugljikohidrati, vitamini, minerali, faktori rasta, hormoni te plinovi poput CO_2 i O_2. Takvi uvjeti omogućavaju stanicama rast i proliferaciju. Osim hranjivih tvari potrebno je dodati pufere te kontrolirati osmotski tlak i temperaturu. Kada se govori o staničnim linijama, tada se misli na stanice dobivene iz višestaničnih eukariotskih organizama (životinja, biljaka, gljiva i mikroba). [39]

Dok se komadići tkiva mogu staviti u odgovarajuću kulturu da bi se proizvele stanice koje se zatim mogu upotrijebiti za tu kulturu (eksplicitna kultura), stanice iz tkiva mogu se dobiti enzimatskim reakcijama. Ovdje se takvi enzimi kao tripsin koriste za razgradnju tkiva i oslobađanje željenih stanica. Kada su stanice dobivene izravno iz tkiva životinja (ili čak biljnog tkiva) enzimatskim ili mehaničkim tehnikama, takve se stanice nazivaju primarnim stanicama. Stanična kultura je važna tehnika u staničnoj i molekularnoj biologiji s obzirom da pruža najbolju platformu za proučavanje normalne fiziologije i biokemije stanica. [40]

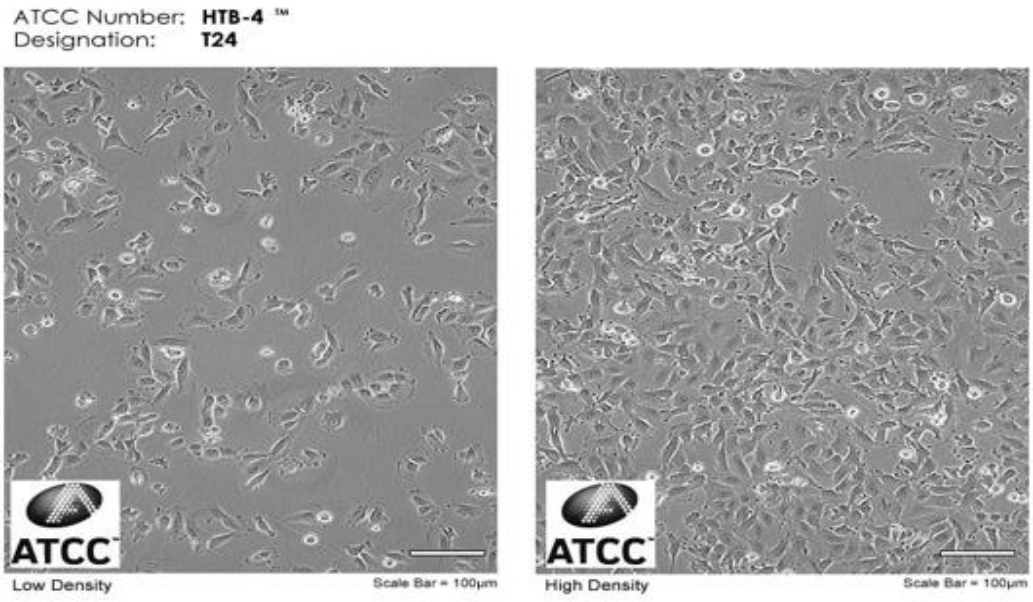


Slika 11. Stanična kultura u Petrijevoj zdjelici

2.1.1. Stanične linije A549 i T24

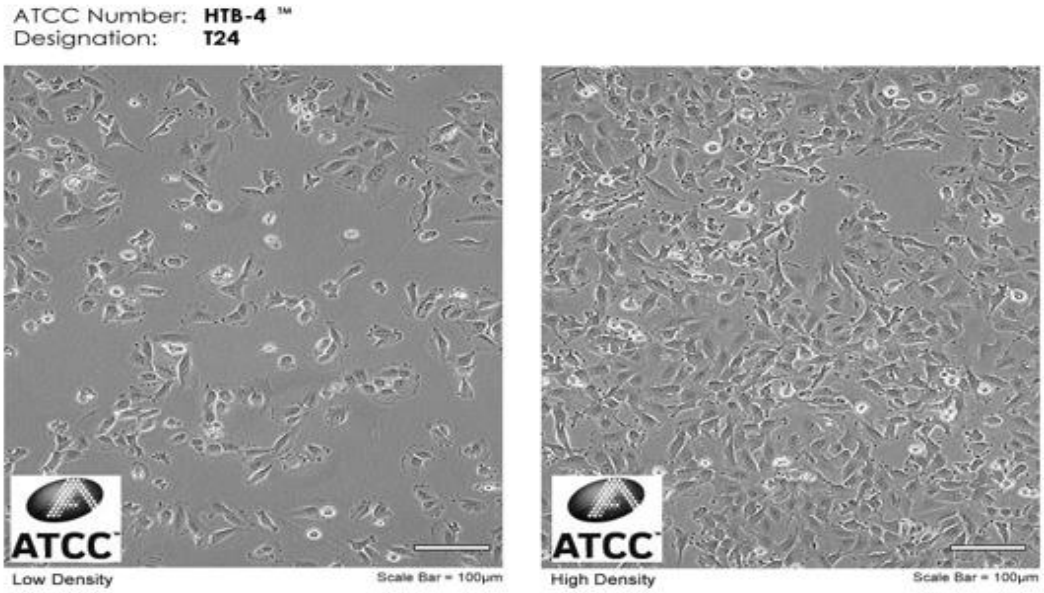
U *in vitro* istraživanju, ispitivanje antiproliferativnog djelovanja nootkatona se provodilo na stanicama raka A549 i T24.

Stanične linije A549 se nalaze u plućnom tkivu te su odgovorne za difuziju nekih tvari, poput vode i elektrolita, preko alveola. Ako se uzgajaju *in vitro*, rastu kao sloj; ljepljiv ili pričvršćen za podlogu medija u kojem se uzgajaju. Kada se dovoljno uzgajaju u staničnoj kulturi, mogu se početi diferencirati. Stanične linije A549 poslužile su u istraživanju metaboličke obrade plućnog tkiva. U kontekstu razvoja lijekova protiv raka pluća, koriste se kao ispitna mjesta za nove lijekove te se također koriste u virusnim istraživanjima i promjenama ekspresije proteina kao posljedice virusne infekcije. [41]



Slika 12. Mikroskopski prikaz stanične linije A549 raka pluća

Stanične linije T24 potječu iz karcinoma mokraćnog mjehura označenog T24. Neophodne su u osnovnim i kliničkim istraživanjima. Općenito, molekularna karakterizacija T24 staničnih linija otkrila je da većina genetskih aberacija koje se nalaze u tim staničnim linijama nalikuje onima izvornog tumora. Ova stanična linija je primarno adherentna linija i zahtijeva površinu na koju se može vezati za svoj rast i razvoj. [42]



Slika 13. Mikroskopski prikaz stanične linije T24 raka mokraćnog mjehura

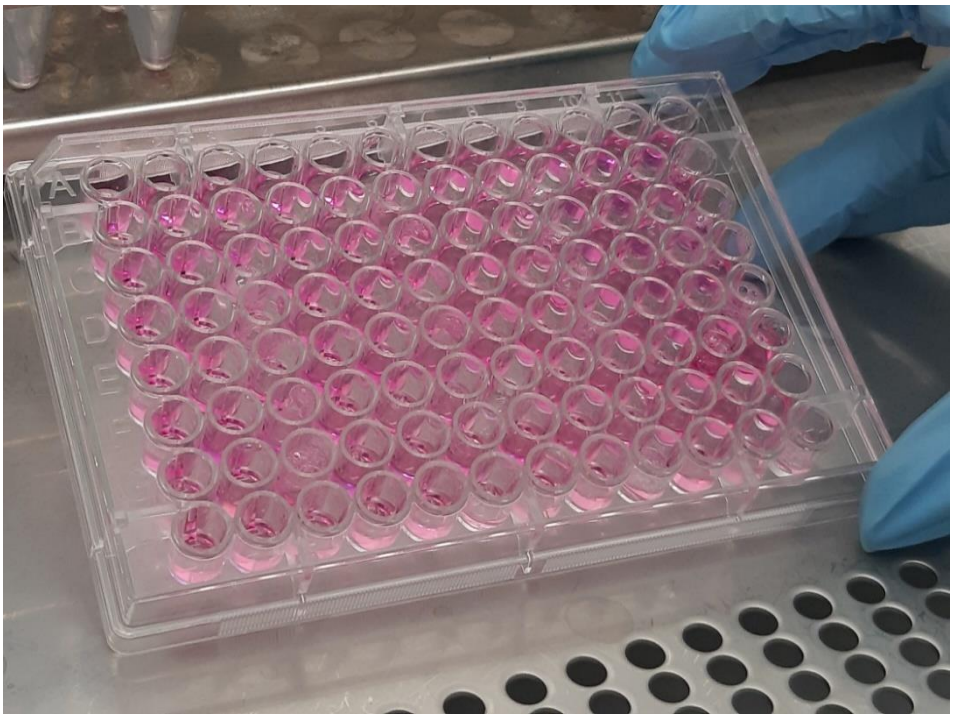
Stanice se čuvaju u inkubatoru na temperaturi od 37 ºC sa zasićenjem od 5% s CO_2 kako bi se održala pH vrijednost koja mora biti niža kako bi stanice mogle rasti. Uzgajaju se u navedenom mediju do približno 80% konfluentnosti nakon čega se tretiraju mikotoksinima kako bi ih presadili. Tijekom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom bez kalcijevih i magnezijevih iona (PBS, pH=7,4) i tretiraju tripsinom (EDTA) koji kida peptidne veze što vidimo pod mikroskopom te se stanice resuspendiraju u novom mediju. [43]

2.2. MTT-TEST

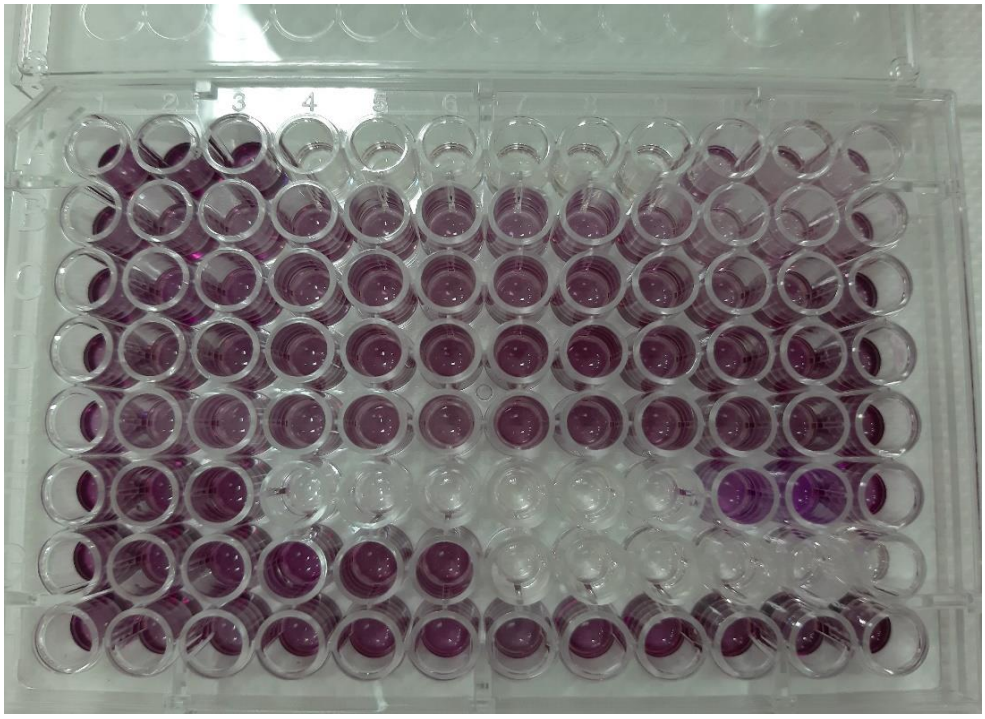
MTT-test se koristi za mjerenje stanične metaboličke aktivnosti kao pokazatelja vitalnosti, proliferacije i citotoksičnosti stanica. Razvijen je za pločicu sa 96 jažica. Ovo kolorimetrijsko ispitivanje temelji se na redukciji žute soli tetrazoliuma (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida ili MTT-a) u ljubičaste kristale formazana, pomoću metabolički aktivnih stanica. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Održive stanice sadrže enzime oksidoreduktaze ovisne o NAD(P)H koje reduciraju MTT do formazana. Prije mjerenja apsorbancije dobivenog ljubičastog formazana, a nakon ispiranja MTT-a, netopljivi kristali formazana otapaju se koristeći otopinu DMSO-a (dimetil sulfoksid) kako bi se izbjegle smetnje pri mjerenju. Rezultirajuća obojena otopina kvantificira se mjerenjem apsorbancije na 500-600 nm, ovisno o uvjetima testa. Što je otopina tamnija, to je veći broj održivih, metabolički aktivnih stanica. [44]

POSTUPAK

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 µl te se ostave u inkubatoru 24h. Sljedećeg dana se medij isisa iz jažica te se dodaju tri ponavljanja uzorka otopljenog u mediju za svaku koncentraciju na 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 µl MTT-a te se uzorak ponovno inkubira minimalno sat vremena. Nakon toga se MTT isisa iz jažica, otapa se u 50 µl DMSO-a (dimetil sulfoksid: zapaljiva, higroskopna tekućina, višenamjensko otapalo) te se izmjeri apsorbancija na 570 nm. Iz dobivenih rezultata izračunamo polovicu maksimalne inhibitorske koncentracije (IC_{50}) koja označava mjeru jačine tvari u inhibiranju specifične biološke ili biokemijske funkcije.



Slika 14. Otopina MTT-a prije dodatka DMSO-a



Slika 15. Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO-a u otopinu MTT-a

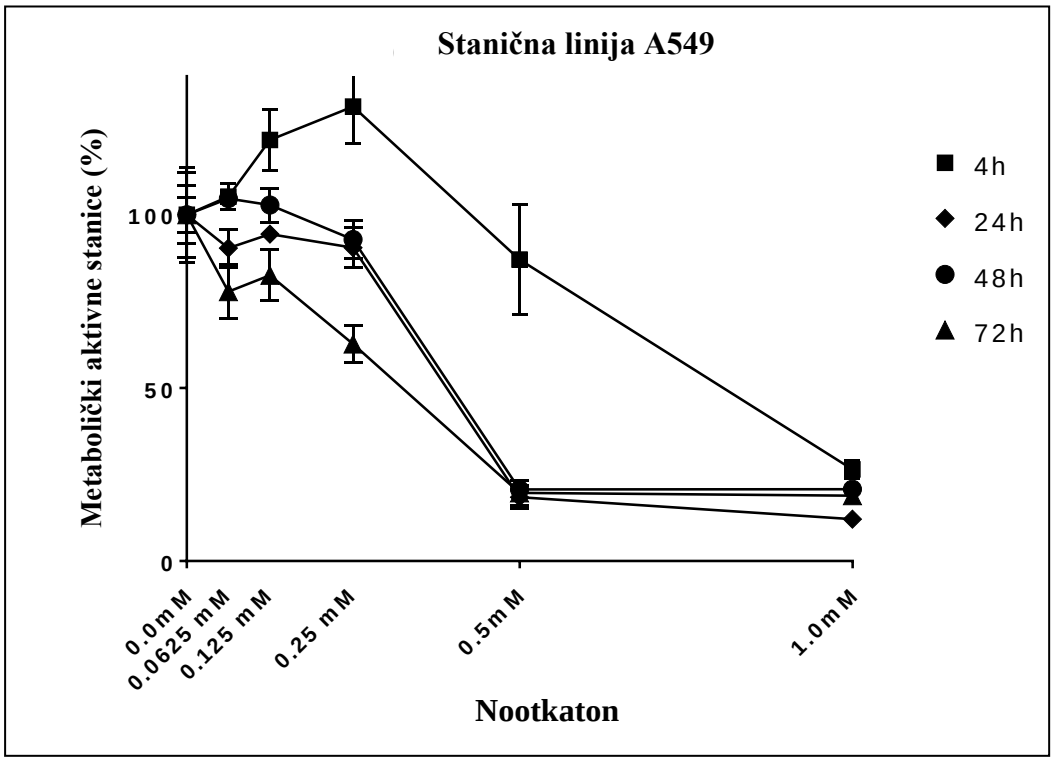
3. REZULTATI

Rezultati ispitivanja antiproliferativnog djelovanja bicikličkog seskviterpena nootkatona na stanične linije A549 raka pluća i T24 raka mokraćnog mjehura. Korištene koncentracije nootkatona su: 1,0 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM i 0,0625 mM. Izmjerena je apsorbancija na 570 nm.

ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE NOOTKATONA NA STANIČNU LINIJU A549 RAKA PLUĆA

Koncentracija	4h	24h	48h	72h
1,0 mM	14,40	10,53	13,89	11,73
0,5 mM	47,39	15,99	13,85	12,23
0,25 mM	71,42	78,58	62,13	38,95
0,125 mM	66,16	81,98	68,80	51,24
0,0625 mM	57,26	78,43	70,03	48,31

Tablica 2. Postotak preživjelih stanica u funkciji vremena

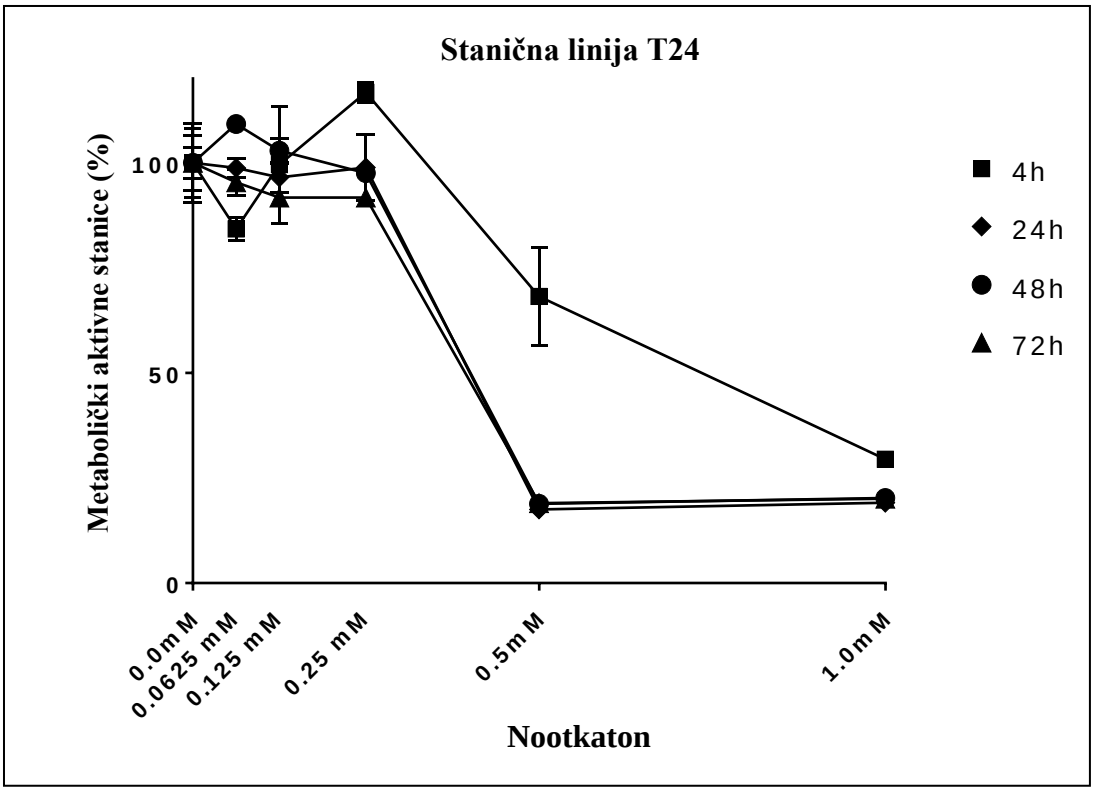


Slika 15. Djelovanje nootkatona na staničnu liniju A549 raka pluća

ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE NOOTKATONA NA STANIČNU LINIJU T24 RAKA MOKRAĆNOG MJEHURA

Koncentracija	4h	24h	48h	72h
1,0 mM	10,73	12,26	13,94	13,09
0,5 mM	24,86	11,26	13,00	12,39
0,25 mM	42,55	63,47	67,26	59,83
0,125 mM	36,29	61,95	70,93	59,83
0,0625 mM	30,71	63,39	75,31	62,22

Tablica 3. Postotak preživjelih stanica u funkciji vremena



Slika 16. Djelovanje nootkatona na staničnu liniju T24 raka mokraćnog mjehura

Tablica 4. IC_{50} VRIJEDNOST (stanična linija A549).

/	4h	24h	48h	72h
IC_{50}	1,731	0,413	0,518	0,286

Tablica 5. IC_{50} VRIJEDNOST (stanična linija T24)

/	4h	24h	48h	72h
IC_{50}	1,090	0,490	0,536	0,449

4. RASPRAVA

Rak pluća je bolest čiji se simptomi teško prepoznaju u najranijoj fazi jer ih gotovo ni nema. Ipak, razvojem i širenjem bolesti javljaju se sistemski predznaci kao što su gubitak apetita i opći umor. Osobe koje pripadaju rizičnoj skupini raka pluća su pušači, osobe izložene pasivnom pušenju, azbestu ili plinu radonu te one u čijoj su (osobito užoj) obitelji zabilježeni slučajevi karcinoma pluća jer tada postoji velika vjerojatnost od prisutnosti naslijeđenih onkogena (gena koji potiču rast tumorskih stanica). Mogućnost izlječenja i izbor terapije ovisi o stadiju raka, tj. da li je zahvatio samo pluća ili se proširio, veličini tumora, vrsti raka, postoje li simptomi te o općem zdravstvenom stanju bolesnika.

Rak mokraćnog mjehura najčešća je maligna bolest mokraćnog sustava. Ne predstavlja jednu, već spektar bolesti koje uključuju površinsku, invazivnu te metastatsku bolest od kojih svaka ima drugačije kliničko ponašanje, prognozu i liječenje. Preventivne mjere usmjerene su na prestanak pušenja. Veliki broj istraživanja ukazuje da pušači dva do tri puta češće obolijevaju nego nepušači.

Antiproliferativno djelovanje nootkatona na stanične linije raka pluća i raka mokraćnog mjehura ispitano je u ovisnosti različitih koncentracija o vremenu. Mjerenja su izvršena nakon 4, 24, 48 i 72 sata te je izračunata IC_{50} vrijednost, tj. koncentracija pri kojoj je postignuta 50%-tna smrtnost stanice. Dobivene IC_{50} vrijednosti u različitim vremenskim intervalima za staničnu liniju A549 su: 1,731 mM, 0,413 mM, 0,518 mM i 0,286 mM, a za staničnu liniju T24 raka mokraćnog mjehura su: 1,090 mM, 0,490 mM, 0,536 mM i 0,449 mM. Smanjenjem koncentracije, postotak preživjelih stanica raste, tj.smanjuje se antiproliferacijski učinak ispitivanih spojeva. Nootkaton je pokazao jači antiproliferacijski učinak na staničnu liniju A549 raka pluća.

5. ZAKLJUČAK

- MTT-test se koristi za mjerenje stanične metaboličke aktivnosti te ukazuje na status ukupne održivosti stanice.

- U ovom radu je ispitan antiproliferacijski učinak nootkatona na staničnu liniju A549 raka pluća i T24 raka mokraćnog mjehura

- Graf ovisnosti koncentracije i postotka preživjelih stanica u funkciji vremena prikazuje da nootkaton ima jači antiproliferacijski učinak na stanične linije A549 raka pluća.

- Nootkaton je pokazao dobar sveukupni antiproliferacijski učinak na dvije stanične linije raka.

6. LITERATURA

1. *M. Hejmadi,* Introduction to Cancer Biology, Bookboon, Frederiksberg, 2010, str. 6-73.

2. URL: http://www.zlpr.hr/o-raku/opcenito (5.8.2019.)

3. *G. M. Cooper, R. E. Hausman,* Stanica-molekularni pristup, Medicinska naklada, Zagreb, 2010, str. 725-729.

4. *R. W. Ruddon,* Cancer biology 4th Edition, Oxford University Press, New York, 2007, str. 21-26.

5. *S. Rajčević,* Diplomski rad, Medicinski fakultet, Zagreb, 2014.

6. *D. Schottenfeld, J. F. Fraumeni Jr,* Cancer Epidemiology and prevention 3th Edition, Oxford University Press, New York, 2006, str. 3.

7. URL: https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/hp-prevention-overview-pdq (6.8.2019.)

8. URL: http://www.onkologija.hr/simptomi-raka/ (6.8.2019.)

9. URL: https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/cancer/cancer/cancer-diagnosis.html (10.8.2019.)

10. URL: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types (10.8.)

11. *M. M. Russo, T. Sundaramurthi,* An overview of Cancer Pain: Epidemiology and Pathophysiology, Seminars in Oncology Nursing. **35** (2019) 223-228.

12. International Agency for Research on Cancer, World health organisation, Press release, Geneva, 2018.

13. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske, Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018.

14. *I. Đurđek,* Završni rad, Sveučilište Sjever, Varaždin, 2016.

15. URL: http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-pluca-i-disnih-putova/rak-pluca (18.8.2019.)

16. *K. S. Bilello, S. Murin, R. A. Matthay,* Epidemiology, etiology and prevention of lung cancer, Clinics in chest medicine. **23** (1, 2002) 1-25.

17. *Z. Kusić, A. Bolanča, A. Fröbe,* Onkologija za studente dentalne medicine, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, str. 63-64.

18. *J. Abraham, J. L. Gulley, C. J. Allegra,* The Bethesda Handbook of clinical oncology 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2014, str. 49-54.

19. *C. S. Dela Cruz, L. T. Tanoue, R. A. Matthay,* Lung Cancer: Epidemiology, Etiology and Prevention, Clinics in chest medicine. **32** (4, 2011) 605-644.

20. URL: https://hr.m.wikipedia.org/wiki/Rak_pluća (30.8.2019.)

21. URL: http://ordinacija.vecernji.hr/zdravlje/preventiva/rak-pluca-prevencija-simptomi-i-lijecenje/ (30.8.2019.)

22. *M. Jurić,* Diplomski rad, Medicinski fakultet, Zagreb, 2017.

23. *A. J. Alberg, M. V. Brock, J. G. Ford, J. M. Samet, S. D. Spivack,* Epidemiology of lung cancer, Diagnosis and menagement of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. **143** (5, 2013) e1S-e29S.

24. *Y. Mao, D. Yang, J. He, M. J. Krasna,* Epidemiology of lung cancer, Surgical Oncology clinics, **25** (3, 2016) 439-445.

25. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Bladder_cancer (8.9.2019.)

26. URL: https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/bladder-cancer/symptoms-causes/syc-20356104 (11.9.2019.)

27. URL: http://www.zzjzpgz.hr/nzl/102/mokraca.htm (11.9.2019.)

28. URL: http://ordinacija.vecernji.hr/baza-bolesti/bolest/rak-mjehura/ (13.9.2019.)

29. *M. Grasso,* Bladder cancer: a major public health issue, European urology supplements. **7** (7, 2008) 510-515.

30. URL: https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/bladder-cancer/diagnosis-treatment/drc-20356109 (13.9.2019.)

31. *Z. Kirkali, T. Chan, M. Manoharan, F. Algaba, C. Busch, L. Cheng, L. Kiemeney, M. Kriegmair, R. Montironi, W. M. Murphy, I. A. Sesterhenn, M. Tachibana, J. Weider,* Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading and diagnosis, Urology. **66** (6, 2005) 4-34.

32. *D. Šimunović, J. Galić, A.Tucak,* Pregled liječenja i epidemioloških obilježja u bolesnika liječenih zbog tumora mokraćnoga mjehura, pijelona i uretera u zadnjih 10 godina na Klinici za urologiju, Kliničke bolnice Osijek, Medicinski vjesnik. **37** (1-4, 2005) 63-66.

33. URL: https://www.roche.hr/hr/terapijska-podrucja/onkologija/rak-mokracnog-mjehura.html (15.9.2019.)

34. URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Terpeni (16.9.2019.)

35. *M. Subotić,* Završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.

36. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Nootkatone (16.9.2019.)

37. URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nootkatone#section=Overview (16.9.2019.)

38. *L. V. Mahn Hung, J. Y. Moon, J. Ryu, S. K. Cho,* . Nootkatone, an AMPK activator derived from grapefruit, inhibits KRAS downstream pathway and sensitizes non-small-cell lung cancer A549 cells to Adriamycin, Phytomedicine. **63** (2019) 1-9.

39. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture (17.9.2019.)

40. URL: https://www.microscopemaster.com/cell-culture.html (17.9.2019.)

41. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/A549_cell (18.9.2019

42. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5929350/ (19.9.2019.)

43. *L. Gućˊ,* Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018.

44. URL: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html (19.9.2019.)