

# Citotoksično djelovanje hlapljivih izolata iz biljaka porodice lukova (*Allium* spp.) dobivenih razgradnjom potpomognutom mikrovalovima

---

**Kljenak, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:423239>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



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

**Petra Kljenak**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE HLAPLJIVIH IZOLATA IZ BILJAKA  
PORODICE LUKOVA (*ALLIUM SPP.*) DOBIVENIH RAZGRADNJOM  
POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:  
2018./2019.**

**Mentor:  
Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad, 2019. godine**

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

**Petra Kljenak**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE HLAPLJIVIH IZOLATA IZ BILJAKA  
PORODICE LUKOVA (*ALLIUM SPP.*) DOBIVENIH RAZGRADNJOM  
POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:  
2018./2019.**

**Mentor:  
Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, listopad, 2019. godine**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti

**Znanstveno polje:** Farmacija

**Nastavni predmet:** Medicinska kemija i biokemija

**Tema rada** je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 60. sjednici fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta te Medicinskog fakulteta

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

### **Citotoksično djelovanje hlapljivih izolata iz biljaka porodice lukova (*Allium spp.*) dobivenih razgradnjom potpomognute mikrovalovima**

Petra Kljenak, broj indeksa 114

#### **Sažetak:**

Cilj istraživanja je bio ispitati citotoksični učinak hlapljivih izolata iz biljaka porodice *Allium spp.* na stanične linije humanih karcinoma pluća (A549) i dojke (MDA-MB-231). Korišteni su mikrovalni destilat i mikrovalni ekstrakt iz *Allium porrum* te Clevenger hidrodestilat iz *Allium ursinum*. Objе stanične linije tretirane su koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72h. Postotak vijabilnih stanica utvrđen je MTT-metodom. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju karcinoma pluća A549 imali su uzorci mikrovalnog destilata i mikrovalnog ekstrakta iz *Allium porrum* pri koncentracijama od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Najznačajniji citotoksični učinak na staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231 su također imali uzorci mikrovalnog destilata i mikrovalnog ekstrakta iz *Allium porrum* pri koncentracijama od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Djelovanje izoliranih hlapljivih spojeva nije uvijek bilo razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak hlapljivih izolata iz biljaka porodice lukova (*Allium spp.*), što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma pluća i dojke kod životinja.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom „**Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala**“ (IP-2016-06-1316).

**Ključne riječi:** biljke, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda

**Rad sadrži:** 59 stranica, 15 slika, 9 tablica, 34 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. dr. sc. Darko Modun, prof., predsjednik

2. dr. sc. Iris Jerončić Tomić, doc., član

3. dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, izv. prof., član- mentor

**Datum obrane:** 18.10.2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Medical Chemistry and Biochemistry  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, and School of Medicine, session no. 60  
**Mentor:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD  
**Technical assistance:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

### **The cytotoxic effect of volatile isolates from *Allium* family obtained by microwave-assisted degradation**

Petra Kljenak, index number 114

#### **Summary:**

The aim of this research was to examine cytotoxic effects of volatile isolates from *Allium* family of plants on cell lines of human lung cancer (A549) and breast cancer (MDA-MB-231). We used microwave distillate and microwave extract from *Allium porrum* and Clevenger hydrodistillate from *Allium ursinum*. Both cell lines were treated with concentrations of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL. Cytotoxicity was measured after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours. The percentage of viable cells was determined using the MTT assay. The most significant effect on the reduction of metabolically active cells in cell line A549 was achieved by microwave distillate and microwave extract from *Allium porrum* at a concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time. In cell line MDA-MB-231, the most prominent effect on the reduction of metabolically active cells was also achieved by microwave distillate and microwave extract from *Allium porrum* at the concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time. The effectiveness of isolated volatile compounds was not always correspondent to the increase of concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurred. The cytotoxic effect of volatile isolates from *Allium* family has been confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next step is the analysis of these effects by *in vivo* studies on the models of animal breast and lung cancers.

This research has been fully supported by the Croatian Science Foundation under the project “**Plants as a source of bioactive sulphur compounds and their ability to hyperaccumulate metals**” (IP-2016-06-1316).

**Keywords:** plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay

**Thesis contains:** 59 pages, 15 figures, 9 tables, 34 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Darko Modun, MD, PhD, full prof., chair person
2. Iris Jerončić Tomić, PhD, assist. prof., member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member- supervisor

**Defence date:** 18.10.2019.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of University of Split  
School of Medicine, Šoltanska 2.

*Hvala mojim roditeljima i sestri na beskrajnoj ljubavi te što su bili uz mene i pružali mi podršku tijekom svih ovih godina.*

*Zahvaljujem i svojoj mentorici Vedrani Čikeš Čulić na uloženom trudu i vremenu te savjetima prilikom izrade diplomskog rada.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Rak .....	2
1.2. Onkogeni i tumorsupresorski geni .....	4
1.3. Rak pluća .....	7
1.3.1. Etiologija i epidemiologija .....	7
1.3.2. Patohistologija .....	8
1.3.3. Simptomi i dijagnostika .....	8
1.3.4. Klasifikacija tumora.....	8
1.3.5. Liječenje .....	10
1.4. Rak dojke .....	12
1.4.1. Etiologija i epidemiologija .....	12
1.4.2. Patohistologija .....	13
1.4.3. Simptomi i dijagnostika .....	13
1.4.4. Klasifikacija tumora.....	14
1.4.5. Liječenje .....	16
1.5. <i>Allium</i> spp. ....	17
1.5.1. <i>Allium porrum</i> L.....	18
1.5.2. <i>Allium ursinum</i> .....	19
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>23</b>
3.1. Stanične linije .....	24
3.1.1. A549.....	24
3.1.2. MDA-MB-231 .....	25
3.2. Postupak .....	25
3.3. Test citotoksične aktivnosti .....	27
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>28</b>
4.1. Rak pluća (A549) .....	29
4.1.1. <i>Allium porrum</i> L., mikrovalni destilat .....	29
4.1.2. <i>Allium porrum</i> L., mikrovalni ekstrakt .....	30
4.1.3. <i>Allium ursinum</i> L., Clevenger hidrodestilat .....	31
4.2. Rak dojke (MDA-MB-231) .....	32
4.2.1. <i>Allium porrum</i> L., mikrovalni destilat .....	32
4.2.2. <i>Allium porrum</i> L., mikrovalni ekstrakt .....	33

4.2.3. Allium ursinum L., Clevenger hidrodestilat.....	34
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>35</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>39</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>41</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>45</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>48</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>51</b>



## **1.UVOD**

## 1.1. Rak

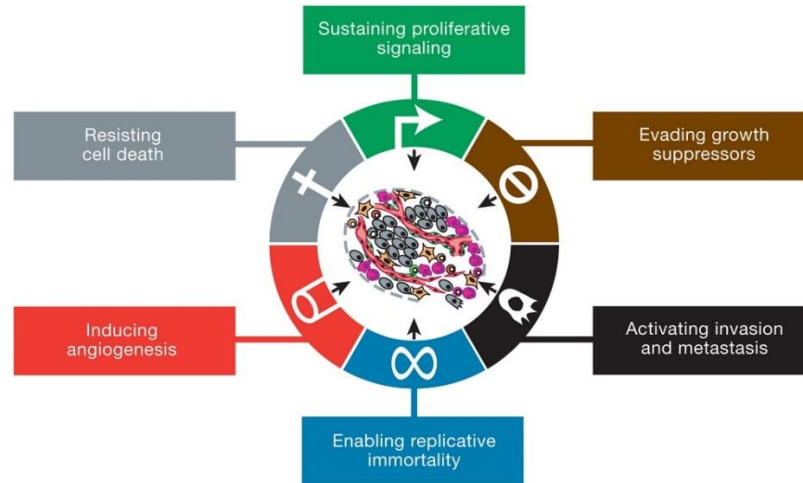
Rak je skup različitih bolesti koje se međusobno razlikuju prema svojoj etiologiji, biologiji i kliničkoj slici te po načinu liječenja. Sve vrste raka nastaju od zdravih stanica organizma procesom koji se naziva zloćudna pretvorba. Zbog određenih promjena stanica izgubi sposobnost adekvatnog odgovaranja na brojne signale kojima se njezino ponašanje stalno usklađuje s potrebama organizma, što dovodi do nekontrolirane diobe zloćudno preobražene stanice kojom nastaje nakupina stanica koju nazivamo rakom (1).

Generalizirani gubitak kontrole rasta karakterističan za stanice raka nastaje zbog nakupljanja poremećaja različitih staničnih regulacijskih sustava i odražava se na različite aspekte ponašanja po kojima se stanice raka razlikuju od odgovarajućih normalnih stanica (2). Normalna tkiva pažljivo kontroliraju proizvodnju i oslobađanje signala koji potiču rast i koji upućuju na ulazak i napredak kroz ciklus staničnog rasta i dijeljenja, čime se osigurava homeostaza broja stanica i time održavanje normalne arhitekture i funkcije tkiva. Stanice raka, dereguliranjem tih signala, same kontroliraju proliferaciju. Mogu steći sposobnost održavanja proliferativnog signaliziranja na brojne alternativne načine: mogu sami proizvesti ligande faktora rasta, na koje mogu odgovoriti putem ekspresije srodnih receptora, što rezultira autokrinom proliferativnom stimulacijom. Alternativno, stanice raka mogu slati signale kojim stimuliraju normalne stanice unutar strome povezane s tumorom koje na taj način opskrbljuju stanice raka različitim faktorima rasta. Signaliziranje receptora se također može deregulirati povećanjem razine receptorskih proteina na površini stanice raka, čineći takve stanice hiperreaktivnim na inače ograničavajuće količine liganda faktora rasta; isti ishod može biti posljedica strukturnih promjena u receptorskim molekulama koje olakšavaju ligandno neovisno paljenje (3).

Rak se klinički očituje kao nakupina velikog broja zloćudno preobraženih stanica čiji se broj zbog nekontrolirane stanične diobe progresivno povećava (1). Može nastati zbog proliferacije bilo koje vrste stanica u tijelu, tako da postoji više od stotinu vrsta raka koji se jako razlikuju po ponašanju i odgovoru na liječenje. Karcinom je zloćudna bolest epitelnih stanica, a obuhvaća 90% slučajeva raka u ljudi (2).

Zajednička obilježja po kojima se svaki rak razlikuje od zdravog tkiva su: samodostatnost s obzirom na signale rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast,

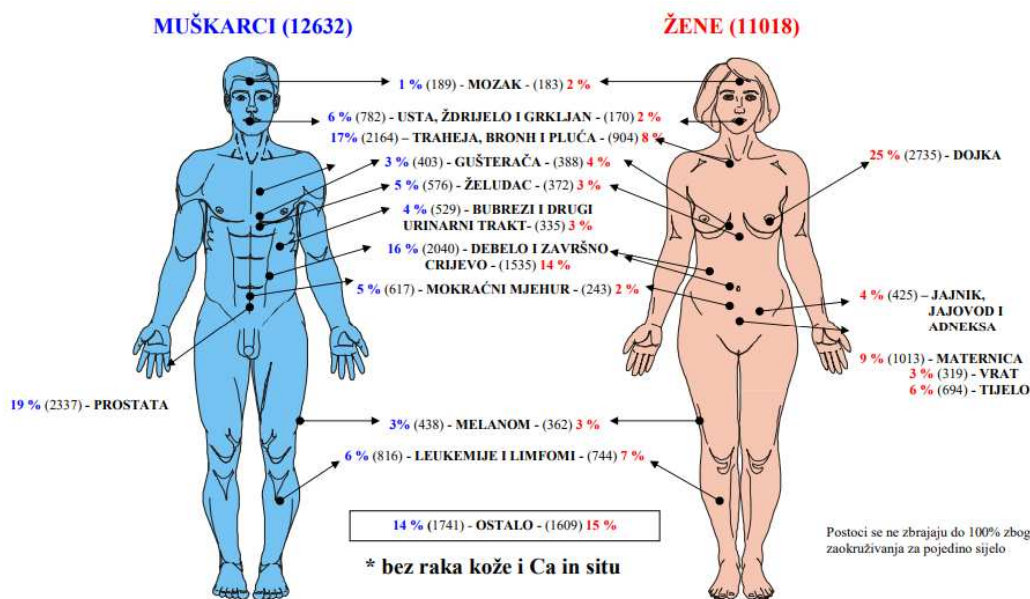
zaobilaženje programirane stanične smrti (apoptoze), neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza te sposobnost tkivne invazije i presađivanja (Slika 1) (1).



**Slika 1.** Obilježja po kojima se rak razlikuje od zdravog tkiva (3)

Prema sadašnjim podacima, između 30% i 50% smrti uzrokovanih rakom moglo bi se spriječiti mijenjanjem ili izbjegavanjem ključnih čimbenika rizika, uključujući izbjegavanje duhanskih proizvoda, smanjenje konzumacije alkohola, održavanje zdrave tjelesne težine, redovito vježbanje te izbjegavanje rizičnih čimbenika povezanih s infekcijom. Da bi se smanjila invalidnost, patnja i smrtni slučajevi uzrokovani rakom širom svijeta, potrebni su učinkoviti i pristupačni programi rane dijagnoze, probira, liječenja i palijativne skrbi. Mogućnosti liječenja mogu uključivati operaciju, lijekove i / ili radioterapiju; planiranje liječenja mora se voditi prema vrsti tumora, stadiju i raspoloživim resursima te ovisi o preferencijama pacijenta (4).

Rak je značajan javnozdravstveni problem stanovništva Hrvatske. Drugi je najvažniji uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila. Incidenciju raka u Hrvatskoj prati Registar za rak Republike Hrvatske (Slika 2) (5).



**Slika 2.** Raspodjela novooboljelih od raka prema sijelima u Hrvatskoj 2016. godine  
 Preuzeto s: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2016\\_zavrсна.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2016_zavrсна.pdf)

## 1.2. Onkogeni i tumor supresorski geni

Prvi geni za koje se pokazalo da imaju središnju ulogu u nastanku raka su bili onkogeni. Oni su promijenjena inačica protoonkogeni koji su normalni stanični geni i sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije. Protoonkogeni imaju važnu ulogu u bitnim staničnim procesima i uključeni su u prijenos signala u stanici. Putevi prijenosa signala u stanici način su na koji se stanični rast, dioba, diferencijacija i preživljenje usklađuju s uvjetima u okolišu stanice. Onkogeni nastaju ako se protoonkogeni promijene tako da oni sami ili njihovi proteinski produkti postanu aktivniji. Taj proces se naziva aktivacija onkogeni, a posljedica toga je nekontroliran rast i dioba stanica, što uzrokuje nastanak raka. Promjene kojima nastaju onkogeni najčešće imaju dominantan učinak, tj. potrebna je promjena samo u jednom alelu da bi se očitovao učinak onkogeni. Proteinski produkti onkogeni nazivaju se onkoproteinima (1).

Postoji više od 100 poznatih onkogeni koji u ljudi pridonose neoplastičnoj pretvorbi (Tablica 1). Primjerice, *ras* gen kodira Ras protein, koji regulira staničnu diobu. Mutacije mogu izazvati neprimjereno aktiviranje Ras proteina s nekontroliranim rastom i diobom stanica. Doista, Ras protein je abnormalan u oko 25% humanih maligniteta. Drugi su onkogeni upleteni u specifične oblike raka. Tu spada niz proteinskih kinaza (karcinom mokraćnog mjehura,

karcinom dojke), *bcr- abl* (KML, B–stanična ALL), *C-myc* (mikrocelularni rak pluća), *N-myc* (mikrocelularni rak pluća, neuroblastom) i *C-erb B-2* (rak dojke). Specifični onkogeni imaju važnu ulogu u dijagnostici, liječenju i prognozi (6).

Onkogeni se mogu aktivirati na nekoliko načina. Primjerice, do aktiviranja može doći zbog mutacija u samom genu, kao što je slučaj kod onkogeni Ras. Također, aktivacija može biti posljedica genske amplifikacije, tj. povećanja broja kopija gena, kao u slučaju onkogeni ERBB2 (*HER2/neu*) kod raka dojke ili posljedica kromosomske translokacije u kojem se dio kromosoma odlomi i premjesti na drugi kromosom. Svi ovi načini aktivacije dovode do deregulirane aktivnosti odgovarajućeg onkoproteina, bilo zbog promjene u transkripciji onkogeni bilo zbog promjene u strukturi samog proteina (1).

**Tablica 1.** Primjeri onkogeni (2)

Onkogen	Vrsta raka	Mehanizam aktivacije
<i>abl</i>	kronična mijeloična leukemija, akutna limfoblastična leukemija	translokacija
<i>akt</i>	karcinom dojke, jajnika i gušterače	amplifikacija
<i>bcl-2</i>	folikularni B stanični limfom	translokacija
<i>D1</i>	adenom paratiroidne, B stanični limfom	translokacija
<i>D1</i>	planoelularni karcinom, karcinom, mjehura, dojke, jednjaka, jetre i pluća	amplifikacija
<i>E2A/plx1</i>	akutna limfoblastična leukemija	translokacija
<i>erbB-2</i>	karcinom dojke i jednjaka	amplifikacija
<i>gtp</i>	karcinom kore nadbubrežne žlijezde i jajnika	točkasta mutacija
<i>gli</i>	glioblastom	amplifikacija
<i>gsp</i>	tumor hipofize i štitnjače	točkasta mutacija
<i>hox-11</i>	akutna T limfoblastična leukemija	translokacija
<i>hyl</i>	akutna T limfoblastična leukemija	translokacija
<i>c-myc</i>	Burkittov limfom	translokacija
<i>c-myc</i>	karcinom dojke i pluća	amplifikacija
<i>L-myc</i>	karcinom pluća	amplifikacija
<i>N-myc</i>	neuroblastom, karcinom pluća	amplifikacija
<i>PDGFR</i>	kronična mijelomonocitna leukemija	translokacija
<i>Pl3K</i>	karcinom jajnika	amplifikacija
<i>PML/RAR<math>\alpha</math></i>	akutna promijelocitna leukemija	translokacija
<i>B-raf</i>	melanom, karcinom debelog crijeva	točkasta mutacija
<i>rasH</i>	karcinom štitnjače	točkasta mutacija
<i>rasK</i>	karcinom debelog crijeva, pluća, gušterače i štitnjače	točkasta mutacija
<i>rasN</i>	akutna mijeloična i limfoblastična leukemija karcinom štitnjače	točkasta mutacija
<i>ret</i>	sindrom multiple endokrine neoplazije tip 2A i 2B	točkasta mutacija
<i>ret</i>	karcinom štitnjače	preslagivanje DNA
<i>SMO</i>	bazaliom	točkasta mutacija

Za razliku od onkogeni čija pojačana aktivnost dovodi do nastanka raka, tumor supresorski geni su geni kod kojih njihov gubitak ili inaktivacija do nastanka raka (Tablica 2). Mutacije tumor supresorskih gena uglavnom imaju recesivni učinak što znači da je nužna

inaktivacija oba alela da bi se očitovao njihov učinak. Osim mutacijom, do inaktivacije može doći i epigenetički, tj. metilacijom njihovih promotora (1).

Jedan od najvažnijih tumor supresorskih gena je P53 koji je često mutiran u različitim tipovima raka u ljudi. Njegov proteinski produkt, transkripcijski čimbenik p53 se aktivira zbog oštećenja stanične DNA ili nekih drugih poremećaja povezanih sa staničnim stresom. Dva su načina djelovanja aktiviranog p53: zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA te potiče apoptozu. Budući da oštećenje stanične DNA povećava mogućnost da se stanica pretvori u stanicu raka, p53 zaustavljanjem prolaska stanice kroz stanični ciklus omogućuje da se ta oštećenja poprave prije replikacije oštećene DNA. Ako se oštećenja ne uspiju popraviti, djelovanjem p53 ta stanica ulazi apoptozu i umire. Apoptoza ili programirana stanična smrt kontrolirani je način umiranja stanica, koji uz razne druge uloge u stanici ima i ulogu u sprječavanju nastanka raka. Ako gen P53 nedostaje u stanici ili je inaktiviran, tada u diobu ulaze i stanice s oštećenom DNA što povećava vjerojatnost nastanka raka. Inaktivacija p53 u stanicama raka povezana je i s tumorskom angiogenezom te rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju (1).

**Tablica 2.** Primjeri tumor supresorskih gena (2)

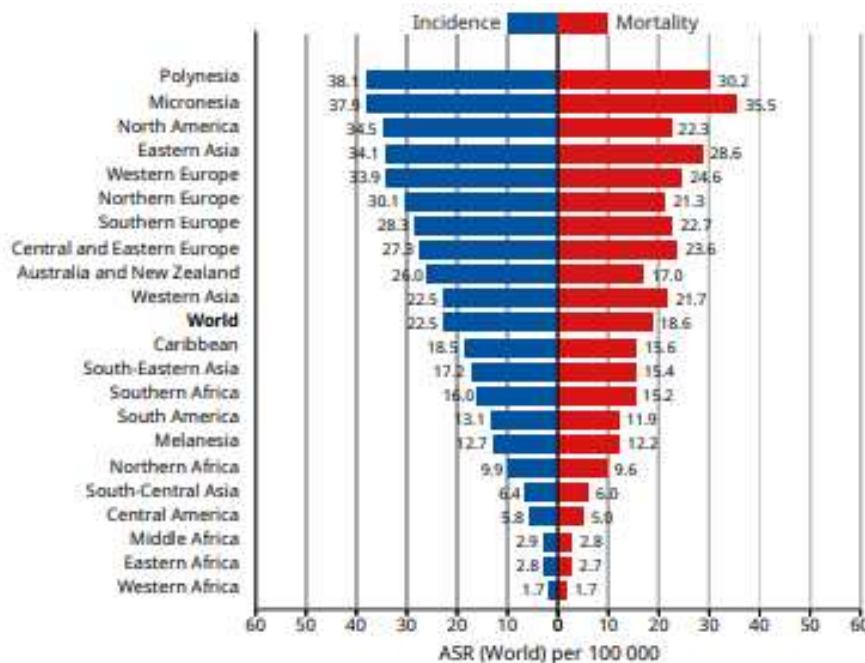
Gen	Vrsta raka
<i>APC</i>	karcinom debeloga i završnoga crijeva
<i>BRCA1</i>	karcinom dojke i jajnika
<i>BRCA2</i>	karcinom dojke
<i>INK4</i>	melanom, karcinom pluća, tumori mozga, leukemije, limfomi
<i>NF1</i>	neurofibrosarkom
<i>NF2</i>	meningeom
<i>p53</i>	tumori mozga; karcinomi dojke, debeloga i završnoga crijeva, jednjaka, jetre i pluća; sarkomi; leukemije i limfomi
<i>PTC</i>	bazaliom
<i>PTEN</i>	tumori mozga; melanom; karcinom prostate, trupa maternice, bubrega i pluća
<i>Rb</i>	retinoblastom; sarkomi; karcinom mjehura, dojke i pluća
<i>Smad2</i>	karcinom debeloga i završnoga crijeva
<i>Smad4</i>	karcinom debeloga i završnoga crijeva i gušterače
<i>TβRII</i>	karcinom debeloga i završnoga crijeva i želuca
<i>VHL</i>	karcinom bubrega
<i>WT1</i>	Wilmsov tumor

### 1.3. Rak pluća

#### 1.3.1. Etiologija i epidemiologija

Rak pluća je najčešći zloćudni tumor u svijetu. U 2012. godini dijagnosticirano je oko 1,8 milijuna novih slučajeva raka pluća, što je oko 12,9% ukupne svjetske incidencije raka. Stopa smrtnosti od raka pluća iznosila je 1,59 milijuna u svijetu 2012. godine što čini 19,4% ukupnih smrtnih slučajeva od raka (7). Zauzima vodeće mjesto po smrtnosti od zloćudnih bolesti, a omjer umrlih i oboljelih od ove bolesti iznosi 0,87. Rak pluća je najčešća zloćudna bolest u muškaraca. Incidencija je najveća u istočnoj, srednjoj i južnoj Europi te u sjevernoj Americi i istočnoj Aziji (Slika 3). U ženskoj populaciji zauzima treće mjesto po učestalosti, a drugo po smrtnosti. Vrh incidencije pojavljuje se u osmom desetljeću života (8).

Najvažniji čimbenik rizika za razvoj raka pluća jest aktivno pušenje cigareta, cigara ili lula. Pasivno pušenje također povećava rizik. Učestalost je veća u područjima jače onečišćenosti zraka, kao što su urbane sredine, što govori o važnoj ulozi inhalacijskih karcinogena u razvoju raka pluća (npr. benzopiren, azbest, radioaktivni materijali, nikal, krom i arsen). Pozitivna porodična anamneza također je važan čimbenik rizika (8).



Slika 3. Incidencija i mortalitet raka pluća u svijetu

Preuzeto s: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>

### 1.3.2. Patohistologija

Najvažnije su četiri vrste raka pluća: adenokarcinom (40-45%), rak pločastih stanica (30%), rak velikih stanica (10-15%), rak malih stanica (15%). Zbog razlika u kliničkoj prezentaciji, prognozi i terapijskom pristupu dijelimo ih u dvije skupine: prve tri vrste zajedno tvore skupinu raka pluća nemalih stanica prema raku pluća malih stanica. Ostali epitelni tumori pluća su: karcinoid, adenoskvamozni rak te rak žlijezda slinovnica (8).

### 1.3.3. Simptomi i dijagnostika

U 75% bolesnika glavni početni simptom jest kašalj. Također se javljaju hemoptiza, zaduha, bol u prsištu te recidivirajuće ili perzistirajuće infekcije respiratornog trakta. Mogu se pojaviti i neki nespecifični simptomi kao što su slabost i gubitak tjelesne težine.

Pacijentima kod kojih postoji sumnja na rak pluća potrebno je napraviti RTG pregled pluća koji će u slučaju postojanja tumora pokazati sjenu, tj. pleuralni izljev smješten centralno ili periferno te CT toraksa koji je osobito bitan za procjenu ekstenzije tumora. Dijagnoza se postavlja na temelju patohistološke potvrde bolesti pregledom bronhoskopski uzetog tkiva (8).

### 1.3.4. Klasifikacija tumora

Dok ne bude dostupna djelotvorna sistemska terapija za ovu bolest, razvoj novih strategija liječenja ovisi o poznavanju krajnjih rezultata pažljivo klasificiranih grupa pacijenata s rakom pluća (9).

Utvrđivanje stadija bolesti SCLC (eng. *small cell lung cancer*) se razlikuje od stupnjevanja NSCLC (eng. *non small cell lung cancer*) jer nema korelacije TNM statusa. SCLC se dijeli na ograničenu i proširenu bolest. Bolest je u ograničenom stadiju kad je karcinom lokaliziran u jednom hemitoraksu (uključujući istostrane limfne čvorove) te se može obuhvatiti jednim podnošljivim radioterapijskim poljem, ako ne postoji pleuralni ili perikardni izljev. Proširena bolest je karcinom izvan jednog hemitoraksa s malignim pleuralnim ili perikardnim izljevom. U trenutku postavljanja dijagnoze SCLC, oko  $\frac{1}{3}$  bolesnika ima ograničenu, dok preostali imaju proširenu bolest. Stadij NSCLC se utvrđuje tako da se odredi veličina tumora



(T), lokalizacija tumora i limfnih čvorova (N) te postoje li ili ne postoje udaljene metastaze (M) (10).

Međunarodna unija protiv raka (eng. *The International Union Against Cancer*) i Američki združeni komitet za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer Staging*, AJCCS) razvili su sustav za procjenu proširenosti bolesti koji se izražava TNM-klasifikacijom (Tablica 3) (9).

**Tablica 3.** TNM klasifikacija karcinoma pluća (8)

Primarni tumor (T)	
TX	primarni se tumor ne može procijeniti ili je tumor dokazan prisutnošću zloćudnih stanica u sputumu ili bronhalnom ispirku, ali se ne može vizualizirati slikovnim metodama ili bronhoskopijom
T0	nema dokaza o postojanju tumora
Tis	karcinom <i>in situ</i>
T1	tumor $\leq 3$ cm u najvećem promjeru, okružen plućima ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopskog dokaza invazije proksimalno od lobarnog bronha (npr tumor nije vidljiv u glavnom bronhu)
T1a (mi)	minimalno invazivni karcinom
T1a	tumor $\leq 1$ cm u najvećem promjeru
T1b	tumor $> 1$ cm, ali $\leq 2$ cm u najvećem promjeru
T1c	tumor $> 2$ cm, ali $\leq 3$ cm u najvećem promjeru
T2	tumor $> 3$ cm, ali $\leq 5$ cm ili tumor sa bilo kojom od navedenih značajki: zahvaća glavni bronh neovisno o udaljenosti od karine, ali ne zahvaća karinu, invadira visceralnu pleuru, povezan je s atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji se širi u hilarnu regiju te zahvaća dio ili cijelo pluće
T2a	tumor $> 3$ cm, ali $\leq 4$ cm u najvećem promjeru
T2b	tumor $> 4$ cm, ali $\leq 5$ cm u najvećem promjeru
T3	tumor $> 5$ cm, ali $\leq 7$ cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u istom režnju kao i primarni tumor ili tumor koji direktno zahvaća bilo koju od sljedećih struktura: stijenku prsnog koša (uključujući parijetalnu pleuru i tumore gornjeg sulkusa), frenički živac, parijetalni perikard
T4	tumor $> 7$ cm u najvećem promjeru ili prisutnost odvojenih tumorskih čvorova u različitom režnju ipsilateralnog pluća kao i primarni tumor ili tumor bilo koje veličine koji direktno zahvaća bilo koju od sljedećih struktura: ošit, medijastinum, srce, velike krvne žile, traheju, nervus laryngeus recurrens, jednjak, kralježnicu i karinu
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Nx	ne može se procijeniti zahvaćenost limfnih čvorova
N0	bez presadnica u regionalne limfne čvorove
N1	presadnice u ipsilateralne peribronhalne i/ili ipsilateralne hilarne limfne čvorove i intrapulmonalne čvorove, uključujući i direktnu zahvaćenost
N2	presadnice u ipsilateralne medijastinalne i/ili supkarinalne limfne čvorove
N3	presadnice u kontralateralne medijastinalne, kontralateralne hilarne, ipsilateralne ili kontralateralne skalenske ili supraklavikularne limfne čvorove

Udaljene presadnice (M)	
Mx	nepoznato
M0	bez udaljenih presadnica
M1	prisutne udaljene presadnice
M1a	odvojeni tumorski čvorovi u kontralateralno pluće; tumor sa pleuralnim ili perikardijalnim čvorovima ili maligni pleuralni ili perikardijalni izljev
M1b	jedna ekstratorakalna presadnica
M1c	multiple ekstratorakalne presadnice u jedan ili više organa

### 1.3.5. Liječenje

Liječenje obuhvaća procjenu operabilnosti i odabir zahvata, kemoterapiju i/ili zračenje, ovisno o tipu i stadiju tumora. Mnogi čimbenici kao što su komorbiditeti, neuhranjenost, slab fizički status utječu na izbor terapije (10).

Operiraju se samo bolesnici koji će imati adekvatnu plućnu rezervu kada im se odstrani režanj ili čitavo plućno krilo. Postoji više kemoterapijskih režima za karcinom pluća, iako nema dokaza da je jedan bolji od drugih. Izbor terapije ovisi o kontraindikacijama i toksičnosti. Terapijske opcije za recidiv bolesti variraju ovisno o lokalizaciji tumora, pa se tako u slučaju lokalnog recidiva ponavlja kemoterapija, za metastaze se primjenjuje radioterapija, a brahiterapija za endobronhalni tumor, kada bolesnik više ne može podnijeti dodatno vanjsko zračenje (10).

SCLC u bilo kom stadiju u početku dobro reagira na terapiju, iako kratkotrajno. Operacija može biti djelotvorna u rijetkim slučajevima kad je tumor malen i još se nije proširio. Ograničena bolest se liječi kombinacijom etopozida i spojeva platine (cisplatin ili karboplatin) u 4 do 6 ciklusa no često se kombinira i s drugim lijekovima. Zračenje poboljšava terapijski odgovor. Proširena bolest se liječi jednako kao i ograničena, ali bez popratnog zračenja. Zamjena etopozida inhibitorima topoizomerase (irinotekan ili topotekan) može produžiti preživljenje. Zračenje je često samo palijativna terapija za metastaze u kostima ili mozgu (10).

Liječenje NSCLC ovisi o stadiju. Za I i II stadij bolesti, uobičajena je kirurška resekcija, tj. lobektomija ili pulmektomija sa uzorkovanjem medijastinalnih limfnih čvorova ili se vrši potpuna disekcija. Adjuvantna kemoterapija (dodatni lijek koji pojačava učinak) pomaže u ranom stadiju bolesti (IB i II). Povećanje ukupnog 5–godišnjeg preživljenja (69% vs 54%) i potpunog izlječenja (61% vs 49%) postiže se primjenom cisplatine plus vinorelbina (10).

U III. stadiju bolesti postoji jedan ili više lokalno uznapredovalih tumora i zahvaćanje regionalnih limfnih čvorova ali bez udaljenih metastaza. Za tumore u stadiju IIIA sa skrivenim

metastazama u medijastinalnim limfnim čvorovima, koje se otkriju tek prilikom operacije, 5–godišnje preživljenje nakon resekcije je 20 do 25%. Radioterapija sa ili bez istodobne kemoterapije je uobičajeni standard za neoperabilnu bolest u stadiju IIIA, ali je postotak preživljenja mali (prosječno 10 do 14 mjeseci) (10).

Bolesnici u stadiju IIIB sa kontralateralnim metastazama u medijastinalnim i supraklavikularnim limfnim čvorovima ili malignim pleuralnim izljevom, primaju radioterapiju ili kemoterapiju ili i jedno i drugo. Dodavanje radiosenzitivnih citostatika (npr. cisplatin, paklitaksel, vinkristin i ciklofosfamid) neznatno produžuje preživljenje. U određenim slučajevima (T4N0M0) može doći u obzir kirurška resekcija sa neoadjuvantnom ili adjuvantnom kemo–radioterapijom. Stopa 5–godišnjeg preživljenja liječenih bolesnika u stadiju IIIB je 5% (10).

U IV stadiju bolesti, terapijski cilj je ublažavanje simptoma (palijativna terapija). Kemoterapija i zračenje mogu poslužiti za smanjenje tumorske mase, ublaživanje simptoma i poboljšanje kvalitete života. Međutim, srednje preživljenje je samo 9 mjeseci, a <25% bolesnika preživi 1 godinu (Tablica 5) (10).

**Tablica 5.** Stadiji bolesti, petogodišnje preživljenje (8)

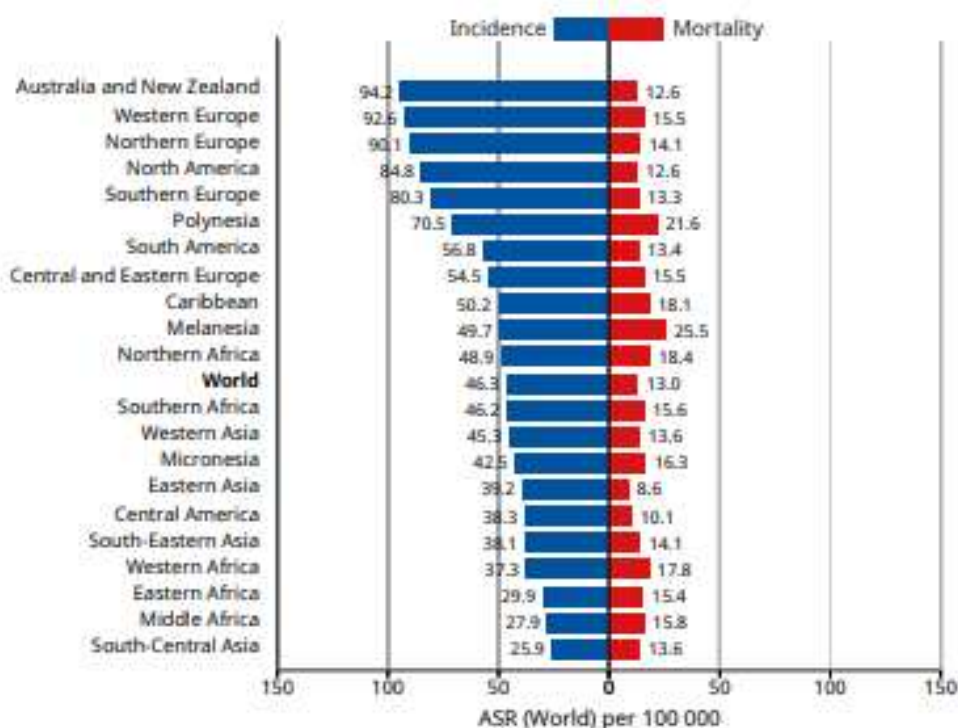
Stadij 0	Tis	N0	M0	
Stadij I A1	T1a (mi)	N0	M0	49%
	T1a	N0	M0	
Stadij I A2	T1b	N0	M0	
Stadij I A3	T1c	N0	M0	
Stadij I B	T2a	N0	M0	45%
Stadij II A	T2b	N0	M0	30%
Stadij II B	T1a-c	N1	M0	31%
	T2a	N1	M0	
	T2b	N1	M0	
	T3	N0	M0	
Stadij III A	T1a-c	N2	M0	14%
	T2a-b	N2	M0	
	T3	N1	M0	
	T4	N0	M0	
	T4	N1	M0	
Stadij III B	T1a-c	N3	M0	5%
	T2a-b	N3	M0	
	T3	N2	M0	
	T4	N2	M0	
Stadij III C	T3	N3	M0	
	T4	N3	M0	

Stadij IV A	bilo koji T bilo koji T	bilo koji N bilo koji N	M1a M1b	1%
Stadij IV B	bilo koji T	bilo koji N	M1c	

## 1.4. Rak dojke

### 1.4.1. Etiologija i epidemiologija

Rak dojke je po incidenciji na prvom mjestu, kako u Hrvatskoj tako i u razvijenim zemljama svijeta (Slika 4). Otkriveni su različiti čimbenici rizika za nastanak raka dojke. Učestalost bolesti počinje rasti s dobi od 35 do 40 godina. Pozitivna obiteljska anamneza također utječe na povećanje rizika za nastanak raka dojke oko 8 puta. Ostali čimbenici koji povećavaju relativni rizik su starija životna dob pri prvom porođaju, nerotkinje, rana menarha i kasna menopauza, dijagnostičko ili terapijsko zračenje, debljina, uzimanje oralnih kontraceptiva ili hormonske nadomjesne terapije te prijašnja dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke (11).



Slika 4. Incidencija i mortalitet raka dojke u svijetu

Preuzeto s: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>

### 1.4.2. Patohistologija

Rak dojke može nastati iz žljezdanog parenhima dojke, izvodnih kanalića (duktalni rak) ili žljezdanih lobula (lobularni rak). Dijeli se na *in situ* karcinom (ako ne probija bazalnu membranu) i invazivni rak (ako je tumor probio bazalnu membranu) (11).

Najčešći histološki tipovi raka dojke su invazivni duktalni koji čini 70-80% svih tumora te invazivni lobularni karcinom koji se javlja u 10-15% slučajeva tumora. Osim njih mogu se dijagnosticirati i neki specifični histološki podtipovi raka dojke kao što su tubularni, metaplastični, mucinozni, papilarni, mikropapilarni te medularni (11).

Novija podjela raka dojke se temelji na osnovi imunohistokemijskih i genskih obilježja te se dijeli na luminalne tumore tipa A (visoka razina estrogenskih i progesteronskih receptora, Ki-67 manji od 20%, HER2 negativnost), luminalne tumore tipa B (razina progesteronskih receptora niža od 20% ili Ki-67 viši od 20%, ili HER2 pozitivnost), HER2 pozitivne te trostruko negativne (bez estrogenske, progesteronske i HER2 pozitivnosti) koji imaju najlošiju prognozu (11).

### 1.4.3. Simptomi i dijagnostika

Rani karcinom dojke može biti asimptomatski, a bol i nelagodnost obično nisu prisutni (12). Najčešće je prvi simptom kvržica, koja je na opip jasno drugačija od okolnog tkiva dojke. U više od 80% slučajeva raka dojke žena kvržicu otkriva sama (13). Osim navedenog na moguću prisutnost raka dojke mogu ukazivati i promjena veličine ili oblika grudi, udubljenja na koži ili promjene kože, uvlačenje bradavice te krvavi iscjedak iz dojke (12).

Dijagnoza raka dojke započinje anamnezom da bi se utvrdilo vrijeme pojave simptoma te kliničkim pregledom koji uključuje vizualnu inspekciju i palpiranje. Za ranu detekciju nepalpabilnog raka dojke tj. za potvrdu palpabilnog nalaza primjenjuje se mamografija. Preporuča se da svaka žena napravi prvi mamogram s 40 godina (35 ako ima pozitivnu obiteljsku anamnezu) te da se mamografija ponavlja barem svako 2-3 godine. Ultrazvučni pregled dojke je najviše primjenjivana pretraga u dijagnozi raka dojke i metoda je izbora u ranoj dijagnozi u premenopauzalnih bolesnica. U slučaju sumnje na multicentrični rak potrebno je

napraviti magnetnu rezonancu. Ako se nakon kliničkog, mamografskog ili ultrazvučnog pregleda posumnja na maligni tumor potrebno je to potvrditi patohistološki ili citološki (11).

#### 1.4.4. Klasifikacija tumora

Američki združeni komitet za rak (AJCC) pruža dvije grupacije za klasifikaciju stadija raka dojke: anatomsku, koja se temelji na opsegu raka definiranom veličinom tumora (T), statusom limfnog čvora (N) i udaljenim metastazama (M); te prognostičku, koja uključuje anatomsku klasifikaciju TNM plus tumorski stadij i status receptora ljudskog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2), receptora za estrogen (ER) i receptora za progesteron (PR) (Tablica 6) (14).

**Tablica 6.** TNM klasifikacija raka dojke i pridruženi stadiji (11)

Tis (DCIS)	duktalni karcinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Pagetova bolest bradavice nepovezana s invazivnim karcinomom i/ili DCIS u podležućem parenhimu
T1	tumor $\leq 20$ mm u najvećem promjeru
T1mi	tumor $\leq 1$ mm u najvećem promjeru
T1a	tumor $> 1$ mm, ali $\leq 5$ mm u najvećem promjeru
T1b	tumor $> 5$ mm, ali $\leq 10$ mm u najvećem promjeru
T1c	tumor $> 10$ mm, ali $\leq 20$ mm u najvećem promjeru
T2	tumor $> 20$ mm, ali $\leq 50$ mm u najvećem promjeru
T3	tumor $> 50$ mm u najvećem promjeru
T4	tumor bilo koje veličine s direktnom invazijom stjenke prsnog koša i/ili kože (ulceracija ili makroskopski kožni čvorovi)
T4a	ekstenzija tumora na stjenku prsnog koša; invazija ili adherencija pektoralnog mišića u odsutnosti invazije struktura stjenke prsnog koša ne kvalificira se kao T4
T4b	ulceracija i/ili ipsilateralni makroskopski satelitski čvor i/ili edem (uključujući 'peau d'orange') kože, koji ne uključuje kriterije inflamiranog karