

# GC-MS temeljna komparativna metabolomika dviju staničnih linija raka dojke tretiranih nootkatonom

---

Šunjerga, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:167:309494>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**GC-MS TEMELJENA KOMPARATIVNA  
METABOLOMIKA DVIJU STANIČNIH LINIJA RAKA  
DOJKE TRETIRANIH NOOTKATONOM**

**DIPLOMSKI RAD**

**ANTONIA ŠUNJERGA**

**Matični broj: 120**

**Split, listopad 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**  
**ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**GC-MS TEMELJENA KOMPARATIVNA**  
**METABOLOMIKA DVIJU STANIČNIH LINIJA RAKA**  
**DOJKE TRETIRANIH NOOTKATONOM**

**DIPLOMSKI RAD**

**ANTONIA ŠUNJERGA**

**Matični broj: 120**

**Split, listopad 2022.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**  
**ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**GC-MS BASED COMPARATIVE METABOLOMICS OF  
TWO BREAST CANCER CELL LINES TREATED WITH  
NOOTKATONE**

**DIPLOMA THESIS**

**ANTONIA ŠUNJERGA**

**Parent number: 120**

**Split, October 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij kemije, smjer: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mila Radan

### GC-MS TEMELJENA KOMPARATIVNA METABOLOMIKA DVIJU STANIČNIH LINIJA RAKA DOJKE TRETIRANIH NOOTKATONOM

Antonia Šunjerga, broj indeksa: 120

#### Sažetak:

Proliferacija, diferencijacija i preživljenje pojedinačne stanice u višestaničnom je organizmu pažljivo regulirano, dok u stanicama raka te regulacije nema, one nekontrolirano rastu i dijele se, šire po čitavom tijelu i ometaju funkciju normalnih tkiva i organa. Rak je vodeći uzrok smrti u svijetu. Najvažnije u patologiji raka jest razlikovati benigne (dobročudne) od malignih (zloćudnih) tumora. Drugi način klasifikacije je prema tipu stanica od kojih je rak sastavljen, prema čemu su glavne podvrste: karcinomi, sarkomi, limfomi, leukemije i mijelomi.

Rak dojke je vodeći uzrok smrti povezanih s rakom među ženama. Većina tumora dojke ima značajan broj receptora za estrogen, progesteron i humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2) te su klasificirani kao trostruko-pozitivni, odnosno trostruko-negativni. Liječenje može biti lokalno i sistemsko ili najčešće njihovom kombinacijom.

Stanična linija je skup stanica, odnosno trajno uspostavljena stanična kultura koja se uzgaja u odgovarajućem mediju u kojem će neograničeno proliferirati pri kontroliranim uvjetima. U ovom diplomskom radu korištene su dvije stanične linije raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7 te biciklički seskviterpen nootkaton. Njegovo antiproliferativno djelovanje na dvije stanične linije raka ispitano je u prethodnom istraživanju korištenjem MTT-testa kojim je dokazano da nootkaton ima dobar sveukupni antiproliferativni učinak. Metabolomika je proučavanje svih metabolita u stanici, tkivu ili organizmu. To uključuje identifikaciju i kvantifikaciju staničnih metabolita. Ovdje je upotrijebljen postupak koji se temelji na gašenju metabolizma stanica te sakupljanju i ekstrakciji metabolita. Primijenjen je na dvije stanične linije raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7 uz dodatak i bez dodatka nootkatona (kontrola). Uzeta je koncentracija nootkatona od 0,5 mmol/L pri kojoj je prethodnim korištenjem MTT-testa nootkaton uspješno ubio 50 % stanica. Nakon sakupljanja i ekstrakcije, metaboliti su analizirani GC-MS metodom koja im ujedno omogućava identifikaciju. Dobiveni su kromatogrami i tablice s određenim podacima te su uspoređene koncentracije identificiranih metabolita u dvije stanične linije raka dojke i zaključeno je do kojih je metaboličkih promjena došlo.

**Ključne riječi:** rak, rak dojke, stanična linija, MTT-test, MDA-MB-231, MCF-7, nootkaton, GC-MS

**Rad sadrži:** 85 stranica, 32 slike, 7 tablica, 160 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

|                                       |                                  |             |
|---------------------------------------|----------------------------------|-------------|
| <b>Sastav Povjerenstva za obranu:</b> | 1. Prof. dr. sc. Mladen Miloš    | predsjednik |
|                                       | 2. Doc. dr. sc. Marina Zekić     | član        |
|                                       | 3. Izv. prof. dr. sc. Mila Radan | član-mentor |

**Datum obrane:** 14. listopada 2022.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### DIPLOMA THESIS

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

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 25.

**Mentor:** Mila Radan, PhD, associate professor

### GC-MS BASED COMPARATIVE METABOLOMICS OF TWO BREAST CANCER CELL LINES TREATED WITH NOOTKATONE

Antonia Šunjerga, index number: 120

#### Abstract:

Proliferation, differentiation and survival of individual cells in a multicellular organism is carefully regulated, while in cancer cells there is no such regulation, they grow and divide uncontrollably, spread throughout the body and interfere with the function of normal tissues and organs. Cancer is the leading cause of death in the world. The most important thing in cancer pathology is to distinguish between benign and malignant tumors. Another way of classification is according to the type of cells from which the cancer is composed, according to which the main subtypes are carcinomas, sarcomas, lymphomas, leukemias and myelomas.

Breast cancer is the leading cause of cancer-related deaths among women. Most breast tumors have a significant number of receptors for estrogen, progesterone and human epidermal growth factor 2 (HER2) and are classified as triple-positive or triple-negative. Treatment can be local or systemic or most often a combination of them.

Cell line is a set of cells that is permanently established cell culture grown in a suitable medium in which it will proliferate indefinitely under controlled conditions. Two breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MCF-7, and the bicyclic sesquiterpene nootkatone were used in this diploma thesis. Its antiproliferative activity on two cancer cell lines was investigated in previous research using the MTT-assay, which proved that nootkatone has a good overall antiproliferative effect. Metabolomics is the study of all metabolites in a cell, tissue or organism. This includes the identification and quantification of cellular metabolites. Here, a procedure based on quenching of cells, harvesting and extraction of metabolites was used. It was applied on two breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MCF-7 with and without the addition of nootkatone (control). Nootkatone concentration of 0,5 mmol/L was taken, at which nootkatone successfully killed 50 % of the cells by previous use of the MTT-assay. After harvesting and extraction, the metabolites were analyzed by the GC-MS method, which also enables their identification. Chromatograms and tables with specific data were obtained, the concentrations of identified metabolites in two breast cancer cell lines were compared and it is concluded which metabolic changes occurred.

**Key words:** cancer, breast cancer, cell line, MTT-assay, MDA-MB-231, MCF-7, nootkatone, GC-MS

**Thesis contains:** 85 pages, 32 pictures, 7 tables, 160 literary references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Mladen Miloš, PhD, full professor      | chair person |
| 2. Marina Zekić, PhD, assistant professor | member       |
| 3. Mila Radan, PhD, associate professor   | supervisor   |

**Defence date:** October 14<sup>th</sup>, 2022.

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

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mile Radan u razdoblju od svibnja do prosinca 2021. godine.*



*Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Mili Radan na velikoj pomoći i podršci pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala Vam na savjetima, strpljenju i ukazanom povjerenju. Hvala Vam na prenesenom znanju i neizmjernej motivaciji. Najviše Vam se zahvaljujem na pozitivnoj energiji, divnom pristupu i lijepim riječima. Naučili ste me da vjerujem u sebe i svoj uspjeh.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj majci na uloženom trudu, ljubavi i vjeri u mene. Hvala ti što si mi omogućila školovanje i bila uz mene u svakom trenutku. Ovo je naš zajednički uspjeh.*

*Također se zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama s kojima sam dijelila studentske dane. Hvala na razumijevanju, smijehu i potpori tijekom studiranja. Uz vas je studiranje bilo puno lakše i ljepše.*

*Antonia Šunjerga*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Čuvanje i priprema MDA-MB-231 i MCF-7 staničnih linija raka dojke
- Razvoj postupka temeljenog na gašenju metabolizma stanica te sakupljanju i ekstrakciji metabolita
- Primjena postupka na prethodno spomenute stanične linije raka dojke uz dodatak bicikličkog seskviterpena nootkatona i bez njegovog dodatka (kontrola)
- Ispitati koji je utjecaj nootkatona koncentracije 0,5 mmol/L pri kojoj je nootkaton u mom prethodnom istraživanju uspješno ubio 50 % stanica, korištenjem MTT-testa te što se na nivou MTT-testa dogodilo u metabolizmu stanica
- Nakon sakupljanja i ekstrakcije, analizirati metabolite korištenjem vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) koji im omogućava razdvajanje i identifikaciju
- Obrada dobivenih kromatograma iz kojih je vidljivo da ove dvije stanične linije imaju različite metaboličke profile
- Napraviti tablicu za svaku staničnu liniju, tablica mora uključivati rezultate GC-MS analize (retencijsko vrijeme, koncentracije metabolita u kontroli i u tretiranim stanicama, omjer promjene)
- Usporediti razlike unutar istih te razlike unutar različitih staničnih linija
- Predložiti na koje je metaboličke putove nootkaton najvjerojatnije izvršio utjecaj
- Na osnovu svih podataka donijeti zaključak diplomskog rada

## SAŽETAK

Proliferacija, diferencijacija i preživljenje pojedinačne stanice u višestaničnom je organizmu pažljivo regulirano, dok u stanicama raka te regulacije nema, one nekontrolirano rastu i dijele se, šire po čitavom tijelu i ometaju funkciju normalnih tkiva i organa. Rak je vodeći uzrok smrti u svijetu. Najvažnije u patologiji raka jest razlikovati benigne (dobročudne) od malignih (zloćudnih) tumora. Drugi način klasifikacije je prema tipu stanica od kojih je rak sastavljen, prema čemu su glavne podvrste: karcinomi, sarkomi, limfomi, leukemije i mijelomi.

Rak dojke je vodeći uzrok smrti povezanih s rakom među ženama. Većina tumora dojke ima značajan broj receptora za estrogen, progesteron i humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2) te su klasificirani kao trostruko-pozitivni, odnosno trostruko-negativni. Liječenje može biti lokalno i sistemsko ili najčešće njihovom kombinacijom.

Stanična linija je skup stanica, odnosno trajno uspostavljena stanična kultura koja se uzgaja u odgovarajućem mediju u kojem će neograničeno proliferirati pri kontroliranim uvjetima. U ovom diplomskom radu korištene su dvije stanične linije raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7 te biciklički seskviterpen nootkaton. Njegovo antiproliferativno djelovanje na dvije stanične linije raka ispitano je u prethodnom istraživanju korištenjem MTT-testa kojim je dokazano da nootkaton ima dobar sveukupni antiproliferativni učinak. Metabolomika je proučavanje svih metabolita u stanici, tkivu ili organizmu. To uključuje identifikaciju i kvantifikaciju staničnih metabolita. Ovdje je upotrijebljen postupak koji se temelji na gašenju metabolizma stanica te sakupljanju i ekstrakciji metabolita. Primijenjen je na dvije stanične linije raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7 uz dodatak i bez dodatka nootkatona (kontrola). Uzeta je koncentracija nootkatona od 0,5 mmol/L pri kojoj je prethodnim korištenjem MTT-testa nootkaton uspješno ubio 50 % stanica. Nakon sakupljanja i ekstrakcije, metaboliti su analizirani GC-MS metodom koja im ujedno omogućava identifikaciju. Dobiveni su kromatogrami i tablice s određenim podacima te su uspoređene koncentracije identificiranih metabolita u dvije stanične linije raka dojke i zaključeno je do kojih je metaboličkih promjena došlo.

**Ključne riječi:** rak, rak dojke, stanična linija, MTT-test, MDA-MB-231, MCF-7, nootkaton, GC-MS

## SUMMARY

Proliferation, differentiation and survival of individual cells in a multicellular organism is carefully regulated, while in cancer cells there is no such regulation, they grow and divide uncontrollably, spread throughout the body and interfere with the function of normal tissues and organs. Cancer is the leading cause of death in the world. The most important thing in cancer pathology is to distinguish between benign and malignant tumors. Another way of classification is according to the type of cells from which the cancer is composed, according to which the main subtypes are carcinomas, sarcomas, lymphomas, leukemias and myelomas.

Breast cancer is the leading cause of cancer-related deaths among women. Most breast tumors have a significant number of receptors for estrogen, progesterone and human epidermal growth factor 2 (HER2) and are classified as triple-positive or triple-negative. Treatment can be local or systemic or most often a combination of them.

Cell line is a set of cells that is permanently established cell culture grown in a suitable medium in which it will proliferate indefinitely under controlled conditions. Two breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MCF-7, and the bicyclic sesquiterpene nootkatone were used in this diploma thesis. Its antiproliferative activity on two cancer cell lines was investigated in previous research using the MTT-assay, which proved that nootkatone has a good overall antiproliferative effect. Metabolomics is the study of all metabolites in a cell, tissue or organism. This includes the identification and quantification of cellular metabolites. Here, a procedure based on quenching the metabolism of cells, harvesting and extraction of metabolites was used. It was applied on two breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MCF-7 with and without the addition of nootkatone (control). Nootkatone concentration of 0,5 mmol/L was taken, at which nootkatone successfully killed 50 % of the cells by previous use of the MTT-assay. After harvesting and extraction, the metabolites were analyzed by the GC-MS method, which also enables their identification. Chromatograms and tables with specific data were obtained, the concentrations of identified metabolites in two breast cancer cell lines were compared and it is concluded which metabolic changes occurred.

**Key words:** cancer, breast cancer, cell line, MTT-assay, MDA-MB-231, MCF-7, nootkatone, GC-MS

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| UVOD .....  | 1  |
| 1. OPĆI DIO .....                                       | 2  |
| 1.1. Rak .....  | 3  |
| 1.1.1. Vrste raka.....                                  | 4  |
| 1.1.2. Nastanak raka (karcinogeneza).....               | 6  |
| 1.1.3. Uzroci nastanka raka (etiologija).....           | 9  |
| 1.1.4. Simptomi, dijagnoza i liječenje raka .....       | 10 |
| 1.1.5. Epidemiologija raka.....                         | 12 |
| 1.2. Rak dojke .....                                    | 14 |
| 1.2.1. Vrste raka dojke.....                            | 15 |
| 1.2.2. Uzroci nastanka raka dojke (etiologija).....     | 17 |
| 1.2.3. Uloga gena u raku dojke.....                     | 18 |
| 1.2.4. Simptomi, dijagnoza i liječenje raka dojke ..... | 21 |
| 1.2.5. Epidemiologija raka dojke.....                   | 22 |
| 1.3. Klasifikacija zloćudnih tumora .....               | 23 |
| 1.3.1. TNM klasifikacija raka dojke .....               | 24 |
| 1.4. Stanične linije.....                               | 25 |
| 1.4.1. Uzgoj staničnih linija u kulturi stanica.....    | 26 |
| 1.4.2. Stanična linija MDA-MB-231 .....                 | 27 |
| 1.4.3. Stanična linija MCF-7 .....                      | 29 |
| 1.4.4. Prijelaz iz normalnih u tumorske stanice.....    | 30 |
| 1.5. Ispitivani spoj .....                              | 31 |
| 1.5.1. Terpeni.....                                     | 31 |
| 1.5.2. Antikancerogeno djelovanje terpena .....         | 32 |
| 1.5.3. Nootkaton .....                                  | 33 |

|   |    |
|---|----|
| 1.5.4. Ispitivanje antiproliferativnog djelovanja spojeva .....             | 35 |
| 1.6. Metabolomika .....   | 36 |
| 1.6.1. Metabolomika u biološkom sustavu.....                                | 38 |
| 1.6.2. Definicija biomarkera .....  | 38 |
| 1.6.3. Identifikacija potencijalnog biomarkera.....                         | 39 |
| 1.6.4. Biomarkeri u istraživanju raka .....                                 | 40 |
| 1.6.5. Tumorski markeri raka dojke .....                                    | 41 |
| 1.6.6. Razvoj metabolomike u budućnosti .....                               | 43 |
| 1.7. Metabolizam stanica raka.....  | 44 |
| 1.7.1. Metabolički putovi u stanicama raka.....                             | 45 |
| 1.7.2. Metaboličke promjene kod raka dojke .....                            | 48 |
| 1.8. Analitičke metode u metabolomici .....                                 | 49 |
| 1.8.1. Kromatografija .....   | 49 |
| 1.8.2. Plinska kromatografija.....  | 50 |
| 1.8.3. Spektrometrija masa .....  | 51 |
| 1.8.4. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa.....        | 52 |
| 1.9. Primjena GC-MS metode u istraživanju raka .....                        | 53 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO .....  | 54 |
| 2.1. Čuvanje i priprema stanica.....  | 55 |
| 2.2. Ispitivanje antiproliferativnog djelovanja nootkatona .....            | 56 |
| 2.3. Gašenje metabolizma stanica, sakupljanje i ekstrakcija metabolita..... | 56 |
| 2.4. GC-MS analiza metabolita.....  | 60 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA.....  | 62 |
| 3.1. Rezultati GC-MS analize hlapljivih spojeva.....                        | 63 |
| 3.1.1. Rezultati GC-MS analize za staničnu liniju MDA-MB-231 .....          | 64 |
| 3.1.2. Rezultati GC-MS analize za staničnu liniju MCF-7.....                | 67 |
| 3.1.3. Usporedba rezultata za obje stanične linije .....                    | 70 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2. Utjecaj nootkatona na stanične linije raka dojke..... | 71 |
| 4. ZAKLJUČAK.....  | 72 |
| 5. LITERATURA .....  | 74 |

## UVOD

Rak je bolest koja nastaje zbog poremećaja proliferacije u nekim od tjelesnih stanica, pri čemu one nekontrolirano rastu i šire se na druge dijelove tijela. Vodeći je uzrok smrti u svijetu. Zdrave ljudske stanice rastu i razmnožavaju se kako bi formirale nove stanice koje tijelo treba. Ponekad ovakav proces krene krivim putem pa abnormalne ili oštećene stanice rastu i razmnožavaju se kada ne bi trebale. Taj suvišak stanica može formirati tumor. U patologiji raka važno je razlikovati benigne (dobročudne) od malignih (zloćudnih) tumora, a oni se klasificiraju prema tipu stanica iz kojih nastaju. Rak dojke je vrsta raka koja se češće javlja kod žena, nego kod muškaraca. Većina tumora dojke ima mnogo receptora za estrogen, progesteron i HER2 (engl. *human epidermal growth factor 2*) protein i tada su klasificirani kao trostruko-pozitivni tumori. Stanična linija je skup stanica, odnosno trajno uspostavljena stanična kultura koja se uzgaja u odgovarajućem mediju u kojem će neograničeno proliferirati pri kontroliranim uvjetima. U ovom radu su korištene dvije stanične linije raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7. Terpeni su većinom hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodnog mirisa čiji je skelet izveden iz izoprena. Ovdje je korišten biciklički seskviterpen nootkaton, jedan od glavnih sastojaka mirisa i okusa grejpa. Njegovo antiproliferativno djelovanje na dvije stanične linije raka ispitano je u mom prethodnom istraživanju korištenjem MTT-testa kojim je dokazano da nootkaton ima dobar sveukupni antiproliferativni učinak. Metabolomika je globalno istraživanje koje uključuje identifikaciju, kvalitativne i kvantitativne mjere metabolita koji sudjeluju u biokemijskim putovima. U ovom radu je korišten postupak temeljen na gašenju metabolizma stanica te sakupljanju i ekstrakciji metabolita. Postupak je primijenjen na dvije stanične linije raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7 uz dodatak i bez dodatka nootkatona (kontrola). Uzeta je koncentracija nootkatona od 0,5 mmol/L pri kojoj je korištenjem MTT-testa nootkaton uspješno ubio 50 % stanica te se s tom koncentracijom tretiraju ove dvije stanične linije. Cilj eksperimenta je ispitati što se na nivou MTT-testa dogodilo u metabolizmu stanica pri toj istoj koncentraciji i koje će metaboličke promjene izazvati dodavanje nootkatona staničnim linijama te kako se stanice ponašaju bez njegovog dodatka. Nakon sakupljanja i ekstrakcije metabolita, slijedi njihova analiza GC-MS metodom koja omogućava razdvajanje i identifikaciju. Iz dobivenih rezultata koji se sastoje od kromatograma i tablica s odgovarajućim podacima (retencijsko vrijeme, koncentracije, omjer promjene) uspoređuje se koncentracija identificiranih metabolita u dvije stanične linije raka dojke te se ispituju nastale metaboličke promjene.<sup>1-8</sup>



## **1. OPĆI DIO**

## 1.1. Rak

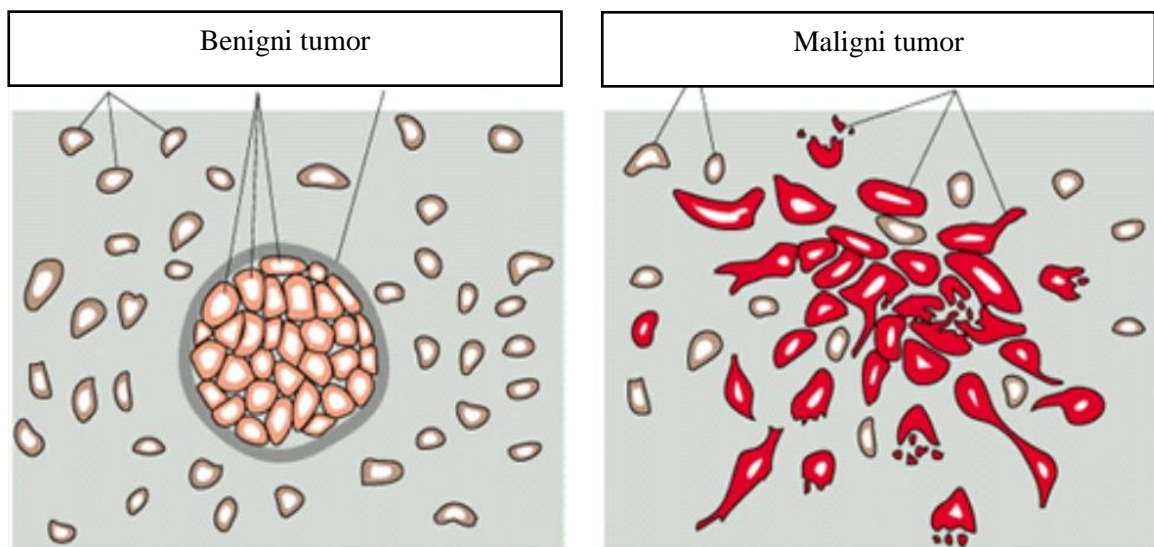
Proliferacija, diferencijacija i preživljavanje pojedinačne stanice u višestaničnom je organizmu pažljivo regulirano tako da zadovoljava interese organizma kao cjeline. U stanicama raka te regulacije nema, one nekontrolirano rastu i dijele se, šire po čitavom tijelu i ometaju funkciju normalnih tkiva i organa. Budući da rak nastaje zbog poremećaja temeljnih regulacijskih staničnih mehanizama, bolest treba razumjeti na molekularnoj i staničnoj razini. Istraživanja stanica raka razjasnila su mehanizme koji upravljaju ponašanjem normalnih stanica koje rastu i dijele se na kontrolirani način kako bi proizvele nove stanice koje tijelo treba za očuvanje zdravlja. U tom procesu, stare ili oštećene stanice odumiru i zamjenjuju se novima. Međutim, ponekad ovaj postupak krene krivim putem. Genetski materijal (DNA) stanice se ošteti ili promijeni, što rezultira mutacijama koje utječu na rast i diobu stanica. U tom slučaju stare stanice ne odumiru kada bi trebale, a nove stanice se stvaraju i kada tijelo nema potrebu za njima. Taj suvišak stanica može formirati čvrstu masu tkiva koju nazivamo tumor.<sup>1,9</sup>

Rak je vodeći uzrok smrti u ekonomski razvijenim državama i drugi uzrok smrti u državama u razvoju. Predstavlja skupinu bolesti kod viših višestaničnih organizama. Karakterizira ga promjena u ekspresiji gena koja dovodi do poremećaja u normalnom staničnom programu diobe stanica i stanične diferencijacije. Karakteristika koja razlikuje maligni (zloćudni) od benignog (dobročudnog) tumora je sposobnost da može napasti lokalno tkivo, odnosno proširiti se na regionalne limfne čvorove i metastazirati do udaljenih organa u tijelu. Općenito, maligni tumori uzrokuju značajan morbiditet i biti će smrtonosni ako se pacijent ne liječi. Međutim, postoje iznimke pri kojima tumori mogu ostati neotkriveni, omogućavajući domaćinu standardno očekivan životni vijek.<sup>10-12</sup>

Čimbenici koji uzrokuju rak su nasljedni ili okolišni. Postoji pet vodećih uzroka koji su odgovorni za 30 % smrti od raka u svijetu. Najčešći uzroci uključuju upotrebu duhana, visoki indeks tjelesne mase, manjak tjelesne aktivnosti, neadekvatan unos voća i povrća te konzumiranje alkohola. Liječenje raka jedna je od najkompleksnijih vrsta terapija u medicini. Kirurško liječenje, lijekovi (kemoterapija, ciljana terapija, imunoterapija, hormonska terapija) i radioterapija ubrajaju se u tri glavna načina liječenja. Razumijevanje uzroka raka te načina na koji djeluje, a posebno čimbenika koji potiču ili ometaju njegov rast, zahtijeva rješavanje složenih bioloških i medicinskih problema.<sup>13,14</sup>

### 1.1.1. Vrste raka

Najvažnije u patologiji raka jest razlikovati benigne (dobročudne) od malignih (zloćudnih) tumora. Na slici 1. je prikazano kako benigni tumori ostaju ograničeni na mjesto nastanka, dok su maligni tumori u stanju proširiti se na susjedna tkiva i čitavo tijelo preko krvožilnog ili limfnog sustava (metastaze). Rak nije jedinstvena bolest te postoji preko sto vrsta raka koje se uglavnom nazivaju prema organu ili tkivu iz kojeg rak potječe, primjerice: rak debelog crijeva potječe od stanica crijevne sluznice. Drugi način klasifikacije je prema tipu stanica od kojih je rak sastavljen, prema čemu su glavne podvrste: karcinomi, sarkomi, limfomi, leukemije i mijelomi.<sup>1,15</sup>



Slika 1. Benigni i maligni tumori

#### 1.1.1.1. Karcinom

Karcinom je najčešći tip raka. Nastaje iz epitelnih stanica koje pokrivaju vanjske i unutrašnje površine tijela, poput kože, pluća, dojke i crijeva. Postoji više tipova epitelnih stanica koje se mogu razlikovati pod mikroskopom pa se prema tome karcinomi mogu dodatno dijeliti na podskupine.<sup>15</sup>

- Adenokarcinom - nastaje u epitelnim stanicama koje proizvode tekućinu ili sluz. Tkiva s ovim tipom stanica ponekad se nazivaju žljezdanim tkivima. Najveći dio karcinoma dojke, crijeva i prostate su adenokarcinomi.

- Karcinom bazalnih stanica - rak koji započinje u donjem (bazalnom) sloju vanjskog sloja kože (epidermisa).
- Karcinom pločastih stanica - rak stanica koje se nalaze ispod vanjske površine kože, iznad bazalnih stanica. Pločaste stanice pokrivaju i mnoge druge unutarnje organe, poput želuca, crijeva, pluća, mjehura i bubrega.
- Karcinom prijelaznog epitela - nastaje od stanica urotela koje možemo naći u mokraćnom mjehuru, mokraćovodu i dijelu bubrega.<sup>15</sup>

### **1.1.1.2. Sarkom**

Sarkomi, rijetki u ljudi, solidni su tumori vezivnih tkiva, poput mišića, kosti, hrskavice i veziva u užem smislu. Grubo se dijele na sarkome kostiju te sarkome mekih tkiva (svi ostali).<sup>1,15</sup>

- Osteosarkom - najčešći maligni tumor kostiju. Specifično je agresivan i najčešće se javlja kod adolescenata i mladih.<sup>15</sup>
- Najčešći sarkomi mekih tkiva su: leiomiosarkom (sarkom mišićnog tkiva), Kaposijev sarkom (uzrokovan je HIV-om), maligni fibrozni histiocitom (proizlazi iz mekih tkiva i kosti) i liposarkom (sarkom masnih stanica).<sup>15-17</sup>

### **1.1.1.3. Limfom**

Limfom nastaje u limfnim čvorovima i stanicama imunološkog sustava koje se zovu limfociti (T ili B stanice). Oni su podvrsta bijelih krvnih stanica čija je glavna zadaća obrana organizma od bolesti. Kod limfoma, abnormalni limfociti se nakupljaju u limfnim čvorovima i žilama te drugim organima u tijelu. Dva su osnovna tipa limfoma: Hodgkinov limfom i ne-Hodgkinov limfom, a razlikuju se po izgledu i tipu zahvaćenih stanica.<sup>15</sup>

- Hodgkinov limfom – posljedica klonske pretvorbe stanica B-limfocitnog podrijetla od kojih nastaju velike binuklearne Reed-Sternbergove stanice. Uzrok je nepoznat, no veliku ulogu igraju nasljedna sklonost i okolišni čimbenici.<sup>18</sup>
- Ne-Hodgkinov limfom – može nastati iz oba tipa limfocita. U trenutku postavljanja dijagnoze obično je već jako proširen. Češći je od Hodgkinovog limfoma.<sup>19</sup>

#### **1.1.1.4. Leukemija**

Leukemija je rak tjelesnih krvotvornih tkiva, uključujući koštanu srž i limfni sustav. Nastaje u nezrelim krvnim stanicama koje rastu u koštanoj srži. One ne uzrokuju stvaranje solidnih nakupina, već nakupljanje abnormalnih stanica u krvi i koštanoj srži, čime oduzimaju prostor normalnim stanicama. Leukemija obično uključuje bijele krvne stanice koje su važne u borbi protiv infekcija. Liječenje može biti složeno, ovisno o vrsti leukemije i drugim čimbenicima. Četiri su osnovne vrste leukemije, a dijele se ovisno o brzini pogoršanja bolesti (akutne i kronične) te o tipu stanica u kojima leukemija nastaje (limfoblastična i mijeloidna).<sup>15,20</sup>

#### **1.1.1.5. Mijelom**

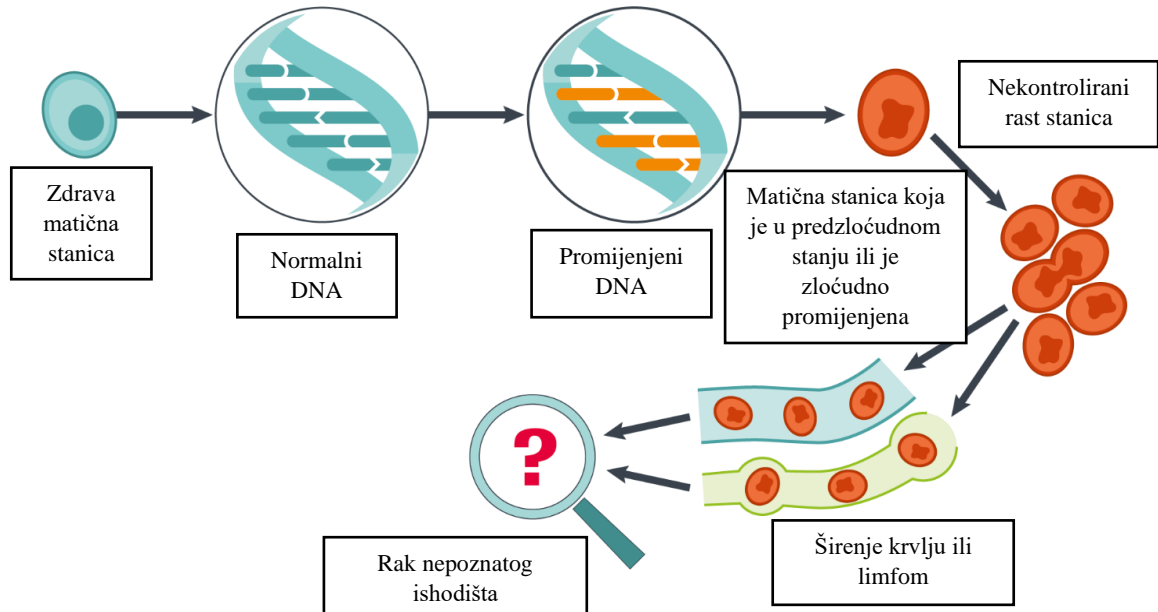
Multipli mijelom, poznat i kao mijelom, vrsta je karcinoma koštane srži koja se javlja u plazma stanicama, a one se normalno nalaze u koštanoj srži i dio su imunološkog sustava. Zdrave plazma stanice proizvode antitijela u borbi protiv infekcija. Za razliku od mnogih karcinoma, multipli mijelom ne postoji kao izraslina ili tumor, nego se mijelomske stanice dijele i šire unutar koštane srži. Uglavnom je ovaj tip raka neizlječiv, ali postoje razne vrste liječenja kojima se bolest može držati pod kontrolom.<sup>21</sup>

#### **1.1.2. Nastanak raka (karcinogeneza)**

Izloženost kemikalijama može imati različite učinke koji mogu uključivati i sam proces karcinogeneze. Tri su stupnja uključena te se definiraju kao inicijacija, promocija i progresija. Svaku od ovih faza karakteriziraju morfološke i biokemijske modifikacije nastale kao rezultati genetskih i/ili epigenetskih promjena. Genetske modifikacije uključuju mutacije u genima koji kontroliraju proliferaciju stanica, staničnu smrt i popravak DNA, tj. mutacije u protoonkogenima i tumor-supresorskim genima. Epigenetski čimbenici također pridonose karcinogenezi putem epigenetskih mehanizama koji utišavaju ekspresiju gena.<sup>22</sup>

Svaki put kada se stanica podijeli, pogreške nastale tijekom replikacije DNA govore da su nove mutacije uvedene u genom kćerinih stanica. Prirodne genetske/epigenetske promjene bilježe podrijetlo stanica u tumorima. Budući da većina kemijskih karcinogena (tvari koje uzrokuju rak) reagira s DNA i djeluje mutageno, interakcije s DNA smatraju se najznačajnijim reakcijama tih uzročnika sa staničnim makromolekulama.

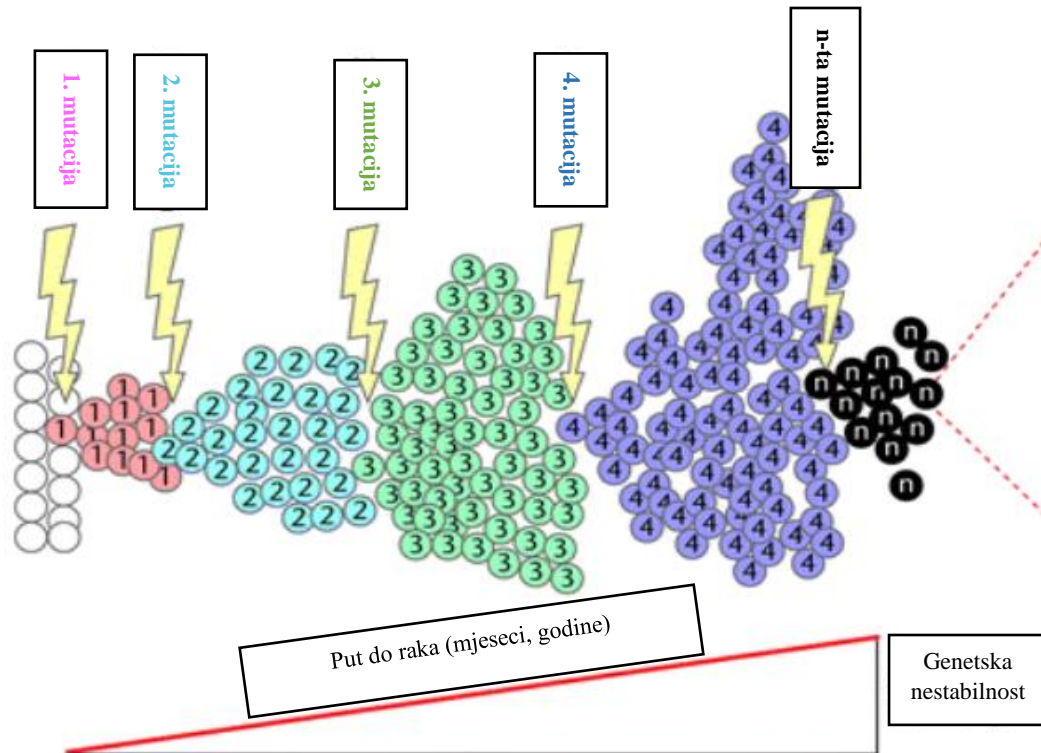
Takve reakcije objašnjavaju promjene u stanici, što dovodi do maligne transformacije (slika 2.).<sup>23,24</sup>



**Slika 2.** Transformacija zdrave stanice u stanice raka

Razvoj raka je višestupanjski proces. Inicijacija tumora je nepovratna promjena u somatskoj stanici. Te promjene nastaju spontano ili su izazvane izlaganjem karcinogenu. To se smatra prvim korakom karcinogeneze, gdje stanični genom prolazi mutacije, stvarajući potencijal za razvoj tumora. Sljedovi ljudske DNA odgovorni za transformaciju nazivaju se onkogeni. Mnogi aktivni onkogeni su izolirani molekularnim kloniranjem, primjerice, ljudski karcinom mokraćnog mjehura, Burkittov limfom, karcinom pluća i drugi. Mutacije tumorskih gena mogu imati velike učinke na stanično ponašanje te dovesti do poremećaja regulacije gena koji sudjeluju u biokemijskim signalnim putovima povezanim s kontrolom proliferacije stanica ili stanične komunikacije, razvoja i diferencijacije. Iako inicirajuća mutacija stvara potencijal za razvoj tumora, također zahtijeva interakciju s mutacijama gena koje nastaju kasnije. Naknadne promjene inicirane stanice koje dovode do neoplastične transformacije, mogu uključivati više od jednog koraka. Izražavanje inicirane mutacije neće ovisiti samo o interakciji s drugim mutacijama, nego i o čimbenicima koji mogu utjecati na ekspresiju gena, poput citokina, lipidnih metabolita i određenih forbol estera. Ovo može rezultirati povećanjem staničnog potencijala i/ili odvajanjem međustaničnih komunikacijskih procesa koji ograničavaju

staničnu autonomiju. Progresija tumora se nastavlja nakupljanjem dodatnih mutacija u populaciji tumorskih stanica (slika 3.). Neke od njih dovode do selektivne prednosti stanice u kojoj su se pojavile i njezini potomci s vremenom postaju dominantna populacija u tumoru.<sup>24</sup>



**Slika 3.** Nakupljanjem mutacija na putu do nastanka raka

Kontrola odgovora na karcinogenezu, primjenom nekoliko kemijskih, biokemijskih i bioloških tehnika, olakšava identifikaciju osnovnih mehanizama koji sudjeluju u razvoju tumora. Epidemiološka istraživanja i eksperimentalni testovi na laboratorijskim životinjama omogućuju identifikaciju kancerogenih spojeva, saznanja o mnogim aspektima karcinogeneze i uspostavljanje učinkovitih strategija za sprječavanje raka koji može nastati kao posljedica izloženosti kemikalijama.<sup>22</sup>

### 1.1.3. Uzroci nastanka raka (etiologija)

Jedan od najvažnijih ciljeva u biologiji raka je otkriti uzrok promjena u stanicama koje proizvedu rak. Kada bi se znao stvarni uzrok tih promjena, uslijedilo bi uklanjanje čimbenika koji ih izazivaju te bi došlo do razvoja učinkovitijih postupaka liječenja. Tada bi prevencija raka mogla postati stvarnost. Razvoj raka ima niz predvidivih svojstava. Stope učestalosti njegovih različitih vrsta usko su povezane s čimbenicima iz okoliša, poput virusnih, bakterijskih i parazitskih infekcija te načinom života. Rak ima određene karakteristike, među kojima su i sposobnosti nekontroliranog rasta, napada na okolna tkiva i metastaziranja. Tvari koje uzrokuju rak zovu se karcinogeni. Postoje brojni kemijski, fizički i virusni karcinogeni te mehanizmi koji mogu uzrokovati rak.<sup>12</sup>

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, brojni istraživači su pokušali procijeniti različite učinke na stopu obolijevanja i smrti uzrokovanih rakom. Ne postoji samo jedan uzrok, već ga stvara interakcija mnogih čimbenika. Uključeni čimbenici su genetski i okolišni ili mogu biti karakterizirani određenim značajkama pojedinca. Neki karcinomi, osobito u odraslih, povezani su s ponavljanim izlaganjem ili čimbenicima rizika. Sljedeći čimbenici i mehanizmi rizika predloženi su kao doprinos raku, a tu spadaju: način života, obiteljska povijest bolesti, genetički poremećaji, izloženost nekim virusima, čimbenici iz okoliša te neki oblici visoke doze kemoterapije i zračenja. Pušenje, alkohol, prehrana bogata mastima, dijeta i rad s otrovnim kemikalijama, primjeri su načina života koji predstavlja čimbenike rizika za neke vrste raka kod odraslih. Obiteljska povijest bolesti, nasljeđivanje i genetika mogu imati važnu ulogu kod raka u djece. Epidemiološka istraživanja je teško provesti zbog neadekvatnosti u procjeni izloženosti i čimbenicima, poput duhana, prehrane i geografske mobilnosti stanovništva. Ova jaka kancerogena sredstva mogu promijeniti stanicu i/ili imunološki sustav. Budući da se mnogi poznati uzroci raka mogu izbjeći, moguće je smanjiti stope incidencije nekih vrsta raka. Dokazano je da oko 30 % smrti od raka pada na korištenje duhana i 35 % na dijetalne faktore. Ostali uzročnici doprinose daleko manje. Smanjenje tjelesne aktivnosti, pojačano konzumiranje duhana, pretilost i izlaganje suncu, značajno su utjecali na povećanje stope incidencije od raka u svijetu. Očekivani životni vijek u industrijskim zemljama kontinuirano se produžuje i produživat će se sa smanjivanjem utjecaja štetnih čimbenika. Vrlo su važna daljnja istraživanja čimbenika koji mogu utjecati na nastanak raka jer će vjerojatno imati najveći utjecaj na strategije prevencije u budućnosti.<sup>25-27</sup>



#### 1.1.4. Simptomi, dijagnoza i liječenje raka

Rak može uzrokovati mnogo simptoma, no njih zapravo najčešće uzrokuju bolesti, ozljede, dobroćudni tumori ili drugi problemi. U slučaju pojave simptoma koji ne prestaju tjednima, potrebno se obratiti liječniku kako bi se mogli što prije dijagnosticirati i liječiti. Dolje su navedeni neki simptomi koje rak može uključivati.<sup>28</sup>

- Bol  
Ukoliko je riječ o raku kostiju, bol je česta od samog početka. Neki tumori na mozgu uzrokuju glavobolje koje traju danima i ne prestaju s liječenjem. Bol također može biti kasniji znak raka.
- Gubitak na težini  
Gotovo polovica ljudi koja boluje od raka počinje gubiti na težini. To je često jedan od znakova koji se brzo primijeti.
- Promjene na koži  
U slučaju pojave neobičnih ili novih madeža, kvrgi ili tragova na tijelu moguća je pojava raka kože. Također su moguće i druge vrste raka.<sup>29</sup>
- Umor  
U slučaju umora većeg nego inače, posebno u stresnom periodu te ako dolazi do problema sa spavanjem ili umora bez jasnog razloga, to bi mogao biti znak da nešto nije u redu te se potrebno obratiti liječniku.<sup>30</sup>
- Anemija  
Tijelo nema dovoljno crvenih krvnih stanica koje se stvaraju u koštanoj srži. Karcinomi poput leukemije, limfoma i multiplog mijeloma mogu oštetiti srž. Tumori koji se tamo šire s drugih mjesta mogli bi istisnuti redovite crvene krvne stanice.<sup>29</sup>

U današnje vrijeme postoji sve više saznanja o genotipskim, fenotipskim i metaboličkim razlikama između zdravog tkiva i tkiva koje rak napada te između indolentnog i agresivnog tumora. Povećavanje znanja o nasljednosti pojedinca te promjenama gena koji određuju osjetljivost na rak, ubrzati će ovo polje istraživanja i kliničku upotrebu. Štoviše, identifikacija biomarkera će dovesti do ranog otkrivanja malignih promjena u tkivu i olakšati nove strategije za ranije liječenje, a možda čak i za prevenciju rane maligne promjene prije nego što napreduje do potpuno razvijenog invazivnog karcinoma. Dijagnosticiranje raka u najranijim fazama često pruža najbolje šanse za izlječenje.

Postoji više metoda dijagnosticiranja, kao što je fizički pregled, snimanje, laboratorijski testovi, biopsija, operacija ili genetsko testiranje. Poznavanje vrste (tipa) raka pomaže liječniku odrediti koju je pretragu potrebno napraviti jer svaki rak ima poseban način rasta i širenja. Jednom kada se dijagnosticira, liječnik utvrđuje u kojem je stadiju te pomoću toga određuje mogućnosti liječenja i šanse preživljenja. Kod određenog broja pacijenata oboljelih od raka, dijagnostičkim se postupcima prije otkriju metastaze, nego izvor raka. Katkada se primarni rak ne može otkriti te se vrši biopsija metastaze i ispitivanje tkiva pod mikroskopom. Ako identifikacija primarnog tumora neće promijeniti program liječenja ili predviđeno preživljavanje, u takvom slučaju opsežno i dugotrajno traganje za primarnim tumorom nema svrhe.<sup>12,31,32</sup>

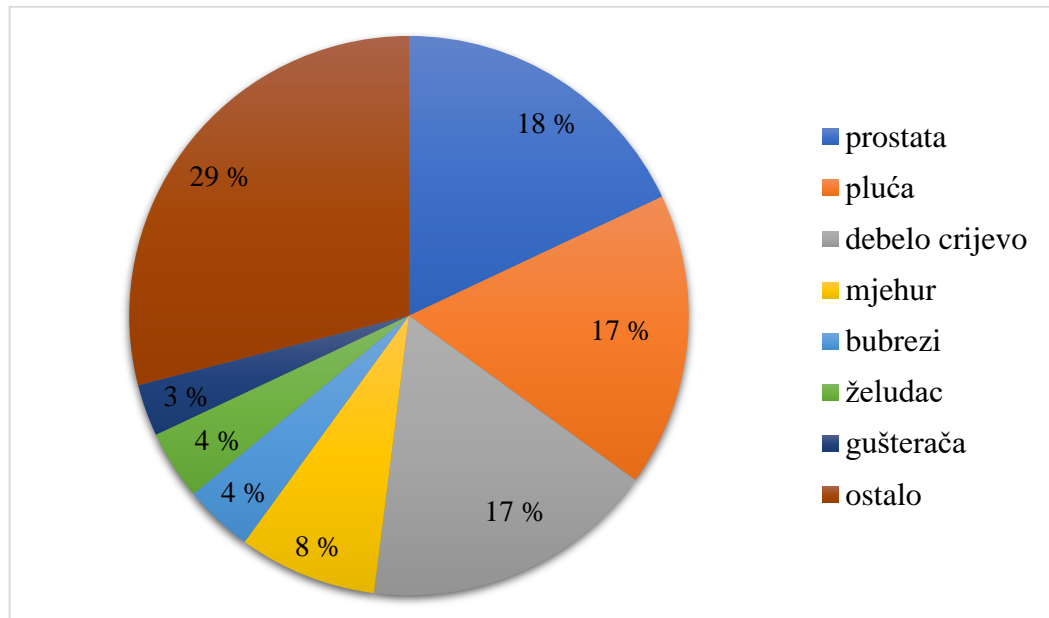
Rak je jedan od vodećih uzroka smrti u svijetu. Bilo koja vrsta liječenja može biti klinički važna za pacijente te bi se tako mogao smanjiti broj umrlih. Povijesni pristup liječenju raka zasnovan je na terapiji zračenjem koja cilja sve stanice unutar lokaliziranog mikrokoliša tumora ili kemoterapiji koja cilja rastuće stanice koje se dijele. Obje tradicionalne metode su grubi pristupi u ciljanju stanica raka. U ovim tretmanima se uništavaju i nekancerogene stanice. Postoji mogućnost da takve stanice steknu rezistenciju prema liječenju i u konačnici rezultiraju još agresivnijim rakom. Uz ove tradicionalne načine liječenja, pacijent obično ima ozbiljne nuspojave koje mogu uključivati bol, mučninu, gubitak kose, suhu kožu ili depresiju. Moguće su i druge vrste terapije, poput imunoterapije, ciljane terapije i hormonske terapije. Kod nekih se onkoloških pacijenata može primijeniti samo jedan od navedenih načina liječenja. Primjer može uključivati samo operaciju kod ranih stadija karcinoma probavnog trakta, samo kemoterapiju kod leukemija ili samo radioterapiju kod određenih stadija ginekoloških tumora. Zbog ograničenja i nedostataka korištenja samo jednog terapijskog protokola, u onkologiji je danas daleko češća primjena više vrsta liječenja, tzv. multimodalni terapijski pristup. Kombiniranjem više vrsta liječenja, postignut je najznačajniji napredak u tretmanu malignih tumora u zadnjih dvadeset godina. Ponekad se jedan protokol primjenjuje s ciljem potenciranja efekta drugog načina liječenja. Dva ili više načina liječenja mogu biti primijenjena s ciljem uništenja primarnog tumora i njegovih sekundarnih depozita. Onkološki tretman nosi određeni rizik od komplikacija i oštećenja. Komplikacije terapije često zahtijevaju dodatnu njegu i liječenje.<sup>33,34</sup>

### 1.1.5. Epidemiologija raka

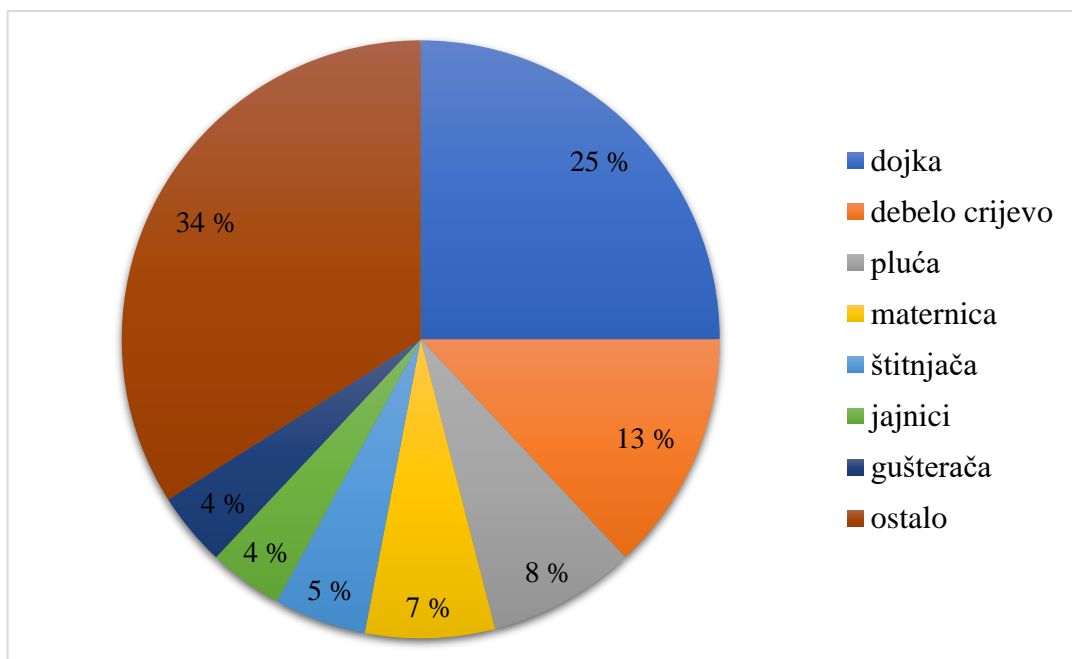
Rak je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu, u čak 70 % slučajeva. Najčešća obolijevanja uključuju: pluća, dojku, debelo crijevo i prostatu. Nekoliko vodećih uzroka predstavlja 30 % smrtnih slučajeva. Na upotrebu duhana otpada 22 % i ostalih 8 % se pripisuje visokom indeksu tjelesne mase, sjedilačkom načinu života, neadekvatnom unosu voća i povrća te upotrebi alkohola. Učestalost raka beznačajno je veća kod muškaraca (9,6 %), nego kod žena (8,6 %). Najveći broj slučajeva oboljelih od raka pronađen je kod osoba starijih od 60 godina. Najrasprostranjenije maligne bolesti koje se javljaju kod ispitanika starijih od 14 godina čine: leukemije (37 %), tumori mozga (16 %) i limfomi (13 %). U dobnom rasponu od 15 do 49 godina, rak dojke (13 %) najčešći je zloćudni tumor, a slijedi rak jetre (12 %) i pluća (9 %). U dobnom rasponu od 50 do 59 godina, rak pluća je najčešća zloćudna bolest (18 %), zatim rak jetre (11 %) i dojke (9 %), dok su najčešći zloćudni tumori u osoba starijih od 60 godina: rak pluća (21 %), kolorektalni rak (9 %), rak želuca (9 %) i rak jetre (9 %). U muškaraca su rak pluća i prostate najčešće dijagnosticirani, potom rak želuca i jetre. U žena, rak dojke daleko je najčešća vrsta raka, zatim rak pluća, cerviksa maternice i debelog crijeva. Općenito, rak pluća, jetre i želuca tri su najsmrtonosnije vrste raka kod opće populacije, dok su rak pluća i dojke najsmrtonosniji kod muškaraca, odnosno kod žena.<sup>13,35</sup>

Rak je značajan javnozdravstveni problem stanovništva Hrvatske. Drugi je vodeći uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila pa je vrlo važno raspolagati odgovarajućim podacima koji će pomoći u izradi strategije za prevenciju i odgovarajuću onkološku službu i zaštitu, kao i u izradi Nacionalne strategije za borbu protiv raka. Pet najčešćih vrsta raka čini ukupno 57 % novih slučajeva u muškaraca. Tome pripadaju: rak prostate (21 %), traheja, bronhi i pluća (16 %), kolona (9 %), rektuma (6 %) i mokraćnog mjehura (5 %). Pet najčešćih vrsta raka u žena, poput dojke (24 %), traheja, bronhi i pluća (9 %), kolona (8 %), tijela maternice (7 %) i štitnjače (5 %) čine 53 % novih slučajeva raka u žena. U Hrvatskoj je 2020. godine zabilježeno 25 000 slučajeva oboljelih od raka, od toga 13 499 oboljelih muškaraca i 11 502 oboljelih žena. Ukupna smrtnost od raka u Hrvatskoj među najvišima je u EU. Hrvatska je na petom mjestu, sa stopom smrtnosti (standardiziranoj prema dobi) od 324 smrtna slučaja uzrokovana rakom na 100 000 stanovnika 2020. godine, što je znatno iznad prosjeka EU-a koji iznosi 264 smrtna slučaja na 100 000 stanovnika.<sup>36,37</sup>

Na grafikonima 1. i 2. su prikazane najčešće dijagnosticirane vrste raka kod muškaraca, odnosno žena u Hrvatskoj (2020. godina).



**Grafikon 1.** Najčešće dijagnosticirane vrste raka kod muškaraca u Hrvatskoj (2020. godina)



**Grafikon 2.** Najčešće dijagnosticirane vrste raka kod žena u Hrvatskoj (2020. godina)

## 1.2. Rak dojke

Rak dojke je vodeći uzrok smrti povezanih s rakom među ženama. Većina tumora dojke ima značajan broj receptora za estrogen (engl. *estrogen receptor*, ER) ili progesteron (engl. *progesterone receptor*, PR) i klasificirani su kao hormon pozitivni receptori. Tumori dojke koji nemaju receptore za ta dva hormona ne reagiraju na hormonsku terapiju lijekovima, kao što je tamoksifen. Oko 20 % tumora dojke stvara velike količine proteina poznatog kao receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor 2*, HER2). Tumori koji su pozitivni, odnosno negativni na estrogen, progesteron i HER2 protein klasificirani su kao trostruko-pozitivni, odnosno trostruko-negativni. Kod tumora ovisnih o hormonima, dolaze u obzir različite strategije liječenja, poput operacije, zračenja, kemoterapije i hormonske terapije. Najrjeđi tipovi raka dojke upravo su oni koji su trostruko-negativni te su ujedno agresivni i najteži oblici za liječenje. Zbog razvoja novih terapijskih mogućnosti, iz kirurške i onkološke perspektive i s većim potencijalom oporavka, rak dojke jedan je od najčešće istraživanih zloćudnih tumora u posljednjih dvadeset godina.<sup>38,39</sup>

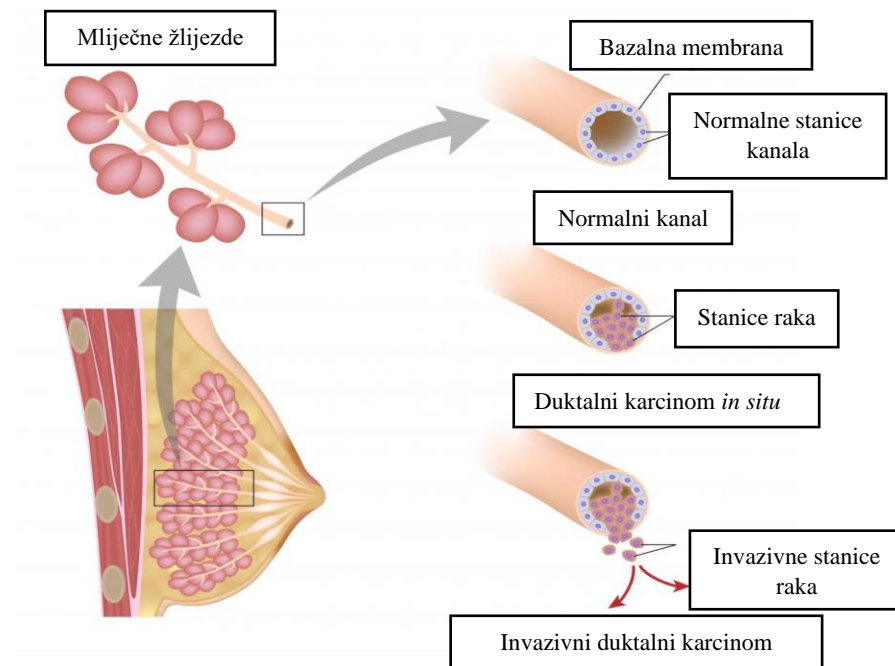
Rak dojke je metastatski rak, tj. može se proširiti u udaljene organe, poput kostiju, jetre, pluća i mozga. Rano dijagnosticiranje bolesti dovodi do bolje prognoze i visoke stope preživljavanja. Postoje brojni čimbenici rizika, kao što su: spol, starenje, obiteljska anamneza, mutacije gena ili nezdravi stil života te oni mogu povećati mogućnost razvoja raka. Broj slučajeva bolesti veći je kod žena, nego kod muškaraca. Otprilike 5-10 % žena s rakom dojke može imati specifične mutacije u pojedinačnim genima. Najčešće su mutacije gena 1 (engl. *breast cancer gene 1*, BRCA1) i gena 2 (engl. *breast cancer gene 2*, BRCA2) koji kodiraju tumor-supresorske proteine. Nedostatak BRCA1 gena dovodi do poremećaja regulacije staničnog ciklusa, abnormalnog umnožavanja centrosoma, genetske nestabilnosti i na kraju do apoptoze. Protein BRCA2 regulira rekombinacijski popravak DNA te tumori dojke povezani s ovim proteinom imaju tendenciju brzog širenja. Rizik od nastanka raka mogao bi se znatno povećati ako pojedinac naslijedi mutacije u BRCA1 i BRCA2 genima. Ukupno, oko 20-25 % nasljednih tumora dojke i 5-10 % svih tumora dojke uzrokovano je mutacijama u tim genima. Na rak dojke utječu i okolišni čimbenici. Štoviše, ako su žene educirane o raku dojke, samopregled dojki može biti jednostavna i ekonomična metoda za sprječavanje ove bolesti. Iako je postignut veliki napredak u prevenciji, još uvijek postoji nedostatak učinkovitih terapija. Stoga, treba usmjeriti više pažnje na prevenciju, prije nego dođe do kliničkog liječenja.<sup>40,41</sup>

### 1.2.1. Vrste raka dojke

Rak dojke je heterogena bolest koja se sastoji od više entiteta povezanih karakterističnim histološkim i biološkim značajkama. Globalne analize ekspresije gena korištenjem razvijene tehnologije objasnile su veliki dio te heterogenosti i dale uvid u klasifikaciju. Rak dojke potječe od epitelnih stanica koje oblažu terminalnu duktalno-lobularnu jedinicu. Karcinomi koji ostaju unutar bazalne membrane kanala klasificirani su kao *in situ* ili neinvazivni. Invazivni karcinom dojke je onaj u kojem postoji širenje stanica izvan bazalne membrane kanala i lobula u okolno tkivo. Neinvazivni (*in situ*) i invazivni karcinomi imaju svojstva prema kojima se mogu podijeliti na podtipove od kojih su najčešći duktalni i lobularni karcinom dojke.<sup>42-44</sup>

#### Neinvazivni (*in situ*) duktalni karcinom dojke

Karakteriziran je abnormalnim stanicama u mliječnom kanaliću u tkivu dojke (slika 4.). To je neinvazivni tip raka, što znači da se ne širi izvan mliječnog kanala, ali postoji mala mogućnost da postane invazivni tip. Uglavnom nema znakove i simptome pa se obično otkrije tijekom mamografskog pregleda. Uspješno se liječi, a ukoliko se ne liječi može postati invazivan i proširiti se na okolno tkivo dojke.<sup>45</sup>



**Slika 4.** Duktalni karcinom dojke (neinvazivni i invazivni)

### Neinvazivni (*in situ*) lobularni karcinom dojke

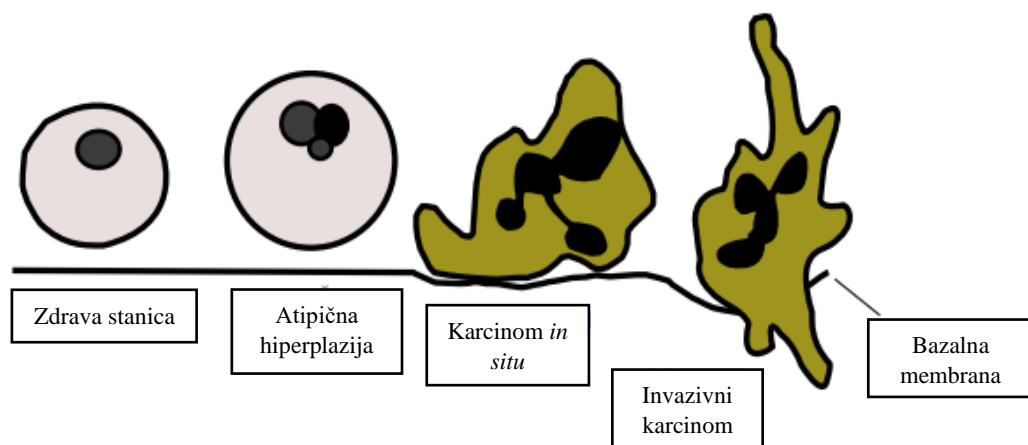
To je tip raka u kojem se stanice u režnjevima (lobulima) tkiva dojke nekontrolirano množe. Obično se ne vidi na mamografskom snimanju, nego se otkrije biopsijom dojke. Ne uzrokuje znakove i simptome, ali nakon otkrića biopsijom potrebni su redoviti kontrolni pregledi. Žene s ovom vrstom karcinoma dojke imaju povećani rizik za razvoj invazivnog karcinoma dojke.<sup>46</sup>

### Invazivni duktalni karcinom dojke

Duktalni karcinom čini 68 % svih karcinoma dojke i najčešću vrstu invazivnog karcinoma. Histološka slika ne odgovara nijednom posebnom tipu karcinoma dojke. Ovo je vrsta raka koja nastaje kada se abnormalne stanice prošire iz mliječnih kanalića u okolno tkivo dojke. Tumor se klinički prezentira u rasponu od nepalpabilnih lezija pa sve do velikih tumora koji uvlače ili ulceriraju kožu.<sup>47</sup>

### Invazivni lobularni karcinom dojke

Drugi je najčešći histološki podtip raka dojke i čini približno 10 % svih vrsta. Javlja se u mliječnim žlijezdama dojke odakle se zloćudne stanice šire u limfne čvorove i druge dijelove tijela. Iako ova vrsta karcinoma pokazuje značajke povezane s dobrom prognozom, neka istraživanja sugeriraju da bi svi dugoročni ishodi mogli biti gori od onih za invazivni duktalni karcinom.<sup>45,48</sup> Na slici 5. je prikazan put od zdrave stanice do invazivnog karcinoma.



**Slika 5.** Od zdrave stanice do invazivnog karcinoma, **1)** stanica nekontrolirano raste i dijeli se, **2)** atipična hiperplazija je prva uočljiva promjena koja upućuje na to da je započeo nekontrolirani rast stanica, **3)** karcinom *in situ*, još se ne širi, **4)** invazivni karcinom

### 1.2.2. Uzroci nastanka raka dojke (etiologija)

Epidemiološka su istraživanja utvrdila nekoliko rizičnih čimbenika za obolijevanje od raka dojke, poput dobi, nasljeđa, prehrane i načina života, tjelesne aktivnosti, socioekonomskog statusa te rase pripadnosti. Eksperimentalne i molekularno-genetičke studije su pokazale ulogu mutagenih činitelja, spolnih hormona, slobodnih radikala i onkogeni. Najčešći uzroci raka dojke mogu biti: dob (učestalost počinje rasti s dobi od 35-40 godina te raste s godinama), rana menstruacija i kasna menopauza, pozitivna obiteljska anamneza (mutacije gena BRCA1 i/ili BRCA2), uzimanje egzogenih hormona, povećana tjelesna težina (veća izloženost estrogenima), prehrana bogata mastima, ionizirajuće zračenje (osobito u mlađoj dobi od 40 godina), pušenje, alkohol i drugi.<sup>49-51</sup>

Incidencija raka dojke brzo raste s godinama (tijekom reproduktivnih godina), a zatim se sporije povećava. Postoje dokazi da što je žena starija kada započne menstruaciju, to će umanjiti rizik od nastanka bolesti. Kod žena koje u kasnoj dobi dožive menopauzu, veća je mogućnost nastanka raka dojke od onih kojima menstruacija prestane ranije. Do sada je utvrđeno da mutacije u BRCA1 i BRCA2 genima mogu povećati rizik od raka dojke, no čimbenici iz okoliša i način života uzroci su u više slučajeva, nego genetski čimbenici. Rizik od raka dojke povećan je za 25 % kod upotrebe oralnih kontraceptiva te se učinak ne razlikuje ovisno o vrsti estrogena ili progesterona. Razina učinka hormonalne terapije u menopauzi na rizik od raka dojke predmet je brojnih istraživanja. Epidemiološka istraživanja upućuju na značajnu ulogu prehrane u nastanku raka pa tako i raka dojke jer se hranom u organizam unose različiti karcinogeni u čijoj biotransformaciji sudjeluje masno tkivo. Dojka spada u tkiva koja su najosjetljivija na učinke ionizirajućeg zračenja koji su utvrđeni kod žena izloženih prije četrdesete godine. Podatci upućuju i na povezanost konzumiranja alkohola i obolijevanja od raka dojke, ali je povezanost relativno slaba, dok pušenje toliko ne utječe na rizik obolijevanja od raka dojke.<sup>49,52</sup>

Klasični čimbenici rizika za rak dojke, poput dobi ili rane menstruacije/kasne menopauze, nisu podložni promjeni u svrhu smanjenja rizika, dok drugi čimbenici, poput unosa alkohola, pušenja, pretilosti, mogu se promijeniti te time umanjiti rizik od obolijevanja. Prehrana i način života imaju važnu ulogu jer različiti sastojci hrane utječu na gensku kontrolu, izražavanje i aktivnost enzima koji metaboliziraju estrogene hormone te izvanjske karcinogene i potencijalne karcinogene. Općenito se prihvaća stajalište da je rak dojke multifaktorska bolest koja ovisi o interakciji izvanjskih (okolišnih) i unutarnjih (genskih, hormonskih i metaboličkih) činitelja.<sup>49</sup>

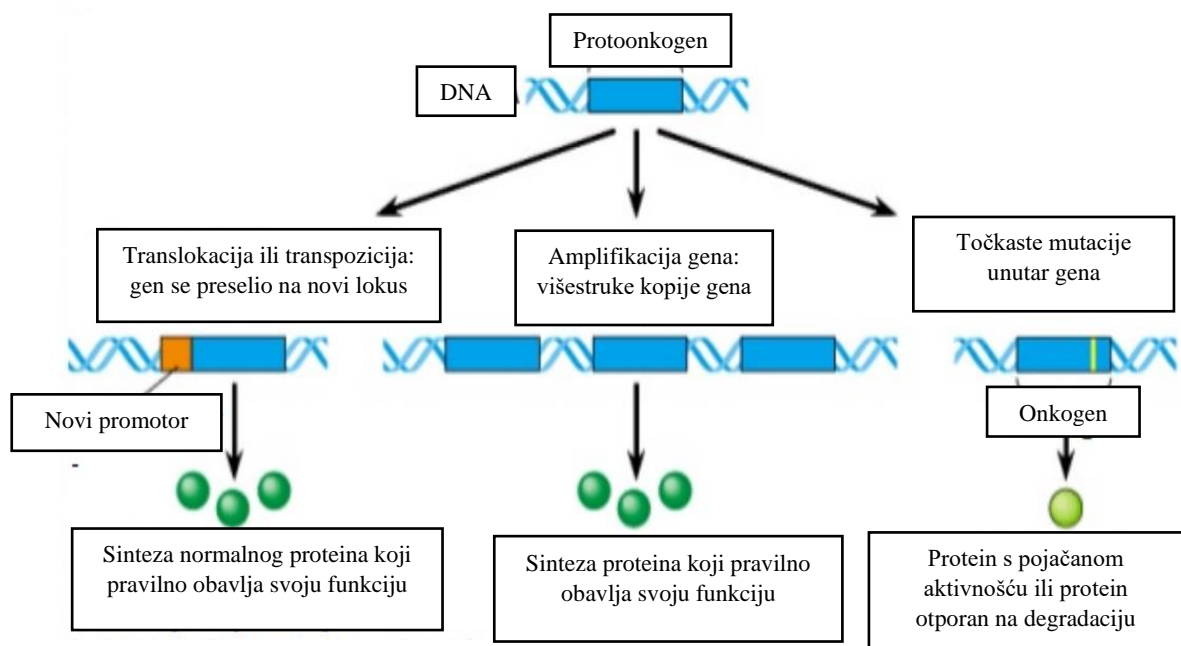


### 1.2.3. Uloga gena u raku dojke

Pojedinačne tumore često karakteriziraju aberacije koje dovode do poremećaja regulacije stotina ili čak tisuća gena. Promjena broja kopija gena i epigenomske modifikacije uzrokuju promjene na najvećem broju gena. Mnogo je identificiranih gena povezano s rakom dojke. Mutacije i abnormalna amplifikacija onkogeni i antionkogeni (tumor-supresorskih gena) igraju ključnu ulogu u procesima inicijacije i progresije tumora.<sup>40,53</sup>

#### 1.2.3.1. Onkogeni

Rak nastaje zbog promjena u najvažnijim regulacijskim genima koji kontroliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje. Istraživanja tumora su pokazala da određeni geni, tj. onkogeni mogu dovesti do transformacije stanica i time omogućila prvi uvid u molekularne osnove raka. Svojom aktivacijom, onkogeni pridonose razvoju raka. Slika 6. prikazuje tri načina aktivacije onkogeni. Aktivacija se može dogoditi amplifikacijom gena na način da što je više proteina kodirano genom, njihova funkcija je poboljšana. Primjer ovakvog načina aktivacije onkogeni je aktivacija HER2 gena koja se uočava u oko 20 % slučajeva raka dojke. Drugi mehanizam aktivacije onkogeni uključuje točkaste mutacije koje pojačavaju aktivnost onkoproteina. Primjeri uključuju točkaste mutacije u onkogeni Ras. Kromosomska translokacija je treći način aktivacije onkogeni gdje se novi gen transkribira u protein s poboljšanom funkcijom. Onkogeni mogu djelovati zajedno s drugim genetskim ili epigenetskim promjenama. Kod raka dojke velika je pozornost usmjerena na onkogene komponente sustava signalizacije stanica, čiji je primjer kaskada HER2/neu. O vrsti tumorskih stanica ovisi da li će se dogoditi amplifikacija gena, točkaste mutacije ili kromosomska translokacija. Neki od najčešćih onkogeni su: *sis* – čimbenici rasta, *erbB1* i *erbB2* - receptori za čimbenike rasta, *abl* – protein kinaze i drugi. Za aktivaciju onkogeni dovoljna je promjena samo jednog alela i translokacijom se povećava aktivnost protoonkogeni. Amplifikacija aktivira *c-erbB2* gen u raku dojke, dok točkaste mutacije dovode do aktivacije *c-ras* gena u mnogim tumorima. Onkogeni raka dojke djeluju na različitim razinama i imaju potpuno različite funkcije u stanicama. U zdravim stanicama imaju važne funkcije kod procesa rasta ili diferencijacije, dok je u tumorima njihova funkcija promijenjena upravo zbog široke klase mutacija. Onkogeni mogu surađivati kako bi rezultirali fenotipom malignih stanica, no glavno značenje istraživanja onkogeni je otkriti osnovne patogenetske mehanizme.<sup>1,54-56</sup>



**Slika 6.** Tri načina aktivacije protoonkogeni u onkogen

### 1.2.3.2. Tumor-supresorski geni (antionkogeni)

Odnose se na gene čiji gubitak funkcije rezultira promicanjem malignosti. Tumor-supresorski geni obično su negativni regulatori rasta ili drugih funkcija koje mogu utjecati na invazivni i metastatski potencijal, poput adhezije stanica i regulacije aktivnosti proteaza. Oni inhibiraju diobu i diferencijaciju stanica pa će njihova mutacija (inaktivacija) rezultirati poremećenom i nekontroliranom proliferacijom. Aktivacija onkogeni dobro je opisana kao jedan od mogućih mehanizama transformacije normalnih stanica pa je time inaktivacija različitih gena za suzbijanje tumora postala važna u razvoju i napretku raka dojke. Stoga, onkogeni dovode do poremećaja u staničnoj proliferaciji, bilo zbog pojačane ekspresije gena, bilo zbog nekontrolirane aktivacije onkogenih proteina, dok tumor-supresorski geni imaju suprotnu ulogu u kontroli staničnog rasta; oni normalno inhibiraju staničnu proliferaciju i nastanak tumora. Promjene ovih gena pronađene su u velikom broju nasljednih i nenasljednih karcinoma. Osobe koje su naslijedile mutaciju tumor-supresorskog gena pokazuju sklonost na razvoj specifičnog nasljednog karcinoma. Retinoblastomski protein (Rb) je prvi tumor-supresorski gen koji se pokazao promijenjenim u raku dojke. Gubitak funkcije Rb može dovesti do agresivne proliferacije i rezistencije na hormonsku anti-estrogensku terapiju. Osim Rb, BRCA1 i BRCA2, dva su osjetljiva tumor-supresorska gena karakteristična za rak dojke. Mutacije u BRCA1 i BRCA2 genima povezane su s obiteljskim sindromom raka dojke te

predstavljaju visoki rizik ranog obolijevanja. Nasljedne mutacije TP53 gena, znane kao Li-Fraumenijev sindrom, očituju se sklonošću za različite zloćudne bolesti, između ostalih i ovu.<sup>1,54,57-60</sup>

- **Rb**

Predstavlja prvi otkriveni tumor-supresorski gen. Do otkrića su dovela istraživanja retinoblastoma, rijetkog dječjeg tumora oka. Rb gen se nalazi na kromosomu 13q14 i gubitak ove regije dovodi do progresije raka dojke. Protein retinoblastomskog tumora funkcionalno je inaktivan u većini karcinoma kod ljudi i aberantan je u jednoj trećini svih karcinoma dojke. U raku dojke je zabilježeno da je oko 20-35 % primarnih tumora izgubilo Rb ekspresiju, dok su u 7-37 % ovog karcinoma nađene različite mutacije i strukturalne abnormalnosti Rb. Osim mutacija i gubitka kromosoma, postoje različiti načini inaktiviranja Rb.<sup>1,58,60,61</sup>

- **BRCA1 i BRCA2**

Poznati su antionkogeni kod raka dojke. Nalaze se na kromosomu 17q21, odnosno 13q12 i oboje kodiraju tumor-supresorske proteine. BRCA1 djeluje kao centralni protein u održavanju genomske stabilnosti, popravku DNA, kontroli staničnog ciklusa, modeliranju kromatina, regulaciji transkripcije i ubikvitinacije proteina. Protein BRCA2 uključen je u popravak jednolančanih i dvolančanih lomova DNA te sudjeluje u citokinezi. Nedostatak BRCA1 dovodi do poremećaja regulacije staničnog ciklusa, abnormalne duplikacije centrosoma, genetske nestabilnosti i na kraju do apoptoze. Nadalje, alternativni mehanizmi popravka dvolančanih lomova skloni su pogreškama u stanicama s nefunkcionalnim BRCA2 genom pa rezultiraju genomskom nestabilnošću stanica te promjenama koje pridonose novim svojstvima stanice. Tumori dojke koji se pojavljuju u nositelju mutacija gena BRCA1 imaju specifičan profil genske ekspresije koji se može razlikovati od tumora povezanih s BRCA2 genom i nenasljednih tumora dojke. Iako su mutacije u BRCA1 i BRCA2 genima rijetke u sporadičnim slučajevima, postoje dokazi da putovi kojima oni djeluju mogu biti inaktivirani brojnim mehanizmima u velikom broju tumora.<sup>40,62</sup>

- **TP53**

To je gen koji se nalazi promijenjen u raku dojke kod približno 20-40 % svih slučajeva, ovisno o veličini tumora i stadiju bolesti. Nalazi se na 17. kromosomu na

položaju 13.1. Može aktivirati ili potisnuti veliki broj ciljnih gena uključenih u različite funkcije, poput regulacije staničnog ciklusa, indukcije apoptoze, popravka DNA, anti-angiogeneze i održavanja genoma. Mutacije gena TP53 pronađene su i na eksonima i na intronima te uvelike utječu na njegovu tumor-supresorsku ulogu. Većina mutacija gena p53 rezultira poboljšanjem aktivnosti proteina, ali prekomjerna ekspresija dovodi do poremećaja u njihovoj funkciji. Genetske promjene u eksonima dovode do nastanka tumora zbog produkta koji nije djelotvoran, proteina p53. Najčešće su promjene koje se događaju na intronima TP53 gena, no još uvijek nije u potpunosti istražen uzrok njihovog nastajanja. Abnormalnosti ekspresije gena p53 povezane su s lošijim prognozama u slučajevima raka dojke.<sup>54,60,63,64</sup>

#### **1.2.4. Simptomi, dijagnoza i liječenje raka dojke**

Karcinom dojke u svojoj ranoj fazi ne pokazuje nikakve simptome, ali važno je znati koje promjene treba pratiti. U slučaju razvoja karcinoma, simptomi bolesti će kod svake osobe biti drugačiji, dok se oni najčešći odnose na promjene u uobičajenom izgledu i osjećaju, a to su: kvržice (često se ne vide golim okom, ali se mogu osjetiti dodirrom i obično predstavljaju prvi simptom), tekstura kože (pojava udubljenja ili osjećaj zatezanja u dojci), promjena izgleda bradavica ili iscjedak iz njih, pojava osipa ili vidljivih vena na dojčkama, oticanje cijele ili jednog dijela dojke, gubitak težine i drugi. Ukoliko se pojavi jedan ili nekoliko ovih simptoma, to nužno ne znači da je riječ o karcinomu, no svakako bi trebalo o tome obavijestiti svog liječnika.<sup>65</sup>

Postoji više metoda za otkrivanje raka dojke, a najčešće se koriste mamografija, ultrazvuk, magnetska rezonanca (MR) i pozitronska emisijska tomografija (PET). Mamografija ostaje najvažniji dijagnostički postupak za otkrivanje malih, neopipljivih lezija, dok se ultrazvuk koristi kod dijagnosticiranja malih tumora i za razlikovanje čvrstih lezija od cističnih lezija. MR se uglavnom koristi kao metoda rješavanja problema nakon konvencionalnih dijagnostičkih postupaka i korisna je za identifikaciju primarnih žarišta u neopipljivim lezijama. PET se trenutno koristi za otkrivanje metastatskih žarišta u bilo kojem udaljenom organu.<sup>66</sup>

Liječenje raka dojke može biti lokalno (kirurška terapija, radioterapija) i sistemsko (kemoterapija, hormonska terapija, biološka i ciljana terapija). Najčešće se liječi

kombinacijom više vrsta liječenja. Određena se liječenja provode istodobno, a nekad slijedom, jedno za drugim. Plan liječenja se može mijenjati, ovisno o uspješnosti.<sup>67</sup>

### **1.2.5. Epidemiologija raka dojke**

Rak dojke je najčešći zloćudni tumor kod žena te čini 1 od 4 novodijagnosticirana slučaja raka u svijetu. Drugi je vodeći uzrok smrti od svih vrsta raka u svijetu, odgovoran za 15 % slučajeva i glavni uzrok smrti od raka među ženama. Nekoliko čimbenika utječe na rizik od bolesti, a to su najčešće dobni, obiteljski i reproduktivni faktori te način života. Najviše pogađa žene u dobi između 20 i 50 godina. Učestalost i smrtnost od raka dojke variraju među populacijama diljem svijeta. Stope su visoke kod većine razvijenijih zemalja. U svijetu, prema podacima studije Globalnog opterećenja bolešću iz 2019. godine, zabilježeno je više od 2 milijuna novih slučajeva raka dojke te više od 700 000 smrti od istog. Godišnja incidencija bolesti raste, stopa incidencije je 10,4 % od svih karcinoma, dok se mortalitet stalno smanjuje.<sup>52,68-70</sup>

Sukladno trendovima u svijetu, u Republici Hrvatskoj se primjećuje porast incidencije raka dojke od početka registracije malignih bolesti. Tijekom zadnjih 25 godina došlo je do gotovo dvostrukog porasta incidencije raka dojke. Jedan od najčešćih uzroka smrti žena u Hrvatskoj, u dobi između 35 i 59 godina života je upravo rak dojke. Uspjeh liječenja, a time i prognoza bolesti u izravnoj je vezi sa stadijem bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Otkriti malignu promjenu što manje veličine i u lokaliziranom stadiju cilj je Nacionalnog programa prevencije i ranog otkrivanja raka dojke u Hrvatskoj koji se provodi od sredine 2006. godine. Prema posljednjim objavljenim podacima Registra za rak u Hrvatskoj u 2019. godini zabilježeno je 2 999 slučajeva raka dojke (stopa 143,2/100 000), a u 2020. godini umrle su 722 žene (stopa 34,7/100 000). Time je rak dojke postao treći maligni uzrok smrti u žena u Hrvatskoj, nakon raka pluća te raka debelog i završnog crijeva.<sup>70-72</sup>

### 1.3. Klasifikacija zloćudnih tumora

Sustav klasifikacije metastaza tumorskog čvora (TNM) temelji prognoze bolesnika na veličini tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova i metastazama (tablica 1.). Izdanje TNM klasifikacije zloćudnih tumora (engl. *TNM-Classification of Malignant Tumors*) usvojio je Američki združeni komitet za rak (engl. *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 pacijenta s tumorom. Proširenost karcinoma definira se TNM klasifikacijom, gdje T označava invazivnost tumora, N zahvaćenost limfnih čvorova, a M postojanje metastaza.<sup>44</sup>

**Tablica 1.** TNM klasifikacija zloćudnih tumora

| <b>T</b>       | <b>primarni tumori</b>                                      |
|----------------|---|
| T <sub>1</sub> | mali tumor koji još ne urasta u tkivo                       |
| T <sub>2</sub> | srednje veliki tumor koji lagano urasta u okolno tkivo      |
| T <sub>3</sub> | veliki tumor koji dijelom urasta u okolno tkivo             |
| T <sub>4</sub> | vrlo veliki tumor koji snažno urasta u okolno tkivo         |
| <b>N</b>       | <b>metastaze limfnih čvorova</b>                            |
| N <sub>0</sub> | nema metastaza u limfnim čvorovima                          |
| N <sub>1</sub> | regionalne, vrlo bliske, pokretne metastaze limfnih čvorova |
| N <sub>2</sub> | regionalne, nepokretne metastaze limfnih čvorova            |
| N <sub>3</sub> | opsežne, nepokretne metastaze limfnih čvorova               |
| <b>M</b>       | <b>udaljene metastaze</b>                                   |
| M <sub>0</sub> | nema metastaza  |
| M <sub>1</sub> | prisutne metastaze u udaljenim organima                     |

### 1.3.1. TNM klasifikacija raka dojke

Kada se dijagnosticira invazivni tumor dojke, treba procijeniti opseg širenja i odrediti stadij u kojem se tumor nalazi. TNM klasifikacija raka dojke (tablica 2.) se temelji na kliničkim mjerenjima i procjeni limfnih čvorova. Za poboljšanje TNM sustava, zasebno je dodana i patološka klasifikacija koja omogućuje da se prema procjeni patologa odredi veličina tumora i status čvora. Potom se prognoza raka dojke određuje prema stadiju bolesti.<sup>44</sup>

**Tablica 2.** TNM klasifikacija raka dojke

| <b>T</b>        | <b>primarni tumori</b>   |
|-----------------|--|
| T <sub>in</sub> | tumor <i>in situ</i>   |
| T <sub>1</sub>  | ≤ 2 cm (T <sub>1a</sub> ≤ 0.5 cm, T <sub>1b</sub> > 0.5-1, T <sub>1c</sub> > 1-2 cm) |
| T <sub>2</sub>  | > 2 cm-5 cm  |
| T <sub>3</sub>  | > 5 cm   |
| T <sub>4a</sub> | zahvaćenost stijenke prsnog koša   |
| T <sub>4b</sub> | zahvaćenost kože (uključuje ulceraciju, izravnu infiltraciju)                        |
| T <sub>4c</sub> | T <sub>4a</sub> i T <sub>4b</sub> zajedno  |
| T <sub>4d</sub> | upalni rak   |
| <b>N</b>        | <b>metastaze limfnih čvorova</b>   |
| N <sub>0</sub>  | nema metastaza u regionalnom čvoru   |
| N <sub>1</sub>  | pokretni aksilarni čvorovi   |
| N <sub>2</sub>  | aksilarni čvorovi srasli međusobno ili za druge strukture                            |
| N <sub>3</sub>  | ipsilateralni inframamarni čvorovi   |
| <b>M</b>        | <b>udaljene metastaze</b>  |
| M <sub>0</sub>  | nema metastaza   |
| M <sub>1</sub>  | udaljene metastaze   |

## 1.4. Stanične linije

Stanična linija je trajno uspostavljena stanična kultura koja će neograničeno proliferirati u odgovarajućem mediju. Linije se razlikuju ovisno o sojevima stanica u kojima postaju besmrtni. Stanične kulture i stanične linije imaju važnu ulogu u proučavanju fizioloških i patofizioloških procesa te diferencijacije specifičnih stanica. Time je omogućeno ispitivanje stupnjevitih promjena u strukturi, biologiji i genetskom sustavu stanice u kontroliranim uvjetima. Ovo je posebno važno za kompleksna tkiva, poput gušterače koja se sastoji od različitih tipova stanica, gdje je *in vivo* ispitivanje pojedinih stanica gotovo nemoguće. Velike poteškoće u izolaciji i pročišćavanju pojedinih epitelnih stanica iz složenih tkiva uz održavanje izvornih karakteristika otežavaju razumijevanje njihovih fizioloških i bioloških karakteristika, rasta i diferencijacije. Besmrtni stanične linije često se koriste u istraživanjima umjesto primarnih stanica. Nude nekoliko prednosti, kao što su isplativost i jednostavno korištenje te osiguravaju čistu populaciju stanica, a to je važno jer time pružaju dosljedne uzorke i ponovljive rezultate. Revolucionirale su znanstvena istraživanja pa se koriste u proizvodnji cjepiva, ispitivanju metabolizma lijekova i citotoksičnosti, proizvodnji antitijela, proučavanju funkcije gena, stvaranju umjetnih tkiva i u sintezi bioloških spojeva. Stanične linije bi trebale održavati funkcionalna svojstva što bliže primarnim stanicama, no to može biti teško jer funkcije primarnih stanica često nisu u potpunosti razumljive. Budući da se staničnim linijama genetski manipulira, to može promijeniti njihov fenotip, izvornu funkciju i osjetljivost na podražaje.<sup>73,74</sup>

Postoje različite besmrtni stanične linije. Neke od njih su normalne stanične linije izvedene iz matičnih stanica, a ostale su *in vitro* ekvivalent stanica raka. Stoga, stanične linije su podvrgnute sličnim mutacijama dopuštajući da stanični tip koji se inače ne može podijeliti, sada proliferira *in vitro*. Podrijetlo nekih staničnih linija, primjerice HeLa ljudskih stanica, potječe od prirodno prisutnih karcinoma. Stanice raka mogu narušiti okoliš u kojem se razmnožavaju i imaju sposobnost oponašanja nekih karakteristika drugih vrsta stanica. Kako te stanice metastaziraju, mogu poprimiti novi fenotip pa je njihovu lokaciju teže otkriti. Stanice u kulturi su osigurale neke informacije o fiziološkim i patofiziološkim karakteristikama raznih vrsta stanica. Do sada, najviše saznanja se temelji na uzgojenim stanicama glodavaca. Suradnja istraživača iz različitih medicinskih disciplina neophodna je za uspješnu izolaciju, pročišćavanje i održavanje normalnih epitelnih stanica čovjeka.<sup>12,75</sup>



### 1.4.1. Uzgoj staničnih linija u kulturi stanica

Uvjeti u kojima rastu stanice malignog tumora u kulturi razlikuju se od onih *in vivo*. Optimiziranjem uvjeta u kulturi u kojoj rastu stanice malignih tumora, moguće ih je učiniti sličnijima tumoru *in vivo* kako bi se rezultati dobiveni na staničnim linijama vjernije mogli preslikati na tumore. Uzgoj u fiziološkim uvjetima, kao što je medij bez seruma, specijalne podloge s matriksom (izvanstaničnom tvari koja čini biokemijsku i strukturnu potporu stanica) i niskom koncentracijom kisika, rezultirao je većom sličnosti staničnih linija karcinomu dojke *in vivo*. Stanice malignih tumora mogu se uzgajati u dvodimenzionalnoj (2D) ili trodimenzionalnoj (3D) kulturi. U 2D kulturi stanice rastu u jednom sloju, okružene drugim stanicama samo na periferiji, ispod njih se nalazi staklo ili plastika te ne postoji gradijent kisika i hranjivih tvari. U takvoj kulturi inhibirana je sposobnost stanica da tvore višedimenzionalne strukture i ne postoji višestanični mikrookoliš, kao u uvjetima *in vivo*. S druge strane, stanice koje su rasle u 3D kulturi pokazale su različiti obrazac ekspresije gena u usporedbi s istim stanicama koje su rasle u jednom sloju jer su u 3D kulturi stanične linije sferoidne i u tom obliku zadrže obilježja tumorskih stanica koja se u 2D mediju izgube.<sup>76</sup>

Tablica 3. prikazuje najčešće uvjete za uzgoj stanica sisavaca. Međutim, u umjetnom okruženju stanice zahtijevaju određeni skup faktora, kao što su posuda za kulturu (posebna plastika koja je sterilizirana i obložena poli-D-lizinom za poticanje adhezije stanica), medij za rast (tekućina koja opskrbljuje stanice hranjivim tvarima, poput aminokiselina, ugljikohidrata, vitamina i minerala), faktori rasta (sadržani u goveđem ili telećem serumu), hormoni, plinovi (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) i regulirano fizikalno-kemijsko okruženje (pH, osmotski tlak, temperatura). Prilikom uzgoja stanica *in vitro*, važno je pod mikroskopom promatrati njihovu morfologiju i međusobnu povezanost. To je ključno za očuvanje stanica, kao i za otkrivanje znakova kontaminacije.<sup>77</sup>

**Tablica 3.** Najčešći uvjeti za uzgoj stanica sisavaca

| Parametri          | Vrijednosti |
|--------------------|-------------|
| pH                 | 7,4         |
| CO <sub>2</sub>    | 5 %         |
| temperatura        | 37 ° C      |
| vlažnost atmosfere | 95 %        |

Petrijeve zdjelice (slika 7.) se obično koriste u biološkim laboratorijima. Najčešća uporaba je za uzgoj stanica i mikroorganizama. U njima se stvaraju potrebni uvjeti koji omogućuju rast i razvoj stanica. Općenito, osigurani su tekući ili polukruti mediji i hrana. Osim toga, imaju poklopac koji ih čini idealnima za razvoj stanica jer će tako biti izolirane i zaštićene od štetnih tvari. Budući da su načinjene od prozirnih materijala, kroz njih se može promatrati rast organizama. Uzorci se mogu promatrati pod mikroskopom izravno iz Petrijeve zdjelice. Također se koriste za promatranje rasta sjemena nekih biljaka i ponašanja vrlo malih životinja.<sup>78</sup>

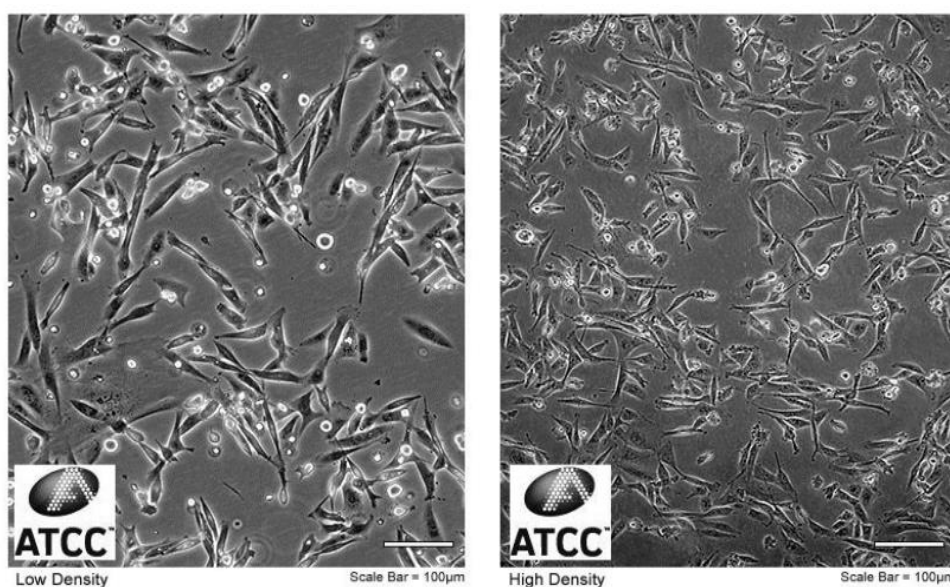


**Slika 7.** Stanične kulture u Petrijevim zdjelicama

#### **1.4.2. Stanična linija MDA-MB-231**

Stanična linija MDA-MB-231 (slika 8.) je jedna od najčešće korištenih staničnih linija raka dojke u medicinskim istraživačkim laboratorijima. To je epitelna, ljudska stanična linija raka dojke koja je uspostavljena iz pleuralnog izljeva 51-godišnje bjelkinje s metastatskim adenokarcinomom dojke. Vrlo je agresivna, invazivna i slabo diferencirana stanična linija trostruko-negativnog karcinoma dojke (engl. *triple negative breast cancer*, TNBC). Zbog nedostatka ekspresije receptora za estrogen i progesteron te HER2 amplifikacije, ova se stanična linija nekoć klasificirala kao bazalna linija raka dojke. Različiti signalni putovi u populacijama epitelnih i matičnih mezenhimalnih stanica raka uzrokovali su da one različito reagiraju na različite terapije, stoga se dvostruka inhibicija

čini bitnom za učinkovito liječenje TNBC-a. Općenito, u trodimenzionalnoj kulturi, ova stanična linija pokazuje morfologiju sličnu endotelu i odlikuje se svojim invazivnim fenotipom i zvjezdastim razgranjenjem koje često premošćuje više staničnih kolonija. Te stanice osim što ne posjeduju receptore za estrogen i progesteron te HER2, eksprimiraju i mutirani gen p53 pa su stoga jedna od najčešće korištenih staničnih linija u medicinskim znanstvenim istraživanjima. MDA-MB-231 se često naziva i „besmrtna stanična linija“ jer ima aktivnu telomerazu koja sprječava skraćivanje njihovih telomera i omogućuje neprekidne diobe. S obzirom da predstavljaju međusobno adherentne stanice epitelnog podrijetla koje rastu u jednom sloju pričvršćene za podlogu, zahtijevaju dobru površinu za koju se mogu vezati zbog svog rasta i razvoja.<sup>79-83</sup> Karakteristike stanične linije MDA-MB-231 su dane u tablici 4.



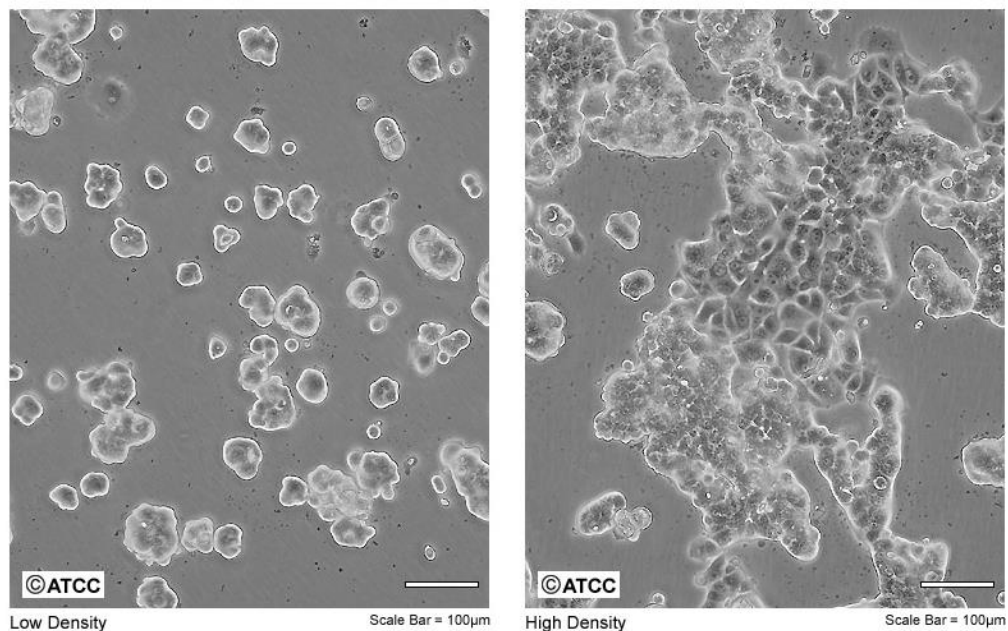
Slika 8. Mikroskopski prikaz stanične linije MDA-MB-231

Tablica 4. Karakteristike stanične linije MDA-MB-231

|                          |                              |
|--------------------------|------------------------------|
| <b>Organizam</b>         | <i>Homo sapiens</i> , čovjek |
| <b>Tkivo</b>             | dojka; mliječna žlijezda     |
| <b>Forma proizvoda</b>   | smrznuto                     |
| <b>Morfologija</b>       | epitelna                     |
| <b>Obilježje kulture</b> | adherentna                   |
| <b>Bolest</b>            | adenokarcinom                |
| <b>Etnitet</b>           | Euroljanka                   |
| <b>Dob i spol</b>        | 51 godina, žena              |

### 1.4.3. Stanična linija MCF-7

Stanična linija MCF-7 (slika 9.) je izolirana iz pleuralnog izljeva 69-godišnje pacijentice oboljele od metastaziranog raka dojke. Skraćenica MCF-7 izvedena je od engl. *Michigan Cancer Foundation-7*, instituta u Detroitu na kojem je uspostavljena 1973. godine. Ova stanična linija pripada adherentnim stanicama koje su sklone formiranju kupolastih monoslojeva, dok morfološki pripada epitelnim tipovima stanica. Standardni je model istraživanja u mnogim laboratorijima i najčešće je istraživana stanična linija humanog raka dojke u svijetu. Dobiveni rezultati su imali temeljni utjecaj na istraživanja raka dojke. Za proliferaciju je nužan estrogen te vezanjem tamoksifena, antagonista estrogena, dolazi do inhibicije rasta. Zbog te činjenice, MCF-7 stanična linija je izvrstan model za *in vitro* istraživanja mehanizama tumorskih odgovora na endokrinu terapiju raka dojke te složenih odnosa između vezanja i biološke aktivnosti terapijskih hormona. Unatoč svom podrijetlu iz metastaza uznapredovalog tumora, stanična linija je neinvazivna te predstavlja model ranog stadija bolesti zbog prisutnosti estrogenskog receptora i ovisnosti o estrogenu za rast i razvoj u *in vitro* i *in vivo* uvjetima.<sup>84-86</sup> Karakteristike stanične linije MCF-7 su dane u tablici 5.



**Slika 9.** Mikroskopski prikaz stanične linije MCF-7

**Tablica 5.** Karakteristike stanične linije MCF-7

|                          |                              |
|--------------------------|------------------------------|
| <b>Organizam</b>         | <i>Homo sapiens</i> , čovjek |
| <b>Tkivo</b>             | dojka; mliječna žlijezda     |
| <b>Forma proizvoda</b>   | smrznuto                     |
| <b>Morfologija</b>       | epitelna                     |
| <b>Obilježje kulture</b> | adherentna                   |
| <b>Bolest</b>            | adenokarcinom                |
| <b>Etnitet</b>           | Euroljanka                   |
| <b>Dob i spol</b>        | 69 godina, žena              |

#### 1.4.4. Prijelaz iz normalnih u tumorske stanice

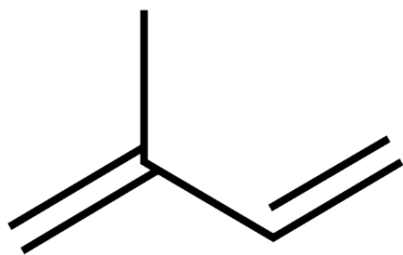
Nekontrolirani rast stanica raka nastaje kao posljedica nakupljanja različitih poremećaja koji djeluju na mnoge regulacijske stanične mehanizme. Ovaj se odnos ogleda u različitim aspektima ponašanja po kojima se stanice raka razlikuju od odgovarajućih normalnih stanica. Posljednjih godina pozornost se sve više usmjerava na staničnu površinu kao sjedište važnog dijela maligne transformacije. Za razliku od normalnih, maligne stanice imaju sposobnost lokalne invazije, tj. kreću se prema van od žarišta nastanka tumora, uvlačeći se među okolne normalne stanice. Kao rezultat invazije, dopiru do tjelesnih tekućina, pomoću kojih se transportiraju i šire te na taj način metastaziraju. Njihova populacija održava kontinuirani rast mitozom. Nekontroliranu proliferaciju stanica raka *in vivo* prati slično ponašanje u staničnoj kulturi. Osnovna razlika između stanica raka i normalnih stanica u kulturi jest u tome što u normalnih stanica dolazi do inhibicije proliferacije stanica ovisne o gustoći. Normalne stanice proliferiraju dok ne dostignu odgovarajuću gustoću koja dijelom ovisi o raspoloživosti faktora rasta dodanih u medij (obično u obliku seruma), dok tumorske stanice imaju manju potrebu za faktorima rasta, što pridonosi nereguliranoj proliferaciji tih stanica *in vitro* i *in vivo*. Međustanične interakcije i interakcije između stanica i matriksa također djeluju slabije na stanice raka, nego na normalne stanice. Fenomen lučenja proteaza koje razgrađuju sastojke izvanstaničnog matriksa omogućuje stanicama raka da se šire u susjedna normalna tkiva i lučenje faktora koji stimuliraju stvaranje novih krvnih žila (angiogeneza) utječe na sposobnost interakcije stanica raka s drugim sastojcima tkiva pa zato igraju veliku ulogu u širenju i metastaziranju. Razvoj *in vitro* testova za proces otkrivanja pretvorbe normalne u tumorsku stanicu u kulturi (transformacija stanica) značajno je pridonio istraživanju

raka. Takvi su testovi napravljeni tako da nakon izlaganja kulture normalnih stanica karcinogenom agensu, otkrivaju transformirane stanice sa značajkama *in vitro* rasta tumorskih stanica. Njihova je primjena omogućila da eksperimentalna analiza transformacije stanica dosegne razinu sofisticiranosti koju nikada ne bi mogla dostići samo istraživanjima na živim životinjama. Općenito, stanice transformirane *in vitro* mogu stvarati tumore nakon inokulacije u osjetljive životinje, što pokazuje da je *in vitro* transformacija zadovoljavajući model nastanka stanica raka.<sup>1,87</sup>

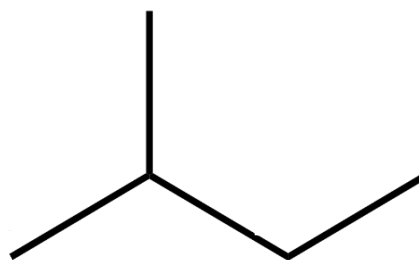
## 1.5. Ispitivani spoj

### 1.5.1. Terpeni

Terpeni su većinom hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodnog mirisa čiji je skelet izveden iz izoprena (slika 10.). Glavni su sastojci tipičnih eteričnih ulja. Naziv potječe od terpentina, a to je mješavina nezasićenih ugljikovodika koja se dobiva destilacijom smole bora (tzv. terpentinsko ulje). Terpeni su karakteristični proizvodi životnih procesa te sastojci većine prirodnih i umjetnih mirisnih tvari, a nosioci su okusa i specifičnih farmakoloških djelovanja. Njihovu osnovnu strukturu izgrađuje 2-metilbuta-1,3-dienska jedinica koja se često naziva izoprenska ili C<sub>5</sub> jedinica (slika 11.), stoga je izopren (2-metilbuta-1,3-dien) osnovni strukturni element terpena. Često se nazivaju izoprenoidi da bi se naglasila njihova međusobna izoprenska povezanost. Dijelev se na temelju broja n u općoj formuli (C<sub>5</sub> H<sub>8</sub>)<sub>n</sub> ili broja C-atoma na: semiterpene (C<sub>5</sub>), monoterpene (C<sub>10</sub>), seskviterpene (C<sub>15</sub>), diterpene (C<sub>20</sub>), sesterpene (C<sub>25</sub>), triterpene (C<sub>30</sub>), tetraterpene (C<sub>40</sub>) i politerpene (> C<sub>40</sub>). U prirodi su uglavnom ugljikovodici, alkoholi i njihovi glikozidi, eteri, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri.<sup>5,88</sup>



Slika 10. Izopren



Slika 11. Izoprenska jedinica

## Seskviterpeni

Seskviterpeni dolaze u višim frakcijama eteričnih ulja. Wallach (1887. godine) je prvi dao pretpostavku da su izgrađeni iz tri izoprenske jedinice. Klasificiraju se u četiri skupine u ovisnosti od broja prstenova u njihovoj strukturi. Brojni seskviterpeni djeluju kao fitoaleksini, antibiotski spojevi koje biljke proizvode kao odgovor na napade mikroorganizama. Nastaju iz zajedničkog prekursora, farnezil-pirofosfata, pomoću različitih metoda ciklizacije praćenih u mnogim slučajevima pregradnjama ugljikovog skeleta. Seskviterpeni se dijele na acikličke, monocikličke i bicikličke. Predstavnici acikličkih seskviterpena su farnezen i farnezol, monocikličkih su bisabolen i zinziberen, a bicikličkih kadinen. Također bicikličkim seskviterpenima pripada i slabo istraženi nootkaton, najvažniji i najskuplji aromatik grejpa.<sup>6</sup>

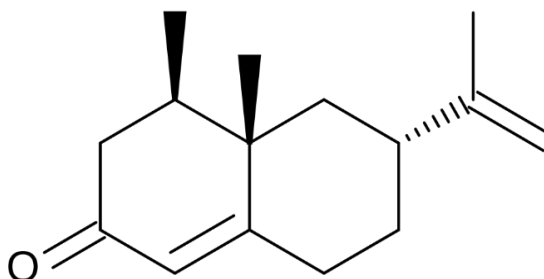
### 1.5.2. Antikancerogeno djelovanje terpena

Uloga terpena je mnogobrojna. Osim što imaju mnoge funkcije u biljkama, poput termoprotektora i signalnih funkcija, također su dio različite medicinske primjene koja uključuje njihov protuupalni, analgetički, antivirusni, antibakterijski, antiparazitski učinak, kao i brojne druge od kojih se ističe i antikancerogeni učinak. Brojna istraživanja su pokazala da se kombinacija monoterpena, diterpena, triterpena i seskviterpena može učinkovito koristiti za liječenje karcinoma koji se javljaju u debelom crijevu, mozgu, prostati i kostima. Među različitim vrstama terpena, limonen je dobro poznati monoterpen koji djeluje kao sredstvo protiv raka. Bioaktivna je komponenta hrane koja se nalazi u koricama citrusa, kori naranče i nekoliko drugih agruma. Postoji više mehanizama kemopreventivnog djelovanja monoterpena. Mogu djelovati tijekom početne faze karcinogeneze, sprječavajući interakciju karcinogena s DNA ili djeluju tijekom faze promocije inhibirajući razvoj i migraciju stanica raka. Kemopreventivne i terapijske aktivnosti monoterpena u kasnijim fazama karcinogeneze uključuju indukciju apoptoze stanica raka, ponovnu diferencijaciju tumorskih stanica i utjecaj na molekularne mehanizme koji reguliraju njihove funkcije. Kemoterapijske aktivnosti također su prikazane za druge terpene, kao što su farnezol i geraniol. Diterpeni su prisutni u lijekovima protiv raka, poput taksola te u promotorima tumora, poput forbola. Njihova potencijalna upotreba kao lijekova protiv raka, dolazi iz širokog raspona aktivnosti, primjerice, antiproliferativnog djelovanja i inhibiranja adhezije, migracije i invazije. Triterpeni, poput ursolne kiseline i oleanolne kiseline djeluju u različitim stadijima

razvoja tumora, sprječavaju inicijaciju i promociju te induciraju diferencijaciju tumorskih stanica i apoptozu. Štoviše, oni su učinkoviti inhibitori angiogeneze, invazije i razvoja metastaza tumorskih stanica. Seskviterpeni, a osobito njihovi laktoni inhibiraju staničnu proliferaciju, transformaciju, rezistenciju na kemoterapiju ili radioterapiju. Visoki strukturni rasponi terpena privukli su pozornost mnogih istraživača kao potencijalni izvori novih lijekova protiv raka. Terpeni su lako dostupni i čine obećavajuću novu klasu sredstava koja se mogu odobriti kao dopunski lijekovi u suvremenoj onkologiji.<sup>5,89-91</sup>

### 1.5.3. Nootkaton

Nootkaton (slika 12.) je biciklički seskviterpen i keton s molekulskom formulom  $C_{15}H_{22}O$ . Ranije se smatrao jednim od glavnih kemijskih spojeva mirisa i okusa grejpa. 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  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a temperatura vrenja  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 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. Identificiran je kao bioaktivni spoj sa širokim rasponom korisnih primjena. Jedna od prednosti korištenja nootkatona je zaštita pluća. Može zaštititi pluća od nepovoljnih učinaka izazvanih udisanjem ispušnih plinova, uključujući promjene u funkciji pluća, upale i oksidativni stres. Osim u soku grejpa, nalazi se i u uljima limuna, limete, naranče i mandarine. Pojavljuje se u vrstama cedrovine i nekim vrstama trava. Toksični učinci nootkatona nisu istraženi.<sup>7,92,93</sup>



Slika 12. Struktura nootkatona



### 1.5.3.1. Nootkaton u biljkama

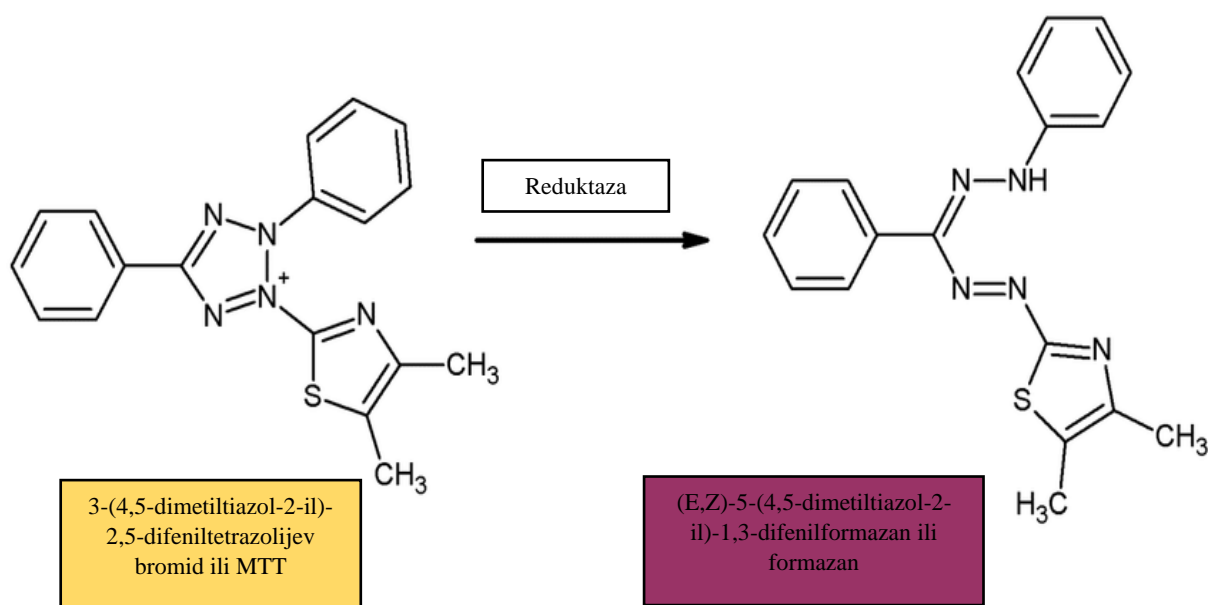
Nootkaton je prvi put izoliran iz aljaškog žutog cedra (*Chamaecyparis nootkatensis*) te je pronađen u maloj količini u grejpu (*Citrus paradisi*) i pomelu (*Citrus grandis*). Nadalje, identificiran je kao sastavni dio ulja vetivera (*Vetiveria zizanioides*), ima niski prag detekcije mirisa i okus sličan grejpu koji je blago gorak. Zbog ovih jedinstvenih organoleptičkih svojstava, visoko je traženi proizvod u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Za razliku od (+)-enantiomera, sintetički (-)-enantiomer nootkatona pokazuje slab, drvenasti i začinski okus. Odgovarajući alkohol nootkatol je prvi put izoliran iz vrste đumbira *Alpinia oxyphylla* i također je opisan kao sastavni dio određenih agruma, npr. grejpa i stabla žutog cedra smole. U usporedbi s (+)-nootkatomom, dva stereoizomerna oblika;  $\alpha$  i  $\beta$ -nootkatol, karakteriziraju znatno veće vrijednosti praga detekcije mirisa.  $\alpha$ -oblik ima kiseli, a  $\beta$ -oblik blago slatki okus. Oba oblika su korisni aromatski spojevi i mogu se koristiti u kombinaciji s (+)-nootkatomom. Nootkaton je također sastavni dio eteričnih ulja rodova *Citrus* (porodica Rutaceae), *Alpinia* (porodica Zingiberaceae) i *Cyperus* (porodica Cyperaceae). Ipak, kvantitativne analize su potvrdile da je koncentracija nootkatona u eteričnim uljima niska. Zbog visoke osjetilne moći, čak i pri iznimno niskim koncentracijama, daju tipičnu aromu grejpa, ali za komercijalnu proizvodnju prirodni biljni izvori nootkatona nisu dovoljno bogati. Zato se ovaj spoj može dobiti sintezom ili biotehnološkom proizvodnjom.<sup>94,95</sup>

### 1.5.3.2. Biološka aktivnost nootkatona

Osim senzorskih svojstava, eterična ulja citrusa povezana su s brojnim biološkim aktivnostima, poput antioksidacijskih, antimikrobnih, protuupalnih i drugih. Često su se za ispitivanje bioloških aktivnosti primjenjivali cijeli destilati ili ekstrakti, ali je bilo nemoguće pouzdano pripisati promatranu aktivnost jednom spoju uzorka. Slučaj je drugačiji za nootkaton i neke njegove derivate i analoge. Nootkaton se pretežito koristi kao insekticid. Učinkovitost protiv termita i krpelja eksperimentalno je dokazana. Također se smatra da nootkaton aktivira jetrenu kinazu B1 koja ima ključnu ulogu u sprječavanju karcinogeneze. Budući da je redovito konzumiran od strane sisavaca, njegova primjena neće predstavljati prijetnju. Primarni način djelovanja nootkatona ostaje nejasan. Nedavna istraživanja su opovrgnula ranije pretpostavke da nootkaton može inhibirati acetilkolinesterazu, ali utječe na ljudske metaboličke putove zbog svog kardiovaskularnog, antiproliferativnog i antitrombotičnog učinka.<sup>95</sup>

#### 1.5.4. Ispitivanje antiproliferativnog djelovanja spojeva

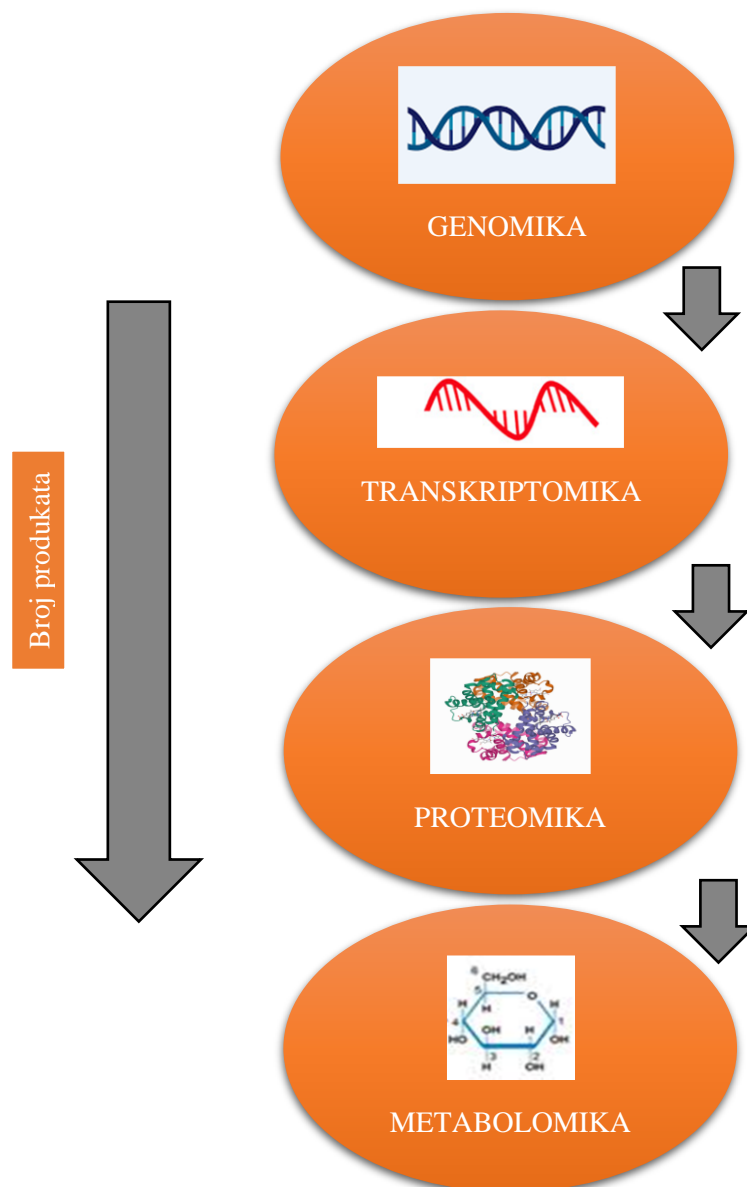
Postoji mnogo testova koji se koriste za ispitivanje antiproliferativnog djelovanja određenog spoja, a najčešće se upotrebljava MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)-test zbog svoje brzine i jednostavnosti. MTT-test je osmišljen za procjenu metaboličke aktivnosti i održivosti stanica. Ispitivanje uključuje pretvorbu, tj. redukciju žute soli tetrazolija (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) ili MTT-a u netopljive ljubičaste kristale formazana, što je prikazano na slici 13. Enzimi odgovorni za reakciju su NAD(P)H-ovisne stanične oksidoreduktaze koje su aktivne samo u održivim stanicama. Apsorbancija obojene otopine može se kvantificirati pomoću spektrofotometra i biti će izravno proporcionalna koncentraciji formazana. Što je tamnija boja, veći je broj prisutnih živih stanica. Osim vitalnosti stanica, MTT-testovi mogu se koristiti za mjerenje stanične proliferacije i procjenu citotoksičnosti.<sup>96</sup>



**Slika 13.** Redukcija žutog MTT-a do ljubičastog formazana

## 1.6. Metabolomika

Metabolom je kompletan skup svih metabolita u organizmu. Metabolomika je nepristrano globalno istraživanje molekula ili metabolita niske molekularne mase u biofluidu, stanici, tkivu, organu ili organizmu. Nadopunjuje ostale „omike“, poput genomike, transkriptomike i proteomike. Genomika proučava cijeli skup gena u genomu stanice. Transkriptomika je proučavanje transkriptoma, a to je kompletan skup RNA transkripata koje proizvodi genom pod određenim okolnostima ili u specifičnoj stanici. Proteomika uključuje cjelovito proučavanje svih proteina u živom organizmu. Sve ove „omike“ se međusobno nadopunjuju uz povećan broj nastalih produkata od genomike do metabolomike (slika 14.).<sup>97,98</sup>



**Slika 14.** Povećanje broja nastalih produkata od genomike do metabolomike

Metaboliti pripadaju nekoliko kemijskih klasa, kao što su: aminokiseline, organske kiseline, amini, baze nukleinskih kiselina, steroidi, derivati purina i drugi, a razlikuju se po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima, karakteristikama odnosa kiselina/baza i vrijednostima koncentracije. Globalne studije metabolomike učinkovito su pokazale biološke promjene nastale uslijed bolesti ili interakcija s okolinom i otkrile nove mehanizme koje prethodno nisu identificirali ostali biokemijski eksperimenti. Pronalazi rastuće primjene u biljnoj znanosti, toksikološkim testovima, razjašnjenjima mehanizama bolesti i identifikaciji potencijalnih biomarkera mnogih bolesti.<sup>99,100</sup>

Za razvoj metabolomike važno je proučavanje prisutnosti, koncentracije i promjene metabolita koji potječu iz biološkog sustava. Ovaj živi sustav predstavljen je uzorkom koji je uzet iz organizma, stanične kulture ili okoliša pod posebnim uvjetima. Stoga je razvoj metabolomike rezultirao poboljšanjem analitičkih metoda u njihovoj osjetljivosti, ponovljivosti, većoj pokrivenosti metabolitima i većim protokom uzoraka. Metabolomika zahtijeva posebne pristupe za pripremu uzorka, separaciju i masenu spektrometrijsku analizu. Prvenstveno se fokusira na metabolički „otisak prsta“, tehniku koja analizira sve detektirane analite u danom uzorku uz naknadnu klasifikaciju uzoraka i identifikaciju različitih metabolita koji definiraju klase uzoraka. Za izvršavanje ovog složenog zadatka, potrebni su alati za analizu podataka, biblioteke metabolita i baze podataka. Stoga je napredak bioinformatike važan za njezin razvoj. Metabolomika je također pomogla u otkrivanju specifičnih biomarkera za mnoge bolesti, a to bi moglo unaprijediti personalizirane terapije i kliničke ishode nakon primarne dijagnoze. Stoga bi identifikacija biomarkera uključenih u određene putove mogla otkriti unutarnje uzroke raka i rezistencije na kemoterapiju. To je dovelo do veće primjene u biomedicinskim istraživanjima pa se stoga metabolomika smatra vrlo integrativnom istraživačkom djelatnošću.<sup>99,100</sup>

Metabolomika je novo područje koje obećava karakterizaciju fenotipa različitih bolesti i pronalaženje jedinstvenog osobnog metabolita koji će predvidjeti odgovor na terapiju. Analitičke metode, poput masene spektrometrije ili NMR spektroskopije podloga su za metabolomički pristup. Mnoge multifaktorske bolesti mogu imati slične kliničke simptome, no svejedno su heterogene na molekularnoj razini, iz čega proizlazi da je svaka bolest jedinstvena – ovisno o pojedinom pacijentu. Poželjno bi bilo liječenje individualiziranom terapijom. Za razvoj personalizirane terapije, bolesti se moraju definirati i karakterizirati na molekularnoj razini.<sup>99,101-103</sup>

### **1.6.1. Metabolomika u biološkom sustavu**

Metabolomika idealno cilja na analizu svih malih molekula u stanici. Za pristup biološkom sustavu, pruža utvrđivanje odnosa između svih elemenata sustava, poput DNA, mRNA, proteina, metabolita i strukturnih elemenata, stanične stijenke i stanične membrane kao dio odgovora na okolišnu ili genetsku smetnju. Može se proučavati kroz široki raspon bioloških supstrata, uključujući stanice, tkiva, organe, biofluide ili čak cijele organizme. Kada se metabolomika primjenjuje na stanice ili stanične kulture, idealna je za istraživanje fiziologije stanica i staničnih procesa. Međutim, pri radu s kulturama stanica sisavaca, važno je znati da potječu od besmrtnih stanica koje su prošle značajne genetske i metaboličke procese transformacije, no one ne moraju nužno odražavati aktivnosti normalnih stanica u tkivima i organima. Kao rezultat toga, većina provedenih metabolomičkih istraživanja usredotočena je na tkiva i organe jer kada se primijeni na određeni organ ili tkivo, osobito je korisna za razumijevanje fiziologije te metaboličkih procesa povezanih s tim organom. Sustavni pristupi ljudskim bolestima, poput raka i kardiovaskularnih bolesti, pružiti će priliku za razvoj lijekova i novih metoda liječenja. Cilj bi bio postići mogućnost utvrđivanja vjerojatne zdravstvene povijesti za svakog pojedinca, a unutar toga okvira biologija sustava će biti strategija za otkrivanje i razvoj novih terapija i lijekova.<sup>104,105</sup>

### **1.6.2. Definicija biomarkera**

Prema Nacionalnom Institutu za rak, biomarker je biološka molekula koja se nalazi u krvi, drugim tjelesnim tekućinama ili tkivima. Znak je normalnog ili abnormalnog procesa, stanja ili bolesti, kao što je rak. Biomarkeri tipično razlikuju oboljelog od zdravog pacijenta. Promjene mogu biti posljedica brojnih čimbenika, uključujući somatske mutacije, transkripcijske promjene ili posttranslacijske modifikacije. Postoji mnogo vrsta biomarkera koje mogu uključivati ​​proteine i nukleinske kiseline. Biomarker također može biti zbirka promjena, kao što je ekspresija gena. Mogu biti detektirani u cirkulaciji (krv, serum ili plazma), ekskrecijom, sekrecijom (stolica, urin, iscjedak) ili mogu biti izvedeni iz tkiva pa zahtijevaju biopsiju ili posebne slike za procjenu. Biomarkeri mogu biti genetski ili somatski i time identificirani kao mutacije u DNA izvedene iz tumorskog tkiva. Upotreba im je mnogobrojna, pružaju dinamičan i snažan pristup razumijevanju spektra neuroloških bolesti s primjenama u opservacijskoj i analitičkoj epidemiologiji, kliničkim ispitivanjima, uspostavi dijagnoza i prognoza.

Definirani kao promjene u sastavnim dijelovima tkiva ili tjelesnim tekućinama, biomarkeri nude sredstva za homogenu klasifikaciju bolesti i čimbenike rizika te patogenezu bolesti. Također mogu održavati cijeli spektar bolesti od najranijih manifestacija do terminalnih faza. Potrebna je pažljiva procjena valjanosti biomarkera s obzirom na stadij bolesti. Tumorski biomarkeri promijenili su trenutnu praksu u onkološkim istraživanjima. Kontinuirano otkrivanje i potvrđivanje od ključne su važnosti za poboljšanje rane dijagnoze, raslojavanja rizika te praćenja odgovora pacijenata na liječenje. Profiliranje tumorskog genoma i transkriptoma sada su uspostavljeni alati za otkrivanje novih biomarkera, ali promjene u ekspresiji proteoma odraziti će se kao promjene u patofiziologiji tumora.<sup>106-108</sup>

### **1.6.3. Identifikacija potencijalnog biomarkera**

Najizazovniji dio metabolomičkih istraživanja je identifikacija biomarkera. To je bitan korak prema razumijevanju bioloških promjena koje se događaju unutar živog sustava i ostaje najvažnije područje istraživanja. Prvi tumorski biomarker otkriven je 1965. godine u krvi bolesnika s rakom debelog crijeva. Taj biomarker se normalno nalazi u fetalnim tkivima. Potencijalni biomarkeri se mogu identificirati kroz više pristupa. Klasičan pristup bi uključivao identificiranje kandidata biomarkera koji su temeljeni na biologiji tumora i njegove okoline ili metabolizmu lijeka. Za razliku od razvoja lijekova koji počinje primjenom velikog broja molekula, a potom ispitivanjem uglavnom jednog za koji se smatra da je najperspektivniji, kod biomarkera se istražuju potencijalni kandidati za biomarkere, a potom se ispituje svaki od njih u tkivima i krvi 100 bolesnika s rakom i zdravih volontera, kako bi se utvrdilo da li je biomarker pogodan za detekciju raka. Veliki je broj tumorskih markera manje ili više specifičnih za pojedine vrste tumora, međutim sve je manji broj onih koji su našli svoju primjenu u kliničkoj praksi i koji se mogu laboratorijski detektirati. Pritom valja napomenuti da je samo neke biomarkere moguće standardnim laboratorijskim metodama određivati u krvi ili urinu. Drugi biomarkeri, tj. geni kao tumorski markeri zahtijevaju nešto složeniji postupak, bilo da se izoliraju iz krvi ili iz samog tkiva tumora i kao takvi nisu prikladni za rutinsku primjenu, već se određuju samo u specijaliziranim ustanovama za potrebe specifične dijagnoze i liječenja. Uz razvoj novih znanja o tumorima i moderne tehnologije, identifikacija se provodi korištenjem tehnika, kao što su: visokopropusno sekvenciranje, nizovi ekspresije gena i masena spektrometrija za brzu identifikaciju pojedinog biomarkera ili cijele skupine. Koriste se i

vezani sustavi: plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) i tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (LC-MS) te nuklearna magnetna rezonanca (NMR). Kako bi se smanjila mogućnost identificiranja lažno pozitivnih biomarkera, treba obratiti pozornost na analizu podataka.<sup>100,106,109,110</sup>

#### **1.6.4. Biomarkeri u istraživanju raka**

Biomarkeri imaju izuzetno veliki značaj za ranu detekciju i dijagnostiku brojnih vrsta raka, u identificiranju osoba kod kojih postoji rizik od nastanka raka, u predviđanju njihovog odgovora na preventivnu terapiju, u razvoju novih kemoterapeutika, kao i u procjeni efikasnosti i sigurnosti terapije liječenja raka. Zbog velikog broja citostatika, odgovarajući biomarkeri mogu se koristiti za određivanje koji će tumor reagirati na odgovarajuće liječenje. Novija istraživanja idu u pravcu identifikacije biomarkera koji će moći razlikovati invazivne od neinvazivnih tumora i tumore koji imaju sposobnost metastaziranja od onih koji će vjerojatno ostati lokalizirani u primarnom organu.<sup>109</sup>

Otkriće pouzdanih biomarkera za određivanje učinkovitosti i toksičnosti lijekova protiv raka ostaje jedan od ključnih izazova u istraživanju raka. Neki noviji tumorski markeri predstavljaju preduvjet djelovanja pojedinih antitumorskih lijekova. Važno je da se neki biomarkeri koriste samo u određenom okruženju, dok drugi mogu poslužiti za više od jedne svrhe. Postoje biomarkeri koji mogu utvrditi rizik pojedinca od razvoja raka. Primjerice, žena s obiteljskom anamnezom raka jajnika ili dojke, može se podvrgnuti genetskom testiranju kako bi se utvrdilo je li nositelj mutacije zametne linije, poput BRCA1, što će povećati njezin rizik od razvoja bolesti. Ako je tako, mogla bi se odlučiti na intenzivniji pregled zbog smanjenja rizika. Biomarkeri se također mogu koristiti za pregled inače zdravih pacijenata na malignost. Kod pacijenata kojima je dijagnosticiran rak, mogu pomoći u utvrđivanju prognoze ili vjerojatnosti bolesti neovisno o liječenju. Važni su modifikatori odgovora na određenu terapiju ili za određivanje koja će terapija biti najučinkovitija. Pad razine tumorskog markera tijekom liječenja, odnosno neposredno nakon završenog liječenja tumora, ukazuje na povoljan odgovor tumora na terapiju. Međutim, zadržavanje visoke vrijednosti markera, unatoč liječenju ili čak njegov daljnji porast, znak su neučinkovitosti terapije. Tumorski markeri su danas neizostavni dio dijagnostike te neizostavna pomoć prilikom odabira i praćenja terapije, ali obavezno uz uzimanje u obzir prednosti i nedostataka pojedinih tumorskih markera, čime i njihova upotreba postaje smisljena i racionalna.<sup>106,110-112</sup>

### **1.6.5. Tumorski markeri raka dojke**

Američko društvo za kliničku onkologiju (engl. *American Society of Clinical Oncology*, ASCO) izdalo je svoje preporuke za upotrebu tumorskih markera u prevenciji, liječenju i nadzoru raka dojke. Tumorski markeri koji su pokazali kliničku korisnost i time su preporučeni za upotrebu u praksi, uključuju: karcinomski antigen 15-3 (engl. *cancer antigen 15-3*, CA 15-3), karcinomski antigen 27-29 (engl. *cancer antigen 27-29*, CA 27-29), karcinoembrijski antigen (engl. *carcinoembryonic antigen*, CEA), receptor za estrogen (ER), receptor za progesteron (PR) te receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2). Postoje i drugi tumorski markeri koji se koriste kod raka dojke, ali nisu pokazali dovoljnu potporu dokazima u kliničkoj praksi (p53, katepsin D, ciklin E, nestin).<sup>113</sup>

#### **Karcinomski antigen 15-3 (CA 15-3)**

Naziv ovog markera izveden je iz kombinacije molekularne strukture i testova razvijenih za njeno otkrivanje. Brojevi 15-3 odnose se na antitijela koja se koriste u imunotestovima za te antigene. CA 15-3 je transmembranski glikoprotein s velikom izvanstaničnom domenom koji se sastoji od O-vezane glikozilirane proteinske jezgre. Luče ga stanice sekretornog receptora, a povećane vrijednosti ovoga markera moguće su u malignim tkivima dojke, kao i kod raka pluća, prostate i jajnika. Dopuštena vrijednost CA 15-3 iznosi 24 ng/mL. Međutim, kao i ostali tumorski markeri, CA 15-3 može biti povišen i kod velikog broja patoloških stanja u abdomenu te kod oboljelih od navedenih malignih bolesti. Povišene vrijednosti CA 15-3 nemaju značaj u otkrivanju novooboljelih od raka dojke, dok je kod uznapredovalog, odnosno metastaziranog raka dojke ovaj antigen povećan u 50-80 % pacijentica. Općenito, koristan je kao tumorski marker u praćenju bolesnika liječenih od raka dojke s obzirom da njegovo povišenje nakon liječenja u velikom postotku upućuje na pojavu recidiva bolesti daleko prije nego to postane klinički evidentno.<sup>60,113,114</sup>

#### **Karcinomski antigen 27-29 (CA 27-29)**

To je proteinski antigen koji sadrži ugljikohidrate i služi kao tumorski marker za rak dojke. Visoko je povezan s rakom dojke jer 80 % žena s tom bolesti ima povišenu razinu CA 27-29. Također se može naći u bolesnika s drugim malignim ili benignim bolestima koje zahvaćaju jetru, bubrege i jajnike. Dopuštena vrijednost CA 15-3 iznosi 38 ng/mL.



Stoga, povišenje razine ovog tumorskog markera nije specifično za pojedini organ. Ima kliničke performanse slične antigenu CA 15-3 kod pacijenata s rakom dojke. Može biti osjetljiviji, ali manje specifičan marker od CA 15-3 pa se smatra da su oba markera ekvivalentni za većinu kliničkih svrhi. Niska osjetljivost i nedostatak specifičnosti isključuju uporabu ovog markera za skrining na rak dojke, ali je koristan za otkrivanje progresije bolesti i zahvaćenosti metastazama.<sup>113,115</sup>

### **Karcinoembrijski antigen (CEA)**

Pripada obitelji srodnih glikoproteina te je marker koji se najčešće koristi u kliničkoj praksi. To je tumorski marker za kolorektalni rak, rak gastrointestinalnog trakta, pluća i dojke. CEA je prvi put identificiran kao specifični tumorski antigen koji se nalazi u ekstraktima tumorskog tkiva i sadrži 45-50 % ugljikohidrata. Jedan je od klasa onkofetalnih antigena koji su normalno prisutni tijekom fetalnog života, javljaju se u niskim koncentracijama kod odraslih i cirkuliraju u visokim koncentracijama u pacijenata s određenim zloćudnim bolestima, osobito epitelnim tumorima. Od prvog opisa CEA-e, poznato je da bi koncentracija antigena u tjelesnim tekućinama, najviše krvi, mogla poslužiti kao koristan vodič u skrbi za pacijente s rakom. CEA je povišen u 40-60 % bolesnica s metastaziranim rakom dojke, stoga se može zaključiti da je povišena razina CEA povezana s uznapredovalom bolešću. Sve vrijednosti karcinoembrijskog antigena više od 10 ng/mL ukazuju na metastaziranje bolesti. Njegova razina je važna u skriningu za rak kod asimptomatskih osoba, kod dijagnosticiranja raka kada se sumnja na njega, određivanja prognoze za vrijeme postavljanja dijagnoze i praćenja učinaka liječenja.<sup>113,116</sup>

### **Receptor za estrogen (ER)**

Receptor za estrogen (ER) je jedan od uspješnijih tumorskih markera raka dojke. Ima ulogu u staničnom rastu, proliferaciji i diferencijaciji. Osim prognostičke vrijednosti, ER je najvažniji biološki marker odgovora na liječenje raka dojke te je zbog toga važno mjeriti njegovu razinu u tkivu tumora. Preporučeno je da se razina treba mjeriti kod svakog invazivnog tumora dojke, kao i kod metastatske lezije ako bi rezultati mogli utjecati na plan liječenja. Klinički pozitivan ER status korelira s povoljnim prognostičkim značajkama, uključujući nižu stopu proliferacije stanica, tj. ako je receptor za estrogen bio prisutan u primarnom tumoru, za 50-60 % pacijenata to je bilo korisno. Nasuprot tome, rijetko je utvrđeno da pacijenti koji su negativni na ER reagiraju na hormonsko liječenje. Iako se ER još uvijek koristi za predviđanje odgovora na hormonsku terapiju

kod uznapredovalog raka, njegova trenutno najvažnija uloga je identificiranje pacijenata u ranoj fazi razvoja bolesti.<sup>113,117</sup>

### **Receptor za progesteron (PR)**

Receptor za progesteron (PR) je tumorski marker raka dojke koji može učinkovito predvidjeti hormonski odaziv. Član je obitelji nuklearnih hormonskih receptora koji se specifično vežu za progesteron. Proteinski proizvodi iz PR-ciljnih gena uključeni su u razne stanične aktivnosti, poput transkripcije, metabolizma lipida, staničnog rasta i apoptoze. Neki od tih proteina su povezani s razvojem raka dojke. Klinički je važan za terapijske ciljeve te ga treba analizirati kod svakog invazivnog raka dojke, kao i kod metastatskih lezija ako bi rezultati utjecali na plan liječenja.<sup>113</sup>

### **Receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2)**

Smatra se da aktivacija i prekomjerna ekspresija staničnih onkogenih igra bitnu ulogu u razvoju raka. Važan je član obitelji onkogenih te se naziva i HER2/neu. Sve domene receptora su uključene u staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje. Prekomjerna ekspresija HER2 u nedostatku adjuvantnog liječenja, korelira s lošom prognozom u smislu općeg preživljenja, neovisno o veličini i stupnju razvoja tumora te statusa hormonskog receptora. Koristi se za identifikaciju pacijenata koji će vjerojatno imati korist od anti-HER2 terapije. Dok je prisutan u više od 80 % karcinoma dojke, prekomjerna ekspresija HER2 gena može se otkriti u približno 20 % slučajeva. Zbog takve ekspresije na površini stanica raka dojke i prepoznate prognostičke i potencijalne prediktivne vrijednosti, predstavlja novu i važnu terapijsku metu. Zato postoji sve više dokaza da HER2 može biti prediktivni biomarker kao odgovor na kemoterapiju i hormonalnu terapiju.<sup>113,117-120</sup>

#### **1.6.6. Razvoj metabolomike u budućnosti**

Metabolomika dobiva sve veći interes širom svijeta kroz razne discipline, uključujući funkcionalnu genomiku, integrativnu i sistemsku biologiju, farmakogenomiku te otkrivanje biomarkera za prognozu bolesti, dijagnozu i praćenje terapije. Veliki je interes za biomarkere, a kako su mnoge bolesti posljedica metaboličkih poremećaja, ima smisla izravno mjeriti metabolite. Kada se identificiraju ključni metaboliti, to će dovesti do

boljeg razumijevanja procesa razvoja bolesti jer će metabolički putovi biti istaknuti kao važni, a to će poslužiti kao polazna hipoteza za terapijsku intervenciju i otkrivanje lijekova. Metabolomika će se u budućnosti kombinirati s više novih tehnologija koje će potencijalno biti zaslužne za njen napredak. Metabolomika koja se temelji na masenoj sprektrometriji (MS) biti će još naprednija, više će se kombinirati tehnike poput tekućinske kromatografije-masene sprektrometrije (LC-MS) ili plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS) te će pružiti znanstvenu osnovu za rješavanje problema istraživanja metabolita i rasvjetljavanja metaboličkih procesa. Razvoj kromatografskih metoda je omogućio učinkovito odvajanje i povećanje broja otkrivenih metabolita. No, još uvijek postoje mnogi izazovi koje treba prevladati prije nego što se metabolomika može smatrati rutinskom tehnikom. Brojnim istraživanjima povećavati će se i razumijevanje složenih bioloških sustava te će se razvijati nove metode za prevladavanje nedostataka metabolomike. Metabolom brzo reagira na podražaje iz okoline, uključujući terapijske ili kirurške intervencije te se stoga može koristiti za praćenje metaboličkog statusa pojedinca i ukazivati na sve moguće toksične učinke, a također bi se mogao koristiti za otkrivanje preostale bolesti ili recidiva nakon terapije.<sup>100,121-123</sup>

## **1.7. Metabolizam stanica raka**

Metabolizam stanica raka je jedno od najstarijih područja istraživanja biologije raka. Temelji se na principu da su metaboličke aktivnosti promijenjene u stanicama raka u odnosu na normalne stanice i da te promjene podupiru održavanje malignih svojstava. Budući da se uočavaju neke promijenjene metaboličke značajke u mnogim tumorskim stanicama, reprogramirani metabolizam se smatra obilježjem raka. Sveobuhvatna tema u metabolizmu raka je da reprogramirane aktivnosti poboljšavaju staničnu kondiciju i pružaju selektivnu prednost tijekom tumorigeneze. Većina klasičnih primjera reprogramiranih aktivnosti podržava opstanak stanica pod stresnim uvjetima ili dopušta stanicama da rastu i proliferiraju na patološki povišenim razinama. Tri od njih uključuju promijenjenu bioenergetiku, poboljšanu biosintezu i redoks ravnotežu. S obzirom da takve aktivnosti pružaju prednosti za malignu stanicu, onda bi neke od njih mogle biti prikladne terapijske mete.<sup>124</sup>

Specifičnost metabolizma raka nije samo rezultat genetskih promjena, važan utjecaj ima dostupnost kisika i nutrijenata, izloženost kemoterapiji i radioterapiji, histološko podrijetlo, interakcija s okolnim stanicama te gradus tumora. Stanice raka su u stalnoj

interakciji sa svojim mikrookolišom pa na njihov metabolizam utječu vanjski i unutarnji podražaji, kao što je opskrba hranjivim tvarima ili kisikom. Posljednjih godina, metabolizam tumorskih stanica dobio je veliko značenje zbog činjenice da su tumori usko povezani s epigenetskom regulacijom jer opskrbljuju metaboličke međuprodukte koji služe kao kofaktori za nekoliko važnih epigenetskih enzima. Primjerice, većina enzima koja modificira kromatin koristi intermedijarne metabolite kao kofaktore i supstrate za njihove reakcije. Stoga je nedvojbeno da je promijenjeni metabolizam bitan za različite epigenetske procese koji će vjerojatno doprinijeti tumorigenezi, malignitetu i stvaranju matičnih stanica raka. Genetičke promjene u mnogim od poznatih onkogeni su važne zbog prilagodbe staničnog metabolizma zahtjevima brze stanične proliferacije, autonomnog rasta i opstanka u okolini koja nema kontakt s izvanstaničnim matriksom. Stoga, bitno je razumjeti procjenu metaboličkih prilagodbi potrebnih za održavanje proliferacije tumorskih stanica te načina na koji onkogeni preusmjeravaju metabolizam tumora. Metabolizam stanica raka i stanične aktivnosti su integrirane i međusobno regulirane. Otkriće i karakterizacija reprogramiranih aktivnosti može pružiti uvid u prikaz tumorskog tkiva, predviđanje njegovog ponašanja i sprječavanje progresije blokiranjem bitnih metaboličkih putova.<sup>124-128</sup>

### **1.7.1. Metabolički putovi u stanicama raka**

Stanice raka su iz temelja promijenile stanični metabolizam, što izravno doprinosi tumorigenezi i malignosti. Otkrivanje cijelog opsega nereguliranog metabolizma kod raka te njegove važnosti za patogenezu bolesti i potencijalni razvoj terapije, zahtijeva naprednu tehnologiju za identifikaciju promijenjenih enzima i metabolita u stanicama raka. Stoga, metabolizam takvih stanica je prvenstveno fokusiran na metaboličke putove koji kada su promijenjeni mogu dovesti do aberantne proizvodnje ili potrošnje važnih biomolekula, poput glukoze, aminokiselina, nukleotida i lipida.<sup>129</sup>

#### **1.7.1.1. Glikoliza**

Glikoliza se događa u svim stanicama tijela. Osim što je glavni metabolički put razgradnje glukoze, predstavlja i glavni metabolički put razgradnje fruktoze, galaktoze i drugih ugljikohidrata iz hrane. Enzimi uključeni u ovaj metabolički put nalaze se u citosomskoj frakciji stanice. Glikoliza se općenito može događati u odsutnosti kisika (anaerobna) ili u prisutnosti kisika (aerobna). Pod anaerobnim uvjetima, laktat je krajnji produkt glikolize,

a pod aerobnim uvjetima nastaje piruvat koji se zatim oksidira do vode i ugljikovog dioksida. Dvije molekule adenzin-trifosfata (ATP-a) nastaju anaerobnom glikolizom, dok pod aerobnim uvjetima sedam molekula ATP-a nastaje pretvorbom glukoze u piruvat. Stanice raka se više oslanjaju na fermentaciju glukoze, nego na respiratorni metabolizam, čak i u prisutnosti kisika. Postoji više glikolitičkih enzima čija je aktivnost znatno povećana u tumorskom tkivu, a to su: heksokinaza, laktat-dehidrogenaza A, kao i oblik M2 piruvat-kinaze (PKM-2), enzima u završnom procesu glikolize koji sudjeluje u prijenosu fosfatne skupine s fosfoenolpiruvata (PEP-a) na ADP (adenozin-difosfat) pri čemu nastaje ATP, dok PEP zaostaje kao enolni oblik piruvata. Ovi metabolički enzimi izravno upravljaju kritičnim staničnim aktivnostima koje su važne kao potpora razvoju tumora na način koji je ovisan o njihovoj izvornoj metaboličkoj aktivnosti, primjerice aktivnosti protein-kinaza.<sup>128,130-132</sup>

Klasičan primjer reprogramiranog metaboličkog puta u stanicama raka je Warburgov efekt ili aerobna glikoliza. Otto Warburg je tijekom prve polovice dvadesetog stoljeća primijetio da transformirane stanice troše glukozu u abnormalno visokoj razini. Međutim, umjesto da to dovede do povećanja stanične energije putem ciklusa limunske kiseline, Warburg je pokazao da to povećava glikolitički tok i vodi do proizvodnje laktata, čak i u nehipoksičnim uvjetima. Stoga tumorske stanice metaboliziraju više glukoze u laktat, nego normalne stanice. Visoka stopa katabolizma glukoze u laktat predstavlja najviše prisutan metabolički fenotip uočeni u stanicama raka, što istovremeno rezultira nakupljanjem nusproizvoda laktata u mikrookolini tumora. U stanicama raka, Warburgov efekt nije učinkoviti put generiranja energije, nego služi kao način za generiranje glikolitičkih i biosintetskih međuprodukata koji djeluju kao prekursori mnogih drugih anaboličkih procesa za *de novo* sintezu ugljikohidrata, nukleinskih kiselina, proteina i masti. Time se olakšava preživljenje i rast stanica raka koje se ponašaju kao metabolički paraziti. Tako se ponašaju zbog činjenice da nabavljaju hranjive tvari iz stanica domaćina aktiviranjem nekoliko kataboličkih procesa, među kojima je najčešća upravo aerobna glikoliza.<sup>124,129,133,134</sup>

### **1.7.1.2. Metabolizam glutamina**

Još jedna metabolička adaptacija stanica raka je njihova tendencija povećane potrošnje glutamina. Glutamin se tradicionalno smatra neesencijalnom aminokiselinom čija je primarna funkcija pohrana dušika u mišićima i njegov prijenos između organa. Čini više

od 20 % slobodnih aminokiselina u plazmi i više od 40 % u mišićima. Sisavci ga mogu sintetizirati u većini tkiva, ali tijekom razdoblja bržeg rasta ili bolesti, stanična potražnja za glutaminom nadmašuje njegovu opskrbu i tada postaje esencijalan. Proliferirajuće stanice intenzivno upotrebljavaju glutamin, što odražava njegovu važnost kao hranjive tvari i prekursora drugih metaboličkih procesa. Glutamin funkcionira i kao izvor metaboličkih intermedijera u ciklusu limunske kiseline, prekursor je za biosintezu nukleinskih kiselina, aminokiselina i glutationa, ali mora se primarno pretvoriti u glutamat uz pomoć glutaminaze. Prisutnost tumora dovodi do velikih promjena u metabolizmu glutamina domaćina na način da je domaćinov metabolizam dušika prilagođen pojačanoj potrebi tumora za glutaminom. Da bi se koristio, glutamin mora biti transportiran u mitohondrije tumora. Stvarna stopa potrošnje glutamina od strane tumorskih stanica ovisi o prisutnosti ili odsutnosti alternativne energije supstrata. Dakle, pregled uloge glutamina u stanicama raka ne zahtijeva samo raspravu o njegovom metabolizmu, već i o njegovoj cirkulaciji i transportu.<sup>131,135</sup>

### **1.7.1.3. Metabolizam masnih kiselina**

Proces transformacije normalnih u tumorske stanice popraćen je reprogramiranjem metaboličkih putova, uključujući glikolizu i anabolizam ovisan o glutaminu. Osim toga, sinteza masnih kiselina javlja se u vrlo visokim stopama u tumorskim stanicama. Povećana lipogeneza kod raka odražava se preko ekspresije i hiperaktivnosti lipogenih enzima, poput ATP-citrat liaze, acetil-CoA karboksilaze ili sintaze masnih kiselina. Acetil-CoA karboksilaza karboksilira acetil-CoA u malonil-CoA koji se dalje pretvara u dugolančanu masnu kiselinu pomoću sintaze masnih kiselina koje ima u niskim razinama u normalnim stanicama i tkivima, dok je više izražena kod tumorskih stanica. Pojačana lipogeneza u tim stanicama je predložena za uravnoteženje redoks potencijala putem korištenja NADPH. Nekoliko istraživanja je dokazalo vezu između razine ekspresije sintaze masnih kiselina i raka. U pacijentica s rakom dojke, visoke razine ovog enzima povezane su s lošom prognozom. Osim toga, kod nekih drugih vrsta raka primijećeno je da blokada njegove aktivnosti, samostalno ili u kombinaciji s kemoterapijom ili monoklonskim antitijelima, inhibira proliferaciju i održivost stanica te smanjuje rast tumora *in vivo*. Stoga se sinteza masnih kiselina može koristiti s ciljem razvoja novih strategija za lijekove protiv raka.<sup>131</sup>

### 1.7.2. Metaboličke promjene kod raka dojke

Kod raka dojke reprogramirana metabolička mreža ključna je za održavanje biosinteze makromolekula i proizvodnju energije. Aerobna glikoliza, označena kao Warburgov efekt, glavna je metabolička karakteristika koju dijeli većina tipova tumora. Osim toga, stanice raka dojke su ovisne o glutaminu, anaplerotskom prekursoru koji upotpunjuje ciklus limunske kiseline. Te stanice također konzumiraju acetat i folat kako bi podržali biosintezu lipida, nukleotida i slično. Poremećaji regulacije metaboličkih procesa glukoze, aminokiselina, lipida i drugih izvora ugljika čine metabolički krajolik raka dojke. Metabolizam glukoze je neophodan za nastanak tumora i razvoj raka dojke. Osim glukoze, glutamin spada u najdostatnije cirkulirajuće aminokiseline te funkcionira kao još jedan ključni izvor ugljika/energije za stanice raka dojke. Potrošnja glutamina premašuje potrošnju drugih aminokiselina više od deset puta. Osim oslanjanja na glikolizu i metabolizam glutamina, stanice raka zahtijevaju lipide za održavanje konstrukcije membrane tijekom brze proliferacije. Određene vrste raka, poput raka dojke i glioma, koriste acetat koji se upotrebljava kao kompenzacijski izvor ugljika za potporu lipogeneze, dok folat podržava proizvodnju NADPH, nukleotida i reakcije metilacije. Dovoljna opskrba lipidima je važna za opstanak i proliferaciju stanica raka u nepovoljnom okruženju.<sup>136</sup>

Stoga, identificirane su brojne razlike između metaboličkih profila raka dojke i normalnog tkiva dojke, što ukazuje na promjene u različitim metaboličkim putovima, poput glikolize, ciklusa limunske kiseline te metabolizma nukleotida i/ili lipida. Međutim, proširenje i funkcionalna važnost ovih metaboličkih promjena može se razlikovati ne samo prema podtipovima raka dojke, već i ovisno o interakciji tih stanica sa složenim mikrookolišom koji obuhvaća razne nekancerogene stanice, kao što su: imunološke stanice (primjerice; makrofagi, limfociti), fibroblasti, adipociti i endotelne stanice. Proučavanje metaboličkog profila kultiviranih stanica raka dojke otkriva visoku metaboličku varijabilnost među različitim staničnim linijama. Potrebno je razumjeti metaboličku heterogenost raka dojke jer podrijetlo i regulatorni mehanizam metaboličke heterogenosti ostaju otvorena pitanja u metabolizmu raka. Poboljšano razumijevanje metabolizma raka dojke pruža tragove za razvoj novih antikancerogenih lijekova usmjerenih na metaboličke ciljeve. Pri otkriću metaboličkog identiteta raka dojke dodatno bi pomogao bolji razvoj tehnologije u području genomike, proteomike i metabolomike jer većina metaboličkih karakteristika za sada ostaje nepoznata.<sup>136,137</sup>

## 1.8. Analitičke metode u metabolomici

Za metabolomske analize dostupne su različite analitičke metode. Najraširenija je tehnologija temeljena na masenoj spektrometriji (engl. *mass spectrometry*, MS) koju karakterizira široki raspon detekcije, visoka osjetljivost, visoka specifičnost molekula i brza analiza. Među analitičkim metodama temeljenim na MS-u, vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) najčešće se koristi u metabolomici za sveobuhvatnu analizu (identifikacija i kvantifikacija) hlapljivih i poluhlapljivih, termički stabilnih spojeva niske molekulske mase. Međutim, kako bi se stekao uvid u biološke mehanizme te mogućnost modeliranja bioloških procesa i određivanja biomarkera, postaje sve važnije identificirati i kvantificirati metabolite. Za metabolomske analize sve se više primjenjuju analitičke tehnike, poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), Fourierove transformirane infracrvene spektroskopije (engl. *Fourier transformed infrared spectroscopy*, FTIR) i nuklearne magnetske rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR). Uz masenu spektrometriju, najviše se koristi nuklearna magnetska rezonancija jer su to dvije tehnike koje su u mogućnosti detektirati široki raspon metabolita s relativno visokom specifičnošću i reproduktivnošću. Iako obje tehnike nude pouzdano promatranje metabolita, treba napomenuti da niti jedan pristup ne može otkriti sve metabolite u metabolomu. S obzirom da metabolomika istražuje metabolite u formi malih molekula, dobivanje široke pokrivenosti metaboloma je izazovno zbog širokog raspona fizikalno-kemijskih svojstava malih molekula. Kombinirana upotreba analitičkih instrumenata i alata otkriva mnoge korisne ishode u metabolomici te pruža pouzdanu detekciju tisuće metabolita u uzorku. Upravo ta složenost metaboloma predstavlja izazov po pitanju uspješnosti bilo koje pojedinačne analitičke metode pa zato zahtijeva razvoj novih postupaka ekstrakcije, separacije, detekcije i kvantifikacije.<sup>99,138-141</sup>

### 1.8.1. Kromatografija

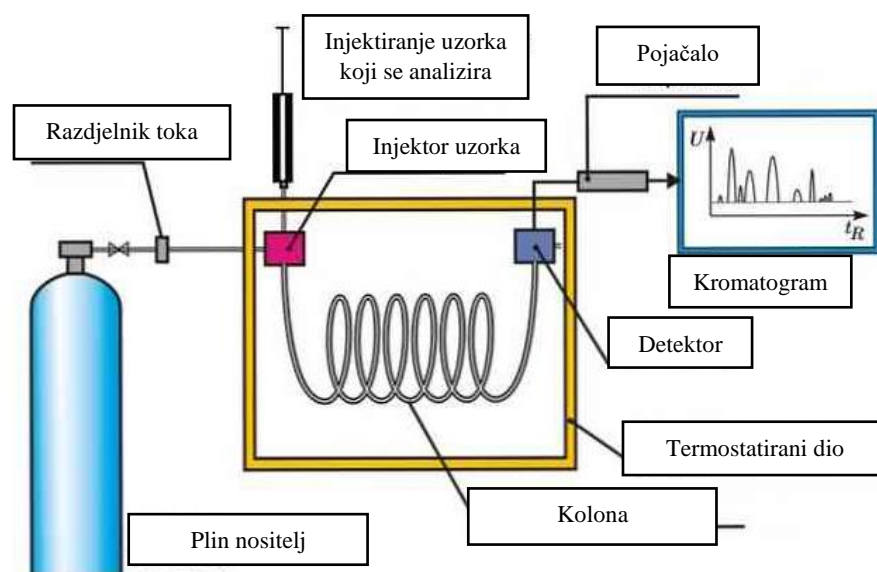
Kromatografija je analitička metoda odjeljivanja pri kojoj se komponente smjese odjeljuju na temelju njihove raspodjele između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Zbog učinkovitosti odvajanja molekula, bitna je vrsta interakcije između dviju faza i komponenata smjese. Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevina, a mobilna faza može biti kapljevina ili plin. Raspodjela između dvije faze će



biti različita, što tjera komponente da se kreću različitim brzinama s mobilnom fazom. S kretanjem mobilne faze, komponente u smjesi odvojene su jedna od druge na stacionarnoj fazi. Podjela kromatografskih tehnika je razna. Jedna od osnovnih podjela je s obzirom na način ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze (kolonska i plošna kromatografija), s obzirom na agregacijsko stanje pokretne faze (plinska i tekućinska kromatografija – pokretna faza je inertan plin, odnosno tekućina male viskoznosti, fluidna kromatografija – pokretna faza je gusti plin, tj. fluid) te s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze (razdjelna, adsorpcijska, afinitetna kromatografija, kromatografija isključenjem, kromatografija ionskom izmjenom). Ne postoji nijedna uspješnija analitička tehnika za odjeljivanje komponenata iz složenih smjesa. Cilj metabolomike je određivanje svih metabolita u biološkim uzorcima. Međutim, zbog različitosti između metabolita, npr. u molekulskoj težini, polaritetu, topljivosti i drugim karakteristikama, teško je pronaći metodu koja može analizirati sve metabolite istovremeno.<sup>140,142-144</sup>

### 1.8.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je uobičajeni tip kromatografije korišten za odvajanje i analizu hlapljivih spojeva. Na slici 15. je dan shematski prikaz plinskog kromatografa. Tipične upotrebe uključuju ispitivanje čistoće određene tvari ili odjeljivanje različitih sastojaka smjese.<sup>142</sup>

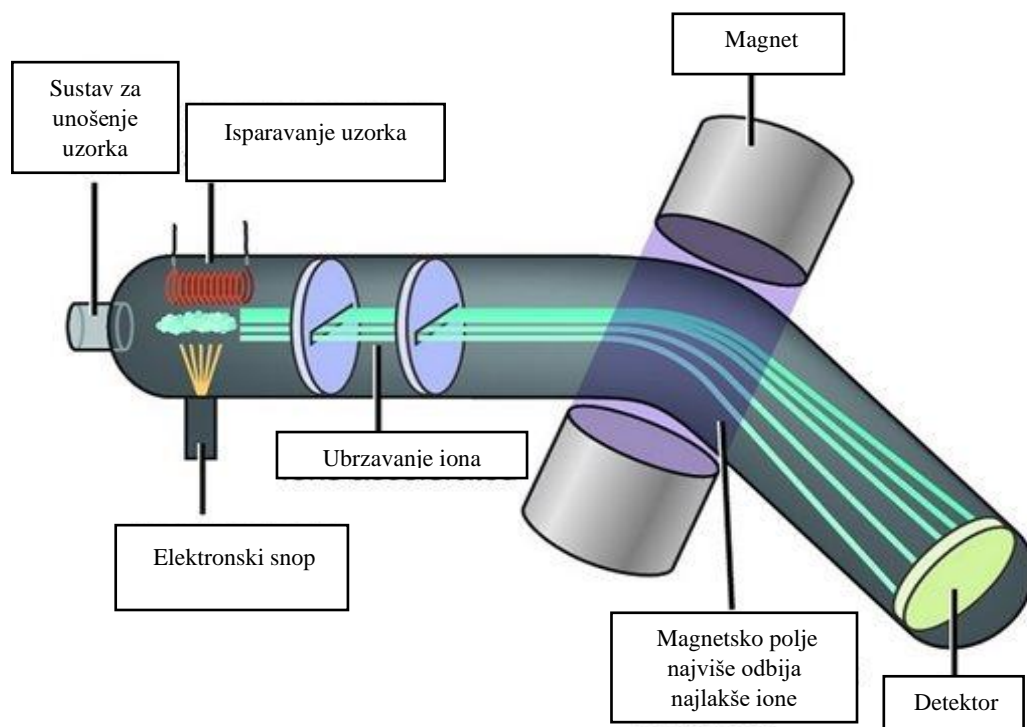


Slika 15. Shematski prikaz plinskog kromatografa

Uzorak kod plinske kromatografije mora biti preveden u plinovito stanje ako već nije u plinovitom stanju. Pokretna faza je kemijski inertan plin: argon, helij, dušik ili ugljikov dioksid. Nepokretna faza je nehlapljiva tekućina koja je nanescena na kruti nosač. Uzorak se brzo injektira kroz gumenu pregradu u kolonu. Mjesto za injektiranje uzoraka, kolona i detektor grijani su na temperature koje omogućuju plinovito stanje uzorka. Odjeljivanje na koloni plinskog kromatografa odvija se raspodjelom komponenata u plinovitom stanju između pokretne i nepokretne faze. Komponente uzorka koje se eluiraju s kolone, određuju se na detektoru koji omogućuje kvalitativno i kvantitativno određivanje eluiranih komponenti uzorka. Plinska kromatografija je jednostavna, vrlo osjetljiva i brza primijenjena tehnika za odvajanje vrlo sitnih molekula. Korisna je za odvajanje malih količina analita. Najčešće se upotrebljava za odvajanje i analizu uzoraka u farmaceutskoj, petrokemijskoj i prehrambenoj industriji.<sup>142-145</sup>

### 1.8.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je neophodna analitička metoda u kemiji, biokemiji, farmaciji i medicini. Uređaj se sastoji od tri glavna dijela: izvora iona, masenog analizatora i detektora (slika 16.).<sup>146</sup>

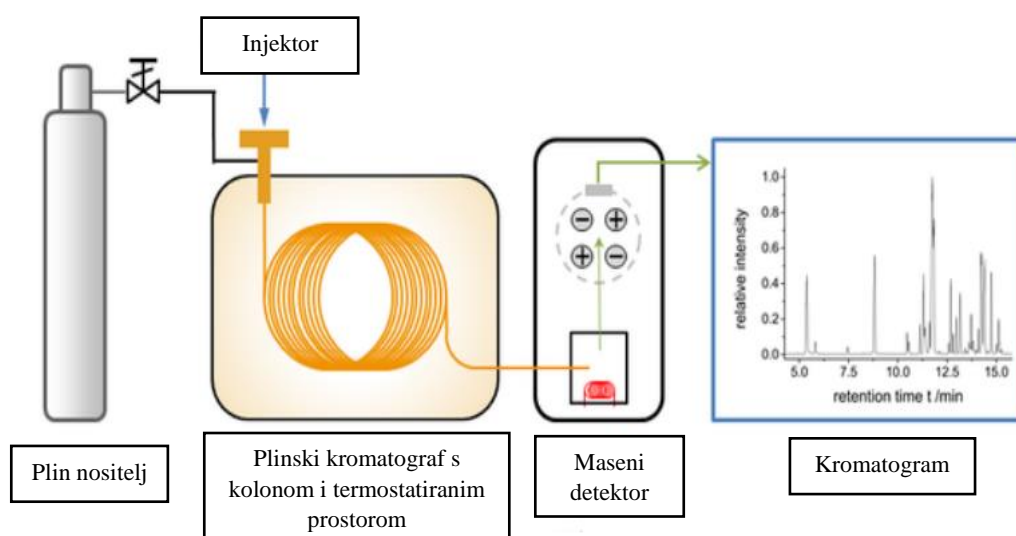


**Slika 16.** Shematski prikaz masenog spektrometra

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda kod koje se prethodno ionizirani kemijski spojevi razvrstavaju na temelju njihovog omjera mase i naboja. Pojednostavljeno, maseni spektar mjeri masu spojeva unutar uzorka. Masena spektrometrija se koristi u mnogim različitim područjima te se primjenjuje na čiste uzorke, ali i na složene smjese. Rezultat analize je maseni spektar. Na masenom spektru prikazan je ionski signal kao funkcija omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Takvi se spektri upotrebljavaju za određivanje elementarnog ili izotopnog otiska uzorka, mase čestica i molekula te razjašnjavanje kemijskih struktura molekula, poput peptida i drugih kemijskih spojeva.<sup>146,147</sup>

#### 1.8.4. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) je važna analitička metoda koja se koristi za analizu smjesa hlapljivih spojeva, odnosno njihovo razdvajanje i strukturnu analizu, a do danas je jako važna kod metabolomske analize. Na slici 17. je dan shematski prikaz GC-MS sustava. Očekuje se da će ostati glavna metoda analitičkog laboratorija, kao samostalna ili u kombinaciji s drugim metabolomskim analitičkim metodama koje mogu uključivati tekućinsku kromatografiju, kapilarnu elektroforezu ili nuklearnu magnetsku rezonanciju. Visoka osjetljivost, bolje odvajanje komponenata u plinu s obzirom na tekuću fazu, opsežne baze podataka spojeva i eksperimentalnih protokola, niži troškovi rada i popravka od svih dostupnih metabolomskih tehnologija te jednostavnost korištenja su neke od karakteristika koje GC-MS čine povoljnim za metabolomsku analizu.<sup>88,148,149</sup>



**Slika 17.** Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa

Plinska kromatografija i spektrometrija masa su komplementarne metode, a njihovom kombinacijom se postiže osjetljivost tehnike u redu pikogramskih i femtogramskih količina tvari. Važan čimbenik u radu ovog vezanog sustava je brzina snimanja spektara masa, budući da odijeljene komponente ulaze u detektor masa jedna za drugom. Rezultat GC-MS analize je kromatogram koji prikazuje kvalitativni i kvantitativni profil hlapljivih organskih spojeva u ispitivanom uzorku. GC-MS je postao bitna analitička tehnika za detekciju i istraživanje metabolita. Da bi se neki metabolit istraživao GC-MS metodom mora biti hlapljiv i termostabilan pri temperaturi od 300 °C. Napretkom analitičkih metoda, postalo je moguće razlikovati metabolite proizvedene od strane normalnih i tumorskih stanica.<sup>88,148,149</sup>

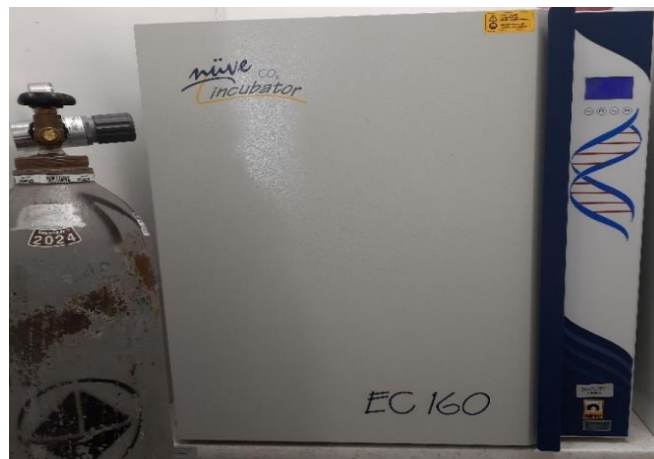
## **1.9. Primjena GC-MS metode u istraživanju raka**

Danas se sve češće provode istraživanja hlapljivih organskih spojeva primjenom GC-MS metode u izdahnutom zraku, krvi, urinu i tumorskom tkivu oboljelih od raka te se ispituje mogućnost njihovog korištenja kao bioloških markera. Kontinuirano otkrivanje biomarkera je ključno za poboljšanje rane dijagnoze, smanjenja rizika i praćenja odgovora pacijenata na liječenje. Detekcija metabolita u urinu ili biofluidima čini prednost u odnosu na klasične invazivne dijagnostičke metode. Pažnju istraživača osobito privlači urin zbog njegovog jednostavnog uzorkovanja i zato što sadrži visoke koncentracije raznih spojeva. Dosadašnja istraživanja su pokazala da u urinu oboljelih od raka pluća, dojke i bubrega postoje povišene koncentracije spojeva iz skupine alkohola, aldehida, ketona i aromatskih ugljikovodika. Kako je ovo relativno novo područje u istraživanju raka, potrebno je provesti još mnogo dodatnih istraživanja prije negoli se jedan spoj označi kao potencijalni biološki marker. Za sada je rano za implementaciju GC-MS tehnike kao kliničkog postupka koji djeluje zasebno, ali već bi se mogao koristiti kao komplementarna analiza postojećima. Budući će ishod u ovom području biti usmjeren na razumijevanje biokemijskih putova koji dovode do stvaranja različitih klasa hlapljivih spojeva te za osjetljivije i specifičnije određivanje tumorskih stanica. Općenito svaki napredak učvršćuje položaj ove metode u istraživanju raka. Nedavni tehnološki napredak ove tehnike doveo je do razvoja instrumenata koji su postali prikladniji za istraživanja. GC-MS metabolomski protokoli obuhvaćaju nekoliko koraka od kojih svaki može utjecati na kvalitetu podataka i u konačnici na uspjeh eksperimenta.<sup>149-152</sup>

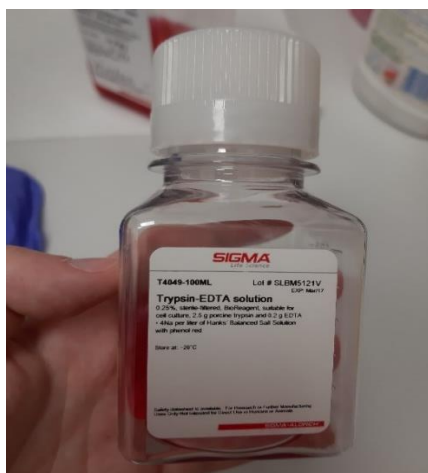
## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

## 2.1. Čuvanje i priprema stanica

Stanice se čuvaju u inkubatoru (slika 18.) pri temperaturi od 37 °C sa zasićenjem od 5 % s CO<sub>2</sub> da bi se održala pH vrijednost koja mora biti niža kako bi stanice mogle rasti. Uzgajaju se u hranjivom mediju do približno 80 % konfluentnosti, nakon čega se tretiraju miktotoksinima kako bi ih presadili. Tijekom presađivanja, stanice se ispiru sterilnim fosfatnim puferom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) bez kalcijevih i magnezijevih iona pri pH=7,4 i tretiraju tripsin-EDTA otopinom (slika 19.) koja je najčešće korištena otopina za odvajanje adherentnih stanica. Tripsin kida peptidne veze na način da razgrađuje stanične površinske proteine koji vežu stanice jednu za drugu ili za izvanstanični matriks pa se tako stanice odvoje jedna od druge i od podloge posuda u kojima se uzgajaju. To se može vidjeti pod mikroskopom (slika 20.). Zatim se stanice resuspendiraju u novom mediju.



Slika 18. Inkubator za čuvanje staničnih linija



Slika 19. Tripsin-EDTA otopina



Slika 20. Mikroskopiranje stanica

## **2.2. Ispitivanje antiproliferativnog djelovanja nootkatona**

Ovom eksperimentalnom radu prethodilo je ispitivanje antiproliferativnog djelovanja bicikličkog seskviterpena nootkatona na dvije stanične linije raka korištenjem MTT-testa. Prethodno pripremljene stanice isperu se fosfatnim puferom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) i namjeste na pH vrijednost 7,4. Zatim se tretiraju enzimom tripsinom koji ih uklanja s podloge. Prebacuju se na pločicu s 96 jažica, nadopune se medijem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) do 100  $\mu$ L te se ostave u inkubatoru 24 sata. Sljedećeg dana se medij isiše iz jažica te se dodaju tri ponavljanja uzorka otopljenog u mediju za svaku koncentraciju na pločicu s 96 jažica, uključujući i kontrole u prve tri jažice koje ne sadrže uzorak. Tretirane stanice se inkubiraju na 4, 24, 48 i 72 sata, dodaje se 100  $\mu$ L MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) te se uzorak ponovno inkubira minimalno sat vremena. Nakon toga se MTT isiše iz jažica, otapa se u 50  $\mu$ L DMSO-a (dimetil-sulfoksid: zapaljiva, higroskopna tekućina, višenamjensko otapalo) te se izmjeri apsorbancija na 570 nm. Iz dobivenih rezultata izračuna se polovica maksimalne inhibitorske koncentracije ( $IC_{50}$ ) koja označava mjeru jačine tvari u inhibiranju specifične biološke ili biokemijske funkcije. Smanjenjem koncentracije postotak preživjelih stanica raste, tj. smanjuje se antiproliferacijski učinak ispitivanih spojeva. Nootkaton je pokazao dobro sveukupno antiproliferativno djelovanje na dvije stanične linije raka.

## **2.3. Gašenje metabolizma stanica, sakupljanje i ekstrakcija metabolita**

Pri izvođenju metabolomskih eksperimenata, bitna svojstva čine reproducibilnost i robusnost kako bi se utvrdilo da su rezultirajuće biološke informacije točne i smislene. Stanične linije se često koriste kao modeli za testiranje nekog biološkog koncepta pa je potreban optimiziran te standardiziran protokol za efikasno gašenje metabolizma stanica, sakupljanje i ekstrakciju metabolita. Postoje mnoga istraživanja koja se fokusiraju na metode pripreme uzorka, međutim nijedna metoda nije široko primjenjiva za sve tipove stanica ili uvjete uzgoja. Da bi se stanice pripremile za metabolomsku analizu, potreban je postupak gašenja metabolizma stanica kojim se inaktiviraju intracelularni enzimi i zaustavlja rad metabolizma kako bi se izbjegla degradacija i promjena sastava uzorka. Priprema uzorka bi trebala biti visoko reproducibilna, robusna i brza jer se metaboličke reakcije odvijaju u milisekundama. Stoga je potrebno što brže gašenje metabolizma stanica, najčešće korištenjem hladnih organskih otapala, poput metanola. Prikupljanje

metabolita ima za cilj obnavljanje cjelokupne stanične tvari iz posude za kulturu stanica. To se postiže skidanjem stanica s podloge korištenjem strugalice ili procesom tripsinizacije. Nakon zamrzavanja metabolizma stanica i sakupljanja metabolita, njihova ekstrakcija je ključna te ona predstavlja korak koji ograničava brzinu. To je proces po kojem su specifični spojevi ili cijele klase spojeva, primjerice polarni metaboliti selektivno odvojeni od drugih (npr. lipida, proteina). Kao otapala se koriste čisti metanol, vodeni metanol ili mješavina metanola, vode i kloroforma. Ta otapala su se pokazala učinkovitima za ekstrakciju jer dovode do boljih prinosa ekstrakcije od drugih otopina, poput perklorne kiseline ili mješavine vode i acetonitrila. Metoda ekstrakcije se provodi kako bi se dobio što čišći uzorak za analizu. Predloženi ekstrakcijski protokol je prvo optimiziran na HeLa stanicama, a to je prva besmrtna tumorska stanična linija koja je dovela do brojnih medicinskih otkrića.<sup>153-160</sup>

## **POSTUPAK:**

Prvi korak u eksperimentu je rast stanica (oko 3 milijuna stanica) unutar DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medija u koji je dodano 10 % seruma goveđeg fetusa (engl. *fetal bovine serum*, FBS) i 1 % odgovarajućeg antibiotika (penicilin/streptomycin). Medij opskrbljuje stanice hranjivim tvarima (aminokiseline, glukoza) koje su potrebne za njihovo održavanje, rast i proliferaciju. Korištene su dvije stanične linije raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7 uz dodatak i bez dodatka nootkatona (kontrola). Upotrijebljen je komercijalno dobiveni nootkaton. Cilj eksperimenta je ispitati koje će metaboličke promjene izazvati dodavanje nootkatona ( $c = 0,5 \text{ mmol/L}$ ) staničnim linijama te kako se stanice ponašaju bez njegovog dodatka. Protokol uključuje ispiranje stanica, gašenje njihovog metabolizma i ekstrakciju intracelularnih metabolita. Nakon postupka čuvanja i pripreme stanica, potrebno je odbaciti medij u kojem su stanice rasle koristeći sisaljku. Odbacivanje medija je preduvjet za ekstrakciju stanica da bi se izbjegla kontaminacija ekstrakata egzogenim spojevima. Stanice treba oprati s 6 mL vrućeg fosfatnog pufera (PBS, otopina natrijevog hidrogenfosfata i natrijevog klorida s dodacima) da se medij u potpunosti ukloni. Međutim, curenje metabolita iz medija u otopinu za ispiranje može utjecati na metabolička mjerenja. Za obavljanje ovog postupka bitno je vrijeme jer procesom ispiranja stanica pada razina hranjivih tvari (osobito glukoze) koje stanice crpe iz medija. Time se mijenja metabolizam stanica, ali one su još uvijek metabolički aktivne (do zamrzavanja njihovog metabolizma), iako nemaju odakle

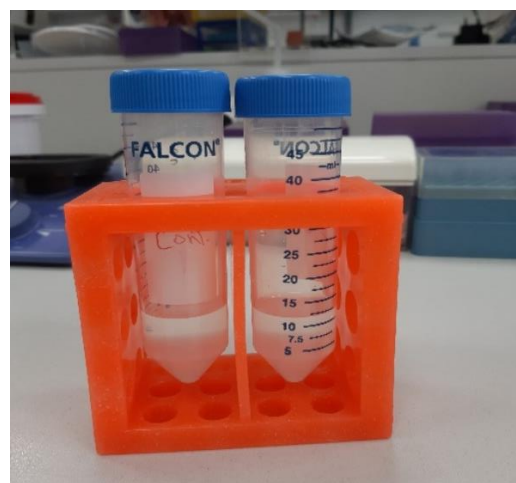


dobiti glukozu. Izmjerene koncentracije metabolita u ekstraktima ne mogu besprijekorno odražavati stvarne intracelularne koncentracije, budući da je smanjenje unutarstaničnih hranjivih tvari najvažnije tijekom prve sekunde nakon uklanjanja medija. Izmjerene razine metabolita mogu podcijeniti ili precijeniti stvarne intracelularne koncentracije zbog istjecanja u otopinu za ispiranje ili pretvorbe/razgradnje metabolita enzimskim reakcijama. Unatoč tome što je eliminacija medija ispiranjem nužan korak za promatranje bitnih endometabolomskih profila, vrijeme ostaje kritična vrijednost. Većina eksperimenata se provodi u digestoru (slika 21.)

Slijedi dodavanje hladnog metanola da bi se efikasno ugasio metabolizam stanica (kombinacija zamrzavanja i ekstrakcijskog koraka), odnosno zaustavila bilo koja metabolička aktivnost, ali bez skidanja stanica sa podloge uz korištenje specijalno dizajnirane strugalice. Dodavanjem samo čistog metanola i takvim utjecajem na metabolizam stanica, mogućnost pronalaska veće količine intracelularnih metabolita je viša, nego kod metode koja uključuje skidanje stanica uz pomoć strugalice popraćeno dodavanjem smjese metanola, vode i kloroforma. Odsutnost struganja također doprinosi ponovljivosti postupka, a prisutnost zaostalog staničnog materijala u posudama nakon zamrzavanja metabolizma stanica ili ekstrakcije metabolita omogućuje daljnju upotrebu ovog materijala. Tretiranje hladnim metanolom oštećuje staničnu membranu uzrokujući ekstrakciju metabolita u isto vrijeme. Polarni metaboliti su ekstrahirani u metanol. Zatim to treba prebaciti u Falcon tubu (slika 22.).



**Slika 21.** Mikrobiološki digestor



**Slika 22.** Polarni metaboliti u Falcon tubi

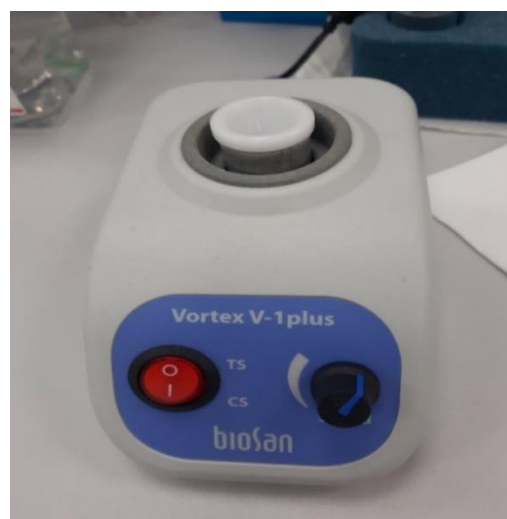
Dodaje se interni standard koji mora biti stabilan spoj i sličan spojevima u uzorku, ali ga ne smije biti u samom uzorku. Ovdje je dodano 10  $\mu$ L internog standarda ribitola,

koncentracije 0,2 mg/mL. Dobivene polarne frakcije potrebno je osušiti koristeći rotacijski vakuum uparivač (slika 23.) te ih zamrznuti na -80 °C do analize.

Sljedeći korak je uklanjanje ekstrakata iz zamrzivača i daljnje sušenje korištenjem rotacijskog vakuum uparivača (može se koristiti i dušik) tijekom 60 minuta prije daljnjeg procesiranja kako bi bili sigurni da nema zaostale vode koja može utjecati na efikasnost derivatizacije. Polarni metaboliti, poput aminokiselina i saharida ne mogu biti direktno analizirani GC-MS tehnikom zbog niske isparljivosti pa ih treba derivatizirati prije analize. Potrebno je otopiti suhi uzorak u 15 µL otopine koja sadrži 40 mg/mL metoksilamin hidroklorida u piridinu koji je jako dobro otapalo za anorganske soli i organske spojeve, to je sve popraćeno vrtnjom od 2 minute na Vortex tresilici (slika 24.) da bi se osigurala kvantitativna ekstrakcija metabolita.



**Slika 23.** Rotacijski vakuum uparivač



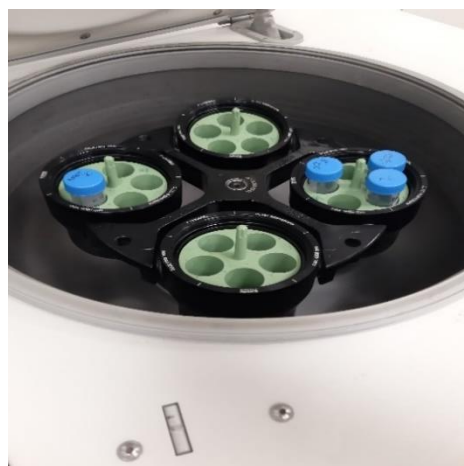
**Slika 24.** Vortex tresilica

Slijedi inkubacija (sa stalnim treskanjem) kroz 90 minuta pri temperaturi od 30 °C prije koraka sililacije. Postupak sililacije predstavlja najzastupljeniju derivatizacijsku proceduru važnu za analizu hlapljivih spojeva. Cilj sililacije je učiniti uzorke što hlapljivijima za GC-MS analizu. Najčešće korištena vrsta sililacije je metoda trimetilsililacije kojom se dobivaju termički stabilni i visoko isparljivi trimetilsilil (TMS) derivati dobrih kromatografskih karakteristika. Slijedi dodavanje 50 µL MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamid) s 1 % TMCS (trimetilklorosilan), a to su reagensi za GC-MS analizu rano eluiranih komponenata koje bi inače bile zamagljene na kromatogramu. MSTFA, najhlapljiviji dostupan TMS-amid i njegov nusprodukt N-metiltrifluoroacetamid obično se eluiraju s otapalom, što omogućuje analizu TMS

derivata malih molekula. Dodatak TMCS pomaže pri derivatizaciji amida i sekundarnih amina koji nisu derivatizirani od samog MSTFA. Slijedi inkubacija na 37 °C kroz 60 minuta za potpunu derivatizaciju, to je popraćeno otapanjem u 100  $\mu$ L piridina i vrtnjom od 2 minute. Sljedeći korak je centrifugiranje (slike 25. i 26.) ekstrakata u plastičnoj kiveri (1,5 mL), prebacivanje alikvota od 25 do 200  $\mu$ L i analiza GC-MS metodom.



Slika 25. Uređaj za centrifugiranje



Slika 26. Plastične kiverete unutar centrifuge

## 2.4. GC-MS analiza metabolita

Analiza metabolita provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS). Pri tome je korišten GC-MS sustav (slika 27.) proizvođača Agilent Technologies. Uređaj se sastoji od plinskog kromatografa 8890 i spektrometra masa 5977E.



Slika 27. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Slika 28. prikazuje uzorke postavljene u GC-MS uređaj. Unutar injektora pri temperaturi od 250 °C tekući uzorak preveden je u plinovito agregatno stanje. Iz injektora plinoviti uzorak odlazi u kromatografsku kolonu. Za separaciju metabolita upotrijebljena je kapilarna kolona Restek RTX-5MS, duljine 30 m, unutarnjeg promjera od 0,25 mm i debljine sloja stacionarne faze (5 % difenil/95% dimetilpolisiloksan) od 0,25 µm.



**Slika 28.** Uzorci postavljeni u GC-MS uređaj

Kromatografska kolona se nalazi u termostatanom prostoru – peći. Početna temperatura peći je 60 °C (održava se 2 minute). Zatim je temperatura povećana na 310 °C brzinom od 50 °C/min i održavana je tijekom analize ili je temperatura s 60 °C povećana na 210 °C brzinom od 10 °C/min, potom na 240 °C brzinom od 5 °C/min i zatim na 315 °C brzinom od 25 °C/min i održana kroz 3 minute. Pokretna faza, odnosno plin nositelj je helij protoka 1 mL/min, a omjer cijepanja je 1:5. Za identifikaciju spojeva i kvantitativnu analizu kao detektor je upotrijebljen spektrometar masa. Na ulazu u detektor temperatura je iznosila 250 °C, pri toj temperaturi je izbjegnuta kondenzacija razdvojenih spojeva. Unutar detektora molekule spojeva su bombardirane snopom elektrona energije 70 eV pri 200 °C, što je dovelo do pucanja veza unutar molekula i do fragmentacije. Detektor je bilježio pozitivno nabijene fragmente i na osnovu informacija dobivenih od detektora, računalo je zabilježilo rezultate analize u obliku grafa (x-os: masa/naboj, y-os: intenzitet pika) za svaki spoj koji je izlazio iz kromatografske kolone. Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara tih spojeva sa spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara, poput Golm Metabolome Database (GMD) i NIST 14.

### **3. REZULTATI I RASPRAVA**

### 3.1. Rezultati GC-MS analize hlapljivih spojeva

U ovom diplomskom radu su istraženi endometabolomski profili dviju staničnih linija raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7. Rezultati eksperimentalnog dijela uključuju:

- kromatograme kontrola i staničnih linija tretiranih nootkatonom (slike 29.,30.,31. i 32.)
- metabolite koje je GC-MS uređaj razdvojio i identificirao
- retencijsko vrijeme (engl. *retention time*, RT) svakog metabolita – vrijeme između pobude (injektiranja uzorka) i odziva (pojave signala na detektoru) izraženo u minutama
- semikvantitativnu normalizaciju analita korištenjem ribitola ( $c = 0,2 \text{ mg/mL}$ ) kao internog standarda prema sljedećoj formuli:

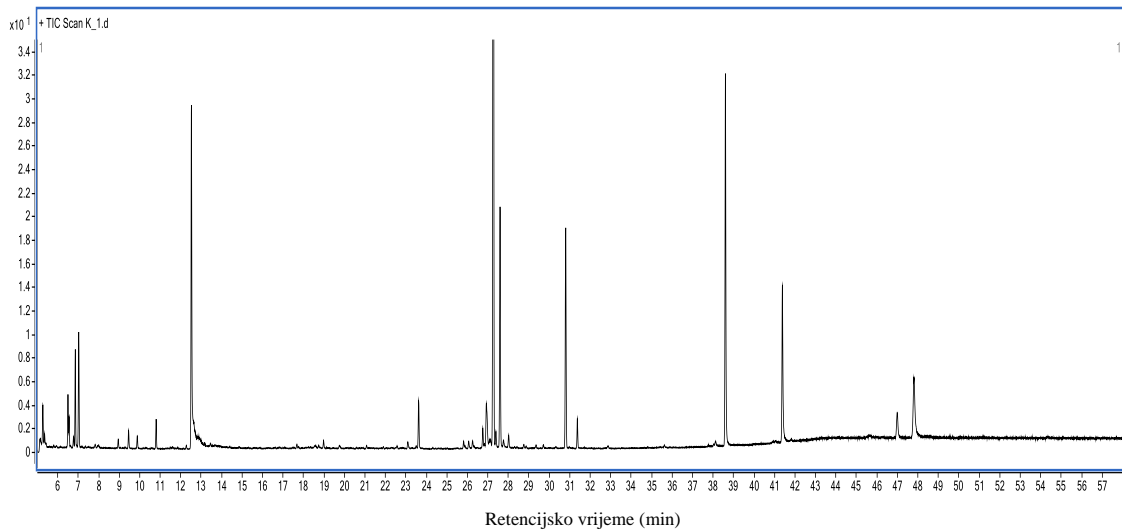
$$\text{koncentracija (analit)} = \frac{\text{površina (analit)} * \text{koncentracija (interni standard)}}{\text{površina (interni standard)}}$$

- usporedbu dobivenih koncentracija metabolita u staničnim linijama koje nisu tretirane nootkatonom (kontrola) s koncentracijama metabolita u staničnim linijama koje su tretirane nootkatonom ( $c = 0,5 \text{ mmol/L}$ )
- omjer promjene – pokazuje koliko puta je veća/manja koncentracija metabolita u kontroli u odnosu na tretirane stanice i obrnuto

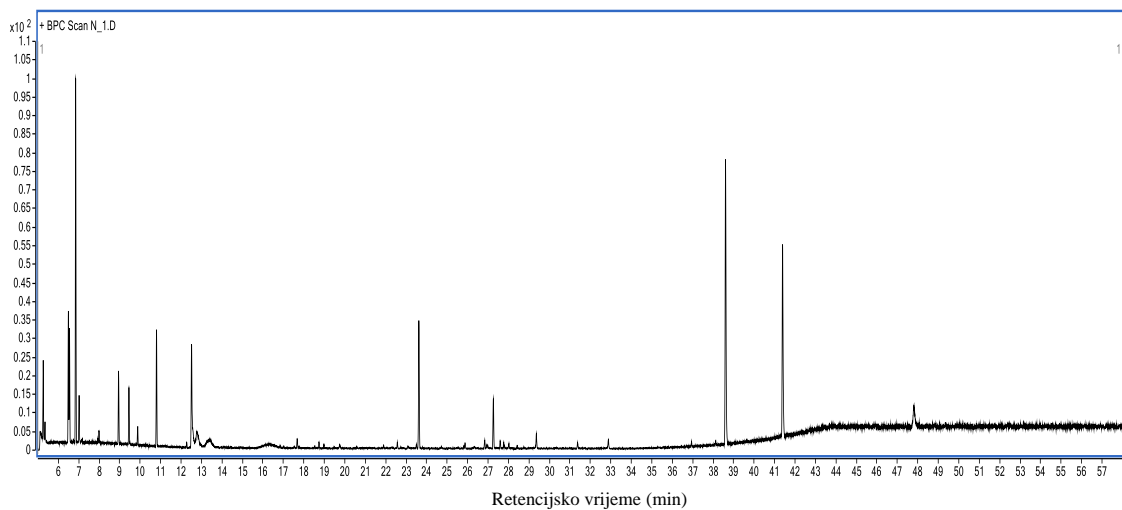
GC-MS metodom su dobiveni kromatogrami iz kojih je vidljivo da ove dvije stanične linije imaju različite metaboličke profile. Na temelju dobivenih podataka potrebno je usporediti razlike unutar istih te razlike unutar različitih staničnih linija. Tretman nootkatonom je utjecao na obje stanične linije, zato je moguće predložiti na koji je metabolički put izvršio najveći utjecaj. U tablicama 6. i 7. su prikazani rezultati GC-MS analize za obje stanične linije.

### 3.1.1. Rezultati GC-MS analize za staničnu liniju MDA-MB-231

Na slikama 29. i 30. su prikazani kromatogrami kontrole, odnosno tretiranih stanica za staničnu liniju MDA-MB-231.



**Slika 29.** Kromatogram kontrole stanične linije MDA-MB-231



**Slika 30.** Kromatogram stanične linije MDA-MB-231 tretirane nootkatonom

**Tablica 6.** Rezultati GC-MS analize za staničnu liniju MDA-MB-231

|     | <b>Metabolit</b>     | <b>Retencijsko vrijeme (RT, min)</b> | <b>Kontrola (µM)</b> | <b>Nootkaton (µM)</b> | <b>Omjer promjene</b> |
|-----|----------------------|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1.  | laktat               | 7,02                                 | 6,65                 | 0,93                  | 7,15                  |
| 2.  | fosfat               | 12,52                                | 24,33                | 3,17                  | 7,68                  |
| 3.  | ribitol              | 23,62                                | 3,27                 | 3,27                  |                       |
| 4.  | fruktoza             | 26,84                                | 1,35                 | 0,17                  | 7,94                  |
| 5.  | glukoza              | 27,27                                | 84,21                | 1,21                  | 69,60                 |
| 6.  | galaktoza            | 27,63                                | 18,06                | 0,17                  | 106,24                |
| 7.  | miinozitol           | 30,80                                | 13,77                |                       |                       |
| 8.  | oktadekanol          | 31,37                                | 1,24                 | 0,15                  | 8,27                  |
| 9.  | palmitinska kiselina | 38,60                                | 12,87                | 8,28                  | 1,55                  |
| 10. | stearinska kiselina  | 41,38                                | 5,19                 | 5,63                  | 0,92                  |
| 11. | glicerol             | 47,82                                | 2,92                 | 1,20                  | 2,43                  |

\* praznine u tablici 6. se odnose na jako niske koncentracije tih metabolita, stoga oni nisu mogli biti detektirani ili u kontroli ili u tretiranim stanicama

Tablica 6. prikazuje rezultate GC-MS analize za staničnu liniju MDA-MB-231. U kontroli stanične linije MDA-MB-231 identificirano je 11 metabolita, a u staničnoj liniji tretiranoj nootkatonom identificirano je 10 metabolita. U navedene rezultate je uključen i interni standard ribitol. Identificirani metaboliti pripadaju klasama derivata karboksilnih kiselina, alkohola, saharida i masnih kiselina. Svakog od njih karakteriziraju različita retencijska vremena te različite koncentracije unutar kontrole i unutar stanica tretiranih nootkatonom. Zbog različitih koncentracija i omjer promjene također ima drugačije vrijednosti za svaki metabolit. Vidljivo je da tretman nootkatonom uzrokuje metaboličke promjene u staničnoj liniji te da su u tretiranim stanicama uglavnom snižene koncentracije identificiranih metabolita. Najveće razlike u koncentraciji metabolita između kontrole i tretiranih stanica uočavaju se kod galaktoze i glukoze. Manje razlike se vide kod oktadekanola, fruktoze, fosfata, laktata, glicerola, palmitinske i stearinske kiseline, poredano od najvećeg prema najmanjem omjeru promjene.



Kod glukoze se uočavaju veća odstupanja zbog toga što njezin povećani metabolizam potiče nekoliko glavnih obilježja raka, kao što su prekomjerna proliferacija, antiapoptotske signalizacije, napredovanje staničnog ciklusa i angiogeneza. Isto se uočava kod galaktoze, a razlog može biti taj što ne postoje zasebni metabolički putovi za katabolizam galaktoze ni fruktoze pa se ti šećeri moraju uključiti u metabolizam glukoze. U stanicama tretiranim nootkatonom koncentracija laktata je snižena u odnosu na kontrolu, što ukazuje na to da nootkaton pomiče glikolizu prema aerobnom putu, najvjerojatnije uočenim značajnim smanjenjem broja matičnih stanica raka koje preferiraju anaerobnu glikolizu. Glikoliza povezuje glukozu, fruktozu i galaktozu jer predstavlja glavni put njihove razgradnje. Stanice raka troše glukozu u visokoj razini pa to pojačava glikolitičko djelovanje i dovodi do proizvodnje laktata. To znači da tumorske stanice metaboliziraju više glukoze u laktat, nego zdrave stanice. Tada dolazi do nakupljanja laktata i takav fenomen se zove Warburgov efekt ili aerobna glikoliza.

Smanjenje fosfata nakon tretmana nootkatonom u MDA-MB-231 stanicama moglo bi biti uzrokovano povećanim vezanjem fosfatnih iona na njihove prijenosnike u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani tijekom aerobne glikolize. Vezanje fosfata na njihove prijenosnike pogoduje vodikovim ionima prisutnim u intermembranskom mitohondrijskom prostoru tijekom aerobne glikolize. Mioinozitol je esencijalni nutrijent koji se također može dobiti iz glukoze procesom *de novo* sinteze. U kontroli vjerojatno pokazuje da djeluje na poticanje progresije tumora, dok kod tretiranih stanica puno manje jer je pronađen u jako niskim koncentracijama. Dakle, djeluje li mioinozitol na suzbijanje ili poticanje progresije tumora, određeno je metaboličkim profilom i onkogenom pozadinom raka. Glicerol se pomoću jetrenih enzima može prevesti u piruvat ili glukozu, što znači da se on i međuprodukti glikolize lako pretvaraju jedni u druge. On također kao i mioinozitol nije pronađen u visokim koncentracijama u nijednom slučaju.

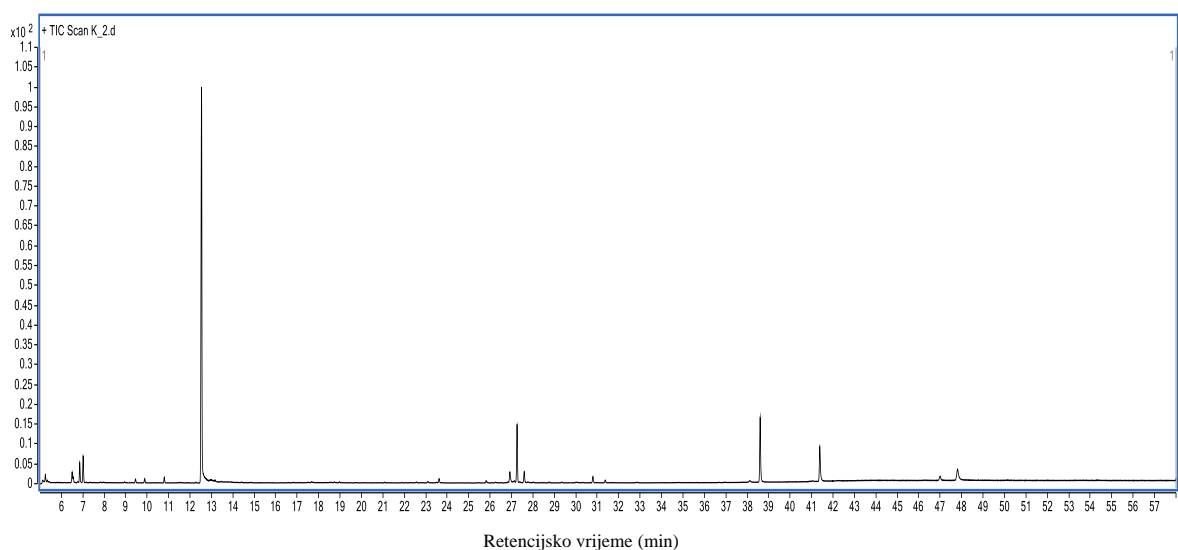
Aminokiseline nisu pronađene, što se može pripisati deregulaciji glavnih putova aminokiselina u stanicama raka. Poznato je da je metabolizam aminokiselina dereguliran u stanicama raka jer tumori ovise o aminokiselinama da održe njihovu proliferaciju kroz anabolizam proteina. Uz njihovu potencijalnu ulogu u stvaranju energije, aminokiseline imaju ključnu ulogu u održavanju stanične redoks homeostaze i pokretanja sinteze nukleozida za koju je također poznato da je deregulirana u stanicama raka. Kod masnih kiselina (palmitinska i stearinska kiselina) ne postoje velika odstupanja u kontroli i tretiranim stanicama, iako je koncentracija palmitinske kiseline veća u kontroli, a

koncentracija stearinske kiseline u tretiranim stanicama. Ukoliko bi postojala veća odstupanja, to bi moglo biti povezano s njihovim metabolizmom koji je obično pogođen u stanicama raka koje su tretirane s određenim spojevima kako bi se nadoknadila potreba za energijom. Palmitinska i stearinska kiselina imaju važnu ulogu u staničnom signaliziranju i metabolizmu kolesterola.

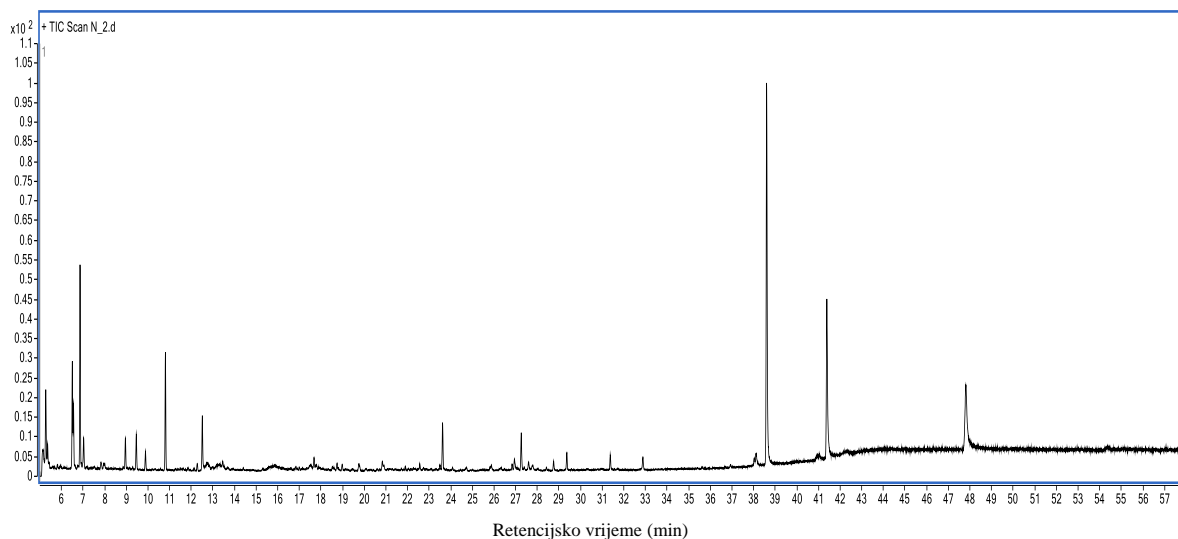
Tretman nootkatonom je najviše utjecao na metaboličke putove proizvodnje energije: glikolizu, glukoneogenezu i metabolizam masnih kiselina. S obzirom da je energijski metabolizam najviše pogođen, u tom slučaju se pospješuje i progresija tumora te eventualno nastajanje metastaza raka dojke jer su ti putovi zbog regulacije proizvodnje energije povezani s agresivnošću tumora. GC-MS analiza pokazuje niz metabolita povezanih s Warburgovim efektom, a to je karakteristična metabolička značajka stanica raka gdje se stanice oslanjaju na glikolizu kao glavni izvor energije pod aerobnim uvjetima. Rezultati analize idu u skladu s činjenicom da su gore navedeni putovi deregulirani u tumorskim stanicama, uzimajući u obzir da tumorske stanice imaju mnogo veću potražnju za ATP-om od zdravih stanica.

### 3.1.2. Rezultati GC-MS analize za staničnu liniju MCF-7

Na slikama 31 i 32. su prikazani kromatogrami kontrole, odnosno tretiranih stanica za staničnu liniju MCF-7.



**Slika 31.** Kromatogram kontrole stanične linije MCF-7



Slika 32. Kromatogram stanične linije MCF-7 tretirane nootkatonom

Tablica 7. Rezultati GC-MS analize za staničnu liniju MCF-7

|     | Metabolit            | Retencijsko vrijeme (RT, min) | Kontrola (µM) | Nootkaton (µM) | Omjer promjene |
|-----|----------------------|-------------------------------|---------------|----------------|----------------|
| 1.  | laktat               | 7,02                          | 18,38         | 1,74           | 10,56          |
| 2.  | fosfat               | 12,52                         | 3,27          | 3,22           | 1,02           |
| 3.  | ribitol              | 23,62                         | 3,27          | 3,27           |                |
| 4.  | fruktoza             | 26,84                         |               | 0,36           |                |
| 5.  | glukoza              | 27,27                         | 40,75         | 2,48           | 16,43          |
| 6.  | galaktoza            | 27,63                         | 8,66          | 0,27           | 32,07          |
| 7.  | mioinozitol          | 30,80                         | 4,76          |                |                |
| 8.  | oktadekanol          | 31,37                         |               | 0,59           |                |
| 9.  | palmitinska kiselina | 38,60                         | 50,65         | 15,95          | 3,18           |
| 10. | stearinska kiselina  | 41,38                         | 32,92         | 5,98           | 5,50           |

\* praznine u tablici 7. se odnose na jako niske koncentracije tih metabolita, stoga oni nisu mogli biti detektirani ili u kontroli ili u tretiranim stanicama

Tablica 7. prikazuje rezultate GC-MS analize za staničnu liniju MCF-7.

U kontroli stanične linije MCF-7 identificirano je 8 metabolita, a u staničnoj liniji tretiranoj nootkatonom identificirano je 9 metabolita. U navedene rezultate je uključen i interni standard ribitol. Identificirani metaboliti pripadaju klasama derivata karboksilnih kiselina, alkohola, saharida i masnih kiselina. Svakog od njih karakteriziraju različita retencijska vremena te različite koncentracije unutar kontrole i unutar stanica tretiranih nootkatonom. Zbog različitih koncentracija i omjer promjene također ima drugačije vrijednosti za svaki metabolit. Vidljivo je da tretman nootkatonom uzrokuje metaboličke promjene u staničnoj liniji te da su u tretiranim stanicama uglavnom snižene koncentracije identificiranih metabolita. Najveće razlike u koncentraciji metabolita između kontrole i tretiranih stanica uočavaju se kod galaktoze, glukoze i laktata. Manje razlike se vide kod stearinske kiseline, palmitinske kiseline i fosfata, poredano od najvećeg prema najmanjem omjeru promjene.

Galaktoza i glukoza imaju najveći omjer promjene. U tretiranim stanicama im je smanjena koncentracija zbog potencijalnog antiproliferativnog djelovanja nootkatona. Tim djelovanjem je smanjen metabolizam glukoze koji bi inače poticao obilježja raka, poput prekomjerne proliferacije. Fruktosa je pronađena u niskoj koncentraciji u tretiranim stanicama. U slučaju obilja fruktoze u stanicama raka dojke, to može biti u skladu s niskom stopom potrošnje fruktoze unutar stanica raka ili s visokim unosom fruktoze s prehranom. Prvo je povezano s niskom potrošnjom fruktoze kroz aerobnu glikolizu unutar stanica raka, dok ovo drugo podrazumijeva visoku biorasploživost fruktoze i time pružanje goriva za glavne putove središnjeg metabolizma ugljika tijekom proliferacije tumorskih stanica.

Koncentracija laktata je puno veća u kontroli, nego u tretiranim stanicama. Kao što je već primijećeno, stanice raka stvaraju energiju putem anerobne glikolize, iako one stvaraju mnogo više laktata i mnogo manje adenzin-trifosfata (ATP-a) u odnosu na zdrave stanice potpunom oksidacijom glukoze u ciklusu limunske kiseline i oksidativnom fosforilacijom. Aminokiseline nisu pronađene ni u ovoj staničnoj liniji, iako inače igraju ključnu fiziološku ulogu kao esencijalni metaboliti ili metabolički modulatori. Masne kiseline (palmitinska i stearinska kiselina) su pronađene u većim koncentracijama u kontroli. Kada se metaboliziraju u stanicama, daju velike količine energije koja služi kao gorivo za nekoliko staničnih procesa, poput ciklusa limunske kiseline i  $\beta$ -oksidacije. Štoviše, masne kiseline su također uključene u druge stanične procese, posebno u staničnoj signalizaciji i integritetu stanične membrane.

Kao i kod stanične linije MDA-MB-231, tretman nootkatonom je najviše utjecao na metaboličke putove proizvodnje energije: glikolizu, glukoneogenezu i metabolizam masnih kiselina. Također GC-MS analiza pokazuje niz metabolita povezanih s Warburgovim efektom. Različiti putovi podvrgnuti su promjenama unutar stanica raka tijekom razvoja bolesti, što može utjecati na metabolizam stanica raka u usporedbi s normalnim stanicama.

### **3.1.3. Usporedba rezultata za obje stanične linije**

U staničnoj liniji MDA-MB-231 identificirano je 11 metabolita u kontroli i 10 metabolita u stanicama tretiranim nootkatonom, a u staničnoj liniji MCF-7 identificirano je 8 metabolita u kontroli i 9 metabolita u tretiranim stanicama. Isti metaboliti su identificirani u obje stanične linije, ali u različitim koncentracijama. Određeni metaboliti su pronađeni u jako niskim koncentracijama pa te koncentracije nisu navedene u tablicama 6. i 7. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je dodatak nootkatona više utjecao na staničnu liniju MDA-MB-231 jer su pronađeni veći omjeri promjene metabolita. Ipak, imao je utjecaj i na staničnu liniju MCF-7. Kod obje stanične linije nootkaton je izvršio najveći utjecaj na koncentracije glukoze i galaktoze pa time i na metaboličke putove proizvodnje energije, poput glikolize, glukoneogeneze i metabolizma masnih kiselina. Koncentracije masnih kiselina su značajno smanjene kod MDA-MB-231 stanica, što je suglasno s činjenicom da stanice raka kako rastu u naprednije faze, mijenjaju svoje energetske zahtjeve da bi nastavile rasti i proliferirati. Međutim, uz putove energijskog metabolizma, identificiran je i Warburgov efekt kao ključna pojava kod obje stanične linije, što pokazuje da su hipoksični uvjeti ključni za opstanak i proliferaciju tih stanica. Nootkaton nije izvršio utjecaj na metabolizam aminokiselina. Razlike između staničnih linija proizlaze iz činjenice da svaka stanična linija pokazuje različite patološke i kliničke značajke. Poznato je da su MDA-MB-231 stanice neovisne o estrogenu i estrogenski receptori nisu jako izraženi, dok MCF-7 stanice ovise o estrogenima za rast i izražavaju visoke razine estrogenskih receptora. Stoga, MDA-MB-231 stanice su trostruko-negativne jer na površini tumorskih stanica nisu prisutni estrogenski i progesteronski receptori niti je prekomjerno izražen HER2 protein. MCF-7 stanice su trostruko-pozitivne jer imaju receptore za estrogen, progesteron i HER2 protein. Iz dobivenih rezultata uočavaju se velike metaboličke promjene koje je uzrokovao dodatak nootkatona staničnim linijama MDA-MB-231 i MCF-7 te metabolički putovi na koje je najvjerojatnije izvršio utjecaj.

### 3.2. Utjecaj nootkatona na stanične linije raka dojke

Ovaj eksperiment je proveden kao nastavak na moje prethodno istraživanje gdje je ispitano antiproliferativno djelovanje nootkatona na dvije stanične linije raka korištenjem MTT-testa. Ispitan je njegov utjecaj na te stanične linije i pokazano je da je imao dobar sveukupni antiproliferativni utjecaj, ali graf ovisnosti koncentracije i postotka preživjelih stanica u funkciji vremena je pokazao da je nootkaton ipak imao jači antiproliferacijski učinak na jednu staničnu liniju. Mjerenja su izvršena nakon 4, 24, 48 i 72 sata, a korištene koncentracije nootkatona su bile: 1,0 mmol/L, 0,5 mmol/L, 0,25 mmol/L, 0,125 mmol/L i 0,0625 mmol/L. Izračunata je  $IC_{50}$  vrijednost, tj. koncentracija pri kojoj je postignuta 50 % - tna smrtnost stanice. Ta koncentracija nootkatona od 0,5 mmol/L je u ovom eksperimentu izazvala promjene u stanicama raka dojke i na taj način je ispitano što se na nivou MTT-testa dogodilo u metabolizmu tih stanica.<sup>6</sup>

Dodatkom nootkatona staničnim linijama pokazano je da osim antiproliferativnog djelovanja, njegov dodatak izaziva metaboličke promjene, iako nije imao isti učinak na obje stanične linije. Njegovim dodatkom se uočavaju velika odstupanja u odnosu na kontrolu. U obje stanične linije se snižavaju koncentracije metabolita, osobito onih koji su uključeni u metabolizam glukoze. Na taj je način nootkaton najviše pogodio energijski metabolizam MDA-MB-231 i MCF-7 staničnih linija raka dojke. To se događa zbog povećane potrebe tumorskih stanica za ATP-om u odnosu na zdrave stanice.

## **4. ZAKLJUČAK**

Rak je bolest kod koje stanice nekontrolirano rastu i šire se na druge dijelove tijela. Može započeti gotovo bilo gdje u ljudskom tijelu. Normalno, ljudske stanice rastu i množe se (kroz proces koji se zove dioba stanica) kako bi formirale nove stanice prema potrebi tijela. Kada stanice stare ili se oštete, one umiru, a nove stanice zauzimaju njihovo mjesto. Ponekad se ovaj uredan proces poremeti, a abnormalne ili oštećene stanice nekontrolirano rastu i množe se. Ove stanice mogu formirati tumore koji su nakupine tkiva. Tumori mogu biti benigni (dobročudni) i maligni (zloćudni), a prema tipu stanica od kojih je rak sastavljen glavne podvrste su: karcinomi, sarkomi, limfomi, leukemije i mijelomi. Rak dojke je najčešća vrsta raka koja se pojavljuje kod žena. Većina tumora dojke ima receptore za estrogen, progesteron i humani epidermalni faktor rasta (HER2) te to ih čini trostruko-pozitivnima. Ukoliko nemaju receptore, tada su trostruko-negativni tumori dojke i u tom slučaju ne reagiraju na hormonsku terapiju. U liječenju raka dojke primjenjuje se niz lokalnih i sustavnih metoda, a najbolji rezultati se postižu njihovom kombinacijom.

Metabolomika je znanstveno istraživanje koje uključuje identifikaciju i proučavanje metabolita koji sudjeluju u biokemijskim putovima. Metaboličko profiliranje stanica raka može imati važnu ulogu u otkrivanju molekularne osnove, razvoja i progresije raka. U ovom diplomskom radu su korištene dvije stanične linije raka dojke, MDA-MB-231 i MCF-7. Poznato je da su MDA-MB-231 stanice trostruko-negativne, a MCF-7 stanice trostruko-pozitivne. Protokolom koji se temelji na gašenju metabolizma stanica, sakupljanju i ekstrakciji metabolita ispitano je ponašanje tih stanica uz dodatak i bez dodatka nootkatona. Metodom vezanog sustava plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) ukupno je identificirano 11 metabolita u prvoj i 10 metabolita u drugoj staničnoj liniji. Koncentracije identificiranih metabolita su snižene u tretiranim stanicama. U obje stanične linije, najveće razlike u koncentraciji metabolita između kontrole i tretiranih stanica uočavaju se kod galaktoze i glukoze. Ipak, dodatak nootkatona je više utjecao na staničnu liniju MDA-MB-231 gdje su pronađene veće razlike u koncentracijama metabolita. Nootkaton je izvršio najveći utjecaj na metaboličke putove glukoze/energije, specifično na glikolizu, glukoneogenezu i metabolizam masnih kiselina, a nije izvršio utjecaj na metabolizam aminokiselina. Rezultati pokazuju da je dodatak nootkatona izazvao metaboličke promjene u obje stanične linije te da one imaju različite metaboličke profile.



## **5. LITERATURA**

1. *G. M. Cooper, R. E. Hausman*, Stanica-molekularni pristup, Medicinska naklada, Zagreb, 2010, str. 725-739.
2. URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (26.5.2021.)
3. *T. Čufer*, Maligni tumori - rak dojke, *Medicus* **10** (2001) 173-178.
4. URL: [https://hr.wikipedia.org/wiki/Stani%C4%8Dna\\_kultura](https://hr.wikipedia.org/wiki/Stani%C4%8Dna_kultura) (27.5.2021.)
5. URL: <https://hemp.hr/terpeni/terpeni/> (27.5.2021.)
6. *A. Šunjerga*, Antiproliferativno djelovanje nootkatona na dvije stanične linije raka, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2019.
7. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Nootkatone> (27.5.2021.)
8. *J. Jakobović*, Od genomike do metabolomike analgetika u djece, *Medicus* **23** (2014) 117-126.
9. URL: <https://www.onkologija.hr/sto-je-rak/> (27.5.2021.)
10. *A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman*, Global Cancer Statistics, CA: A cancer journal for clinicians **61** (2011) 69-90.
11. *D. M. Hausman*, What is cancer?, *Perspectives in Biology and Medicine*, Department of Philosophy, University of Wisconsin-Madison, University Press **62** (2019) 778-786.
12. *R. W. Ruddon*, *Cancer biology* 4th Edition, Oxford University Press, New York, 2007, str. 4-429.
13. *M. M. Russo, T. Sundaramurthi*, An overview of cancer pain: Epidemiology and pathophysiology, *Seminars in oncology nursing* **35** (2019) 223-228.
14. URL: <https://www.onkologija.hr/lijecenje-raka/> (30.5.2021.)
15. URL: <https://www.onkologija.net/vrste-raka> (2.6.2021.)
16. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cancer#Pathophysiology> (2.6.2021.)
17. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_cancer\\_types](https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_cancer_types) (3.6.2021.)
18. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i-onkologija/limfomi/hodgkinov-limfom> (3.6.2021.)
19. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/bolesti-krvi-i-krvotoka/limfomi/ne-hodgkinov-limfom> (3.6.2021.)
20. URL: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/leukemia/symptoms-causes/syc-20374373> (3.6.2021.)
21. URL: <https://mijelom.hr/sto-je-mm-2/> (4.6.2021.)

22. *P. A. Oliveira, A. Colaço, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, L. F. de-la-Cruz P., C. Lopes*, Chemical carcinogenesis, *Anais de academia brasileira de ciências* **79** (2007) 593-616.
23. *T. A. Graham, A. Sottoriva*, Measuring cancer evolution from the genome, *The Journal of pathology* **241** (2017) 183-191.
24. *M. Ramirez*, Review carcinogenesis, *Academia* **17** (2001) 16-24.
25. *R. W. Clapp, G. K. Howe, M. M. Jacobs*, Environmental and occupational causes of cancer: A call to act on what we know, *Biomedicine and Pharmacotherapy* **61** (2007) 631-639.
26. URL: <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/cancer/cancer/cancer-causes.html> (18.6.2021.)
27. *B. N. Ames, L. S. Gold, W. C. Willett*, The causes and prevention of cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92** (1995) 5258-5265.
28. URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/symptoms> (18.6.2021.)
29. URL: <https://www.webmd.com/cancer/guide/understanding-cancer-symptoms> (19.6.2021.)
30. URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/symptoms> (21.6.2021.)
31. URL: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/diagnosis-treatment/drc-20370594> (21.6.2021.)
32. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/rak/dijagnostika-raka/dijagnosticiranje-raka> (22.6.2021.)
33. *T. A. Baudino*, Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment, *Current drug discovery technologies* **12** (2015) 3-20.
34. URL: <https://www.onkologija.hr/lijecenje-raka/> (30.6.2021.)
35. *C. Mattiuzzi, G. Lippi*, Current cancer epidemiology, *Journal of epidemiology and global health* **9** (2019) 217-222.
36. *M. Šekerija, Lj. Bubanović, P. Novak, J. Lončar, P. Čukelj, J. Veltruski, M. Glibo, K. Korda*, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske, Incidencija raka u Hrvatskoj, *Bilten* 43, Zagreb, 2020.
37. OECD/European Observatory on Health Systems and Policies (2021), Hrvatska: pregled stanja zdravlja i zdravstvene zaštite 2021., *State of Health in the EU*, OECD Publishing, Paris/European Observatory on Health Systems and Policies, Brussels

38. *M. H. Semreen, H. Alniss, S. Cacciatore, R. El-Awady, M. Mousa, A. M. Almehdi, W. El-Huneidi, L. Zerbini, N. C. Soares*, GC–MS based comparative metabolomic analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells treated with Tamoxifen and/or Paclitaxel, *Journal of Proteomics* **225** (2020) 103875.
39. *I. Erić, A. Petek Erić, J. Kristek, I. Koprivčić, M. Babić*, Breast Cancer in Young Women: Pathologic and Immunohistochemical Features, *Acta clinica Croatica* **57** (2018), 497-502.
40. *Y. S. Sun, Z. Zhao, Z. N. Yang, F. Xu, H. J. Lu, Z. Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P. P. Yao, H. P. Zhu*, Risk Factors and Preventions of Breast Cancer, *International Journal of Biological Sciences* **13** (2017) 1387-1397.
41. *J. Abraham, J. L. Gulley, C. J. Allegra*, *The Bethesda Handbook of Clinical Oncology* 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2014, str. 184.
42. *B. Weigelt, F. C. Geyer, J. S. Reis-Filho*, Histological types of breast cancer: How special are they?, *Molecular Oncology* **4** (2010) 192-208.
43. *A. Prat, C. M. Perou*, Deconstructing the molecular portraits of breast cancer, *Molecular Oncology* **5** (2011) 5-23.
44. *J. R. C. Sainsbury, T. J. Anderson, D. A. L. Morgan*, ABC of breast diseases: breast cancer, *BMJ: British Medical Journal* **321** (2000) 745.
45. URL: <https://www.zzjzdnz.hr/hr/zdravlje/prevenција-raka/1321> (17.8.2021.)
46. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/specifne-bolesti-zena/bolesti-dojke/rak-dojke> (17.8.2021.)
47. *L. Bratko*, Rak dojke, Završni rad, Studij sestrinstvo, Sveučilište Sjever, Varaždin, 2015.
48. *R. Barroso-Sousa, O. Metzger-Filho*, Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: results and therapeutic implications, *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **8** (2016) 261-266.
49. *M. Boranić*, Etiologija i patogeneza tumora dojke, *Medicinski vjesnik* **38** (2006) 33-42.
50. *M. Šamija, S. Juzbašić, V. Šeparović, V. D. Vrdoljak*, Tumori dojke, Medicinska naklada, Zagreb, 2007, str. 1-50.
51. URL: <https://poliklinika-aviva.hr/zdravisavjeti/rak-dojke/> (20.8.2021.)
52. *T. J. Key, P. K. Verkasalo, E. Banks*, Epidemiology of breast cancer, *The lancet oncology* **2** (2001) 133-140.

53. *J. Korkola, J. W. Gray*, Breast cancer genomes – form and function, *Current opinion in genetics & development* **20** (2010) 4-14.
54. *C. Osborne, P. Wilson, D. Tripathy*, Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications, *The oncologist* **9** (2004) 361-377.
55. *R. A. Weinberg*, Oncogenes, antioncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis, *Cancer research* **49** (1989) 3713-3721.
56. *J. G. Brody, R. A. Rudel*, Environmental pollutants and breast cancer, *Environmental Health Perspectives*, **111** (2003), 1007-1019.
57. *K. Pavelić*, Genetski čimbenici i infektivni agensi u etiologiji zloćudnih tumora, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **51** (2000) 23-29.
58. *S. Oesterreich, S. A. W. Fuqua*, Tumor suppressor genes in breast cancer, *Endocrine-related cancer* **6** (1999) 405-419.
59. *N. Pećina-Šlaus, F. Bulić-Jakuš, K. Radić*, Tumor supresorski geni, *Medicinar, Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*, str. 44.-47.
60. *I. Franić*, Tumor supresorski geni u raku dojke, *Završni rad, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek*, 2021.
61. *E. E. Bosco*, The retinoblastoma tumor suppressor modifies the therapeutic response of breast cancer, *The Journal of clinical investigation* **117** (2007) 218-228.
62. *S. Levanat, M. Levačić-Cvok*, Molekularna osnova raka dojke vezana uz gene BRCA1 i BRCA2: Karakteristike i ciljana terapija, *Liječnički vjesnik* **132** (2010) 34-37.
63. *A. L. Borresen-Dale*, TP53 and breast cancer, *Human mutation* **21** (2003) 292-300.
64. *W. W. Hwang-Verslues, K. J. Chang, E. Y.-H. P. Lee, W. H. Lee*, Breast cancer stem cells and tumor suppressor genes, *Journal of the Formosan Medical Association* **107** (2008) 751-766.
65. URL: <https://poliklinika-analiza.hr/prvi-simptomi-karcinoma-dojke/> (4.9.2021.)
66. *U. Veronesi, P. Boyle, A. Goldhirsch, R. Orecchia, G. Viale*, Breast cancer, *Lancet* **365** (2005) 1727-1741.
67. URL: <https://www.onkologija.hr/rak-dojke/rak-dojke-lijecenje/> (4.9.2021.)
68. *E. Washbrook*, Risk factors and epidemiology of breast cancer, *Women's health medicine* **3** (2006) 8-14.
69. *L. Iacoviello, M. Bonaccio, G. de Gaetano, M. B. Donati*, Epidemiology of breast cancer, a paradigm of the “common soil” hypothesis, *Seminars in Cancer Biology* **72** (2021) 4-10.

70. URL: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-programe-probira-raka-dojke/> (7.9.2021.)
71. Z. Zore, M. Stanec, I. Milas, I. Penavić, T. Orešić, A. Roth, D. Mužina, Epidemiologija invazivnih tumora dojke s obzirom na patohistološke i imunohistokemijske prognostičke čimbenike, *Acta medica Croatica: Časopis Akademije medicinskih znanosti Hrvatske* **66** (2012) 315-320.
72. URL: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/obiljezen-dan-narcisa-2021/> (7.9.2021.)
73. A. B. Ulrich, P. M. Pour, *Encyclopedia of genetics: Cell lines*, Academic Press, New York, 2001, str. 123-155.
74. G. Kaur, J. M. Dufour, Cell lines: Valuable tools or useless artifacts, *Spermatogenesis* **2** (2012) 1-5.
75. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Immortalised\\_cell\\_line](https://en.wikipedia.org/wiki/Immortalised_cell_line) (12.9.2021.)
76. V. Hribljan, Stanične linije u istraživanju malignih tumora, Završni rad, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2021.
77. T. Fisher, *Cell culture basics handbook: Culturing mammalian cells*, Molecular biology techniques, 2016, str. 137-142.
78. URL: <https://hr.thpanorama.com/articles/qumica/caja-de-petri-charactersticas-usos-y-historia.html> (14.9.2021.)
79. R. Cailleau Olivé, Q. V. J. Cruciger, Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization, *In vitro* **14** (1978) 911-915.
80. K. J. Chavez, S. V. Garimella, S. Lipkowitz, Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer, *Breast disease* **32** (2010) 35-48.
81. D. L. Holliday, V. Speirs, Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast cancer research* **13** (2011) 1-7.
82. A. Sulaiman, S. McGarry, X. Han, S. Liu, L. Wang, CSCs in breast cancer-one size does not fit all: Therapeutic advances in targeting heterogeneous epithelial and mesenchymal CSCs, *Cancers* **11** (2019) 1128.
83. P. A. Kenny, G. Y. Lee, C. A. Myers, R. M. Neve, J. R. Semeiks, P. T. Spellman *i sur.*, The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression, *Molecular oncology* **1** (2007) 84-96.
84. Ş. Comşa, A. M. Cîmpean, M. Raica, The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research, *Anticancer research* **35** (2015) 3147-3154.

85. *A. S. Levenson, V. C. Jordan*, MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line, *Cancer research* **57** (1997) 3071-3078.
86. *J. Welsh*, Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer, *Animal models for the study of human disease* (2013) 997-1018.
87. *M. Abercrombie, E. J. Ambrose*, The surface properties of cancer cells: A review, *Cancer research* **22** (1962) 525-548.
88. *I. Jerković, I. Blažević*, Nastavni materijali iz Kemije i tehnologije aromatičnog bilja (nerecenzirani), Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet
89. *D. Cox-Georgian, N. Ramadoss, C. Dona, C. Basu*, Therapeutic and medicinal uses of terpenes, *Medicinal plants* (2019) 333-359.
90. *R. Paduch, M. Kandefor-Szerszeń, M-Trytek, J. Fiedurek*, Terpenes: substances useful in human healthcare, *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* **55** (2007) 315-327.
91. *G. Babaei, A. Aliarab, S. Abroon, Y. Rasmi, S. Gholizadeh-Ghaleh Aziz*, Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity, *Biomedicine & Pharmacotherapy* **106** (2018) 239-246.
92. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nootkatone> (2.10.2021.)
93. *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) 153000.
94. *M. A. Fraatz, R. G. Berger, H. Zorn*, Nootkatone – a biotechnological challenge, *Applied microbiology and biotechnology* **83** (2009) 35-41.
95. *R. H. Leonhardt, R. G. Berger*, Nootkatone, *Biotechnology and Isoprenoids* (2014) 391-404.
96. URL:  
[https://www.biocompare.com/pfu/12006293/soids/22628382281088/Cell\\_Viability\\_and\\_Proliferation\\_Assays/Cell\\_Viability\\_and\\_Proliferation\\_MTT\\_Assay](https://www.biocompare.com/pfu/12006293/soids/22628382281088/Cell_Viability_and_Proliferation_Assays/Cell_Viability_and_Proliferation_MTT_Assay)  
(5.10.2021.)
97. *B. Aslam, M. Basit, M. A. Nisar, M. Khurshid, M. H. Rasool*, Proteomics: technologies and their applications, *Journal of chromatographic science* **55** (2017) 182-196.
98. URL: <https://hr.differencevs.com/6852029-difference-between-proteomics-and-transcriptomics> (11.10.2021.)

99. *G. Moros, A. C. Chatziioannou, H. G. Gika, N. Raikos, G. Theodoridis*, Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples, *Bioanalysis* **9** (2017) 53-65.
100. *C. H. Johnson, F. J. Gonzalez*, Challenges and Opportunities of Metabolomics, *Journal of cellular physiology* **227** (2012) 2975-2981.
101. *J. Adamski*, Introduction to metabolomics, *Metabolomics for Biomedical Research*, Academic Press, 2020, str. 1-15.
102. *K. Dettmer, P. A. Aronov, B. D. Hammock*, Mass spectrometry-based metabolomics, *Mass spectrometry reviews* **26** (2007) 51-78.
103. *M. H. Semreen, H. Y. Alniss, S. R. Grgic, R. A. El-Awady, A. H. Almehdi, M. K. Mousa, R. A. Hamoudi*, Comparative metabolomics of MCF-7 breast cancer cells using different extraction solvents assessed by mass spectroscopy, *Scientific reports* **9** (2019) 1-9.
104. *U. Roessner, J. Bowne*, What is metabolomics all about?, *Biotechniques* **46** (2009) 363-365.
105. *D. S. Wishart*, Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes, *Physiological Reviews* **99** (2019) 1819-1875.
106. *N. L. Henry, D. F. Hayes*, Cancer biomarkers, *Molecular oncology* **6** (2012) 140-146.
107. *R. Mayeux*, Biomarkers: potential uses and limitations, *NeuroRx* **1** (2004) 182-188.
108. *A. Macklin, S. Khan, T. Kislinger*, Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research, *Clinical proteomics* **17** (2020) 1-25.
109. *K. Ilić, V. Kuntić*, Uloga biomarkera i surogatnih parametara u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima lekova, *Vojnosanitetski pregled* **64** (2007) 561-567.
110. URL: [https://www.cybermed.hr/clanci/tumorski\\_biljezi\\_tumorski\\_markeri](https://www.cybermed.hr/clanci/tumorski_biljezi_tumorski_markeri) (25.10.2021.)
111. *J. L. Perez-Gracia et al.*, Strategies to design clinical studies to identify predictive biomarkers in cancer research, *Cancer treatment reviews* **53** (2017) 79-97.
112. URL: [https://www.breyer.hr/clanci/tumorskimarkeri?gclid=EAIaIQobChMI78u82LON8wIVRaOyCh2qOwnEEAMYAiAAEgJJffD\\_BwE](https://www.breyer.hr/clanci/tumorskimarkeri?gclid=EAIaIQobChMI78u82LON8wIVRaOyCh2qOwnEEAMYAiAAEgJJffD_BwE) (25.10.2021.)



113. *A. M. Kabel*, Tumor markers of breast cancer: New perspectives, *Journal of Oncological Sciences* (2017) 1-7.
114. URL: <https://poliklinika-analiza.hr/ca-15-3/> (27.10.2021.)
115. URL:  
[https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=167&contentid=ca\\_27\\_29](https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?contenttypeid=167&contentid=ca_27_29) (27.10.2021.)
116. *R. H. Fletcher*, Carcinoembryonic antigen, *Annals of internal medicine* **104** (1986) 66-73.
117. *M. J. Duffy, S. Walsh, E. W. McDermott, J. Crown*, Biomarkers in breast cancer: where are we and where are we going?, *Advances in clinical chemistry* **71** (2015) 1-23.
118. *S. Bertozzi, A. P. Londero, L. Seriau, R. Di Vora, C. Cedolini, L. Mariuzzi*, Biomarkers in breast cancer, *Biomarker - Indicator of Abnormal Physiological Process* **1** (2018) 3-29.
119. *M. T. Weigel, M. Dowsett*, Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction, *Endocrine-related cancer* **17** (2010) R245-R262
120. *M. Vučić, T. Leniček, H. Čupić, D. Tomas, B. Krušlin, M. Belicza*, Is there a correlation between HER-2/Neu status and grade of the primary breast cancer?, *Acta clinica Croatica* **42** (2003) 183-188.
121. *K. Hollywood, D. R. Brison, R. Goodacre*, Metabolomics: current technologies and future trends, *Proteomics* **6** (2006) 4716-4723.
122. *Q. Yang, A. Zhang, J. Miao, H. Sun, Y. Han, G. Yan, F. Wu, X. Wang*, Metabolomics biotechnology, applications and future trends: a systematic review, *RSC Advances* **9** (2019) 37245-37257.
123. *S. J. Harrison, M. J. Herrgard*, The uses and future prospects of metabolomics and targeted metabolite profiling in cell factory development, *Industrial Biotechnology* **9** (2013) 196-202.
124. *R. J. DeBerardinis, N. S. Chandel*, Fundamentals of cancer metabolism, *Science advances* **2** (2016) 1-18.
125. *M. G. Vander Heiden, R. J. DeBerardinis*, Understanding the intersections between metabolism and cancer biology, *Cell* **168** (2017) 657-669.
126. *C. Thakur, F. Chen*, Connections between metabolism and epigenetics in cancers, *Seminars in cancer biology* **57** (2019) 52-58.

127. *J. W. Locasale, L. C. Cantley*, Altered metabolism in cancer, *BMC biology* **8** (2010) 1-3.
128. *Y. Wang, Y. Xia, Z. Lu*, Metabolic features of cancer cells, *Cancer Communications* **38** (2018) 1-6.
129. *D. I. Benjamin, B. F. Cravatt, D. K. Nomura*, Global profiling strategies for mapping dysregulated metabolic pathways in cancer, *Cell metabolism* **16** (2012) 565-577.
130. *Z. G. Movahed, M. Rastegari-Pouyani, M. hossein Mohammadi, K. Mansouri*, Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer to cancer stem cell?, *Biomedicine & Pharmacotherapy* **112** (2019) 1-15.
131. *F. Chiaradonna, R. M. Moresco, C. Airoidi, D. Gaglio, R. Palorini, F. Nicotra, C. Messa, L. Alberghina*, From cancer metabolism to new biomarkers and drug targets, *Biotechnology Advances* **30** (2012) 30-51.
132. *J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer*, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 444-445.
133. *S. J. Bensinger, H. R. Christofk*, New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology, *Seminars in cell & developmental biology* **23** (2012) 352-361.
134. *C. Thakur, F. Chen*, Connections between metabolism and epigenetics in cancers, *Seminars in cancer biology* **57** (2019) 52-58.
135. *M. A. Medina*, Glutamine metabolism: Nutritional and Clinical Significance (2000) 2539S-2542S.
136. *Y. P. Wang, Q. Y. Lei*, Perspectives of reprogramming breast cancer metabolism, *Translational Research in Breast cancer* (2017) 217-232.
137. *A. S. Dias, C. R. Almeida, L. A. Helguero, I. F. Duarte*, Metabolic crosstalk in the breast cancer microenvironment, *European Journal of Cancer* **121** (2019) 154-171.
138. *C. Y. Lin, M. R. Viant, R. S. Tjeerdema*, Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences, *Journal of Pesticide Science* **31** (2006) 245-251.
139. *K. Segers, S. Declerck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, A. Van Eeckhaut*, Analytical techniques for metabolomic studies: a review, *Bioanalysis* **11** (2019) 2297-2318.
140. *L. Kong, A. Zhang, S. Qiu, X. Wang*, Innovations in analytical techniques of metabolomics, *Mass Spectrometry-Based Metabolomics in Clinical and Herbal Medicines: Strategies, Technologies and Applications* (2021) 19-31.

141. *H. J. Issaq, Q. N. Van, T. J. Waybright, G. M. Muschik, T. D. Veenstra*, Analytical and statistical approaches to metabolomics research, *Journal of separation science* **32** (2009) 2183-2199.
142. *O. Coskun*, Separation techniques: Chromatography, *North Clin Istanbul* **3** (2016) 156-160.
143. *Nj. Radić, L. Kukoč Modun*, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 630-655.
144. *S. P. Putri, S. Yamamoto, H. Tsugawa, E. Fukusaki*, Current metabolomics: Technological advances, *Journal of bioscience and bioengineering* **116** (2012) 1-8.
145. *S. Telen, N. Jambrec, I. S. Beer Romac*, FCC gasoline research octane number determination by gas chromatography, *Goriva i maziva: časopis za tribologiju, tehniku podmazivanja i primjenu tekućih i plinovitih goriva i inženjerstvo izgaranja* **42** (2003) 95-105.
146. *J. H. Gross*, Mass spectrometry: a textbook, Springer science & Business Media, 2006, str. 1
147. URL: <https://labtim.hr/> (15.11.2021.)
148. *H. Kanani, P. K. Chrysanthopoulos, M. I. Klapa*, Standardizing GC-MS metabolomics, *Journal of Chromatography B* **871** (2008) 191-201.
149. Priroda, mjesečnik za popularizaciju prirodnih znanosti Hrvatskog prirodoslovnog društva, str. 45-46.
150. *G. Lubes, M. Goodarzi*, GC-MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds as biomarkers, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **147** (2018) 313-322.
151. *D. Rodrigues, J. Pinto, A. M. Araújo, C. Jerónimo, R. Henrique, M. de Lourdes Bastos, P. Guedes de Pinho, M. Carvalho*, GC-MS metabolomics reveals distinct profiles of low-and high-grade bladder cancer cultured cells, *Metabolites* **9** (2019) 1-11.
152. *F. Grimm, L. Fets, D. Anastasiou*, Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) to study metabolism in cultured cells, *Tumor Microenvironment*, Springer, Cham, 2016, str. 59-88.
153. *M. Ivanov*, Primjena eutektičkih otapala i novih tehnologija u izolaciji lignana i fenolnih kiselina iz pogače lana, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2018.

154. *S. Kravić, Z. Stojanović, A. Đurović*, Stručni rad - Analiza biljnog polimera kutina, XII savjetovanje hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2018.
155. *R. Fritsche-Guenther, A. Bauer, Y. Gloaguen, M. Lorenz, J. A. Kirwan*, Modified protocol of harvesting, extraction, and normalization approaches for gas chromatography mass spectrometry-based metabolomics analysis of adherent cells grown under high fetal calf serum conditions, *Metabolites* **10** (2019) 1-14.
156. *M. Mili, B. Panthu, A. M. Madec, M. A. Chauvin, G. J. P. Rautureau*, Fast and ergonomic extraction of adherent mammalian cells for NMR-based metabolomics studies, *Analytical and bioanalytical chemistry* **412** (2021) 1-23.
157. *K. Brajković*, Praćenje učinaka ekstrakta đumbira na tumorskoj staničnoj liniji HeLa, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2018.
158. URL: <https://hr.eferrit.com/sto-su-hela-stanice-i-zasto-su-vazni/> (15.11.2021.)
159. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/TS-48911> (2.12.2021.)
160. *L. Barberini, A. Restivo, A. Noto, S. Deidda, C. Fattuoni, V. Fanos, L. Saba, L. Zorcolo, M. Mussap*, A gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) metabolomic approach in human colorectal cancer (CRC): the emerging role of monosaccharides and amino acids, *Annals of Translational Medicine* **7** (2019) 1-10.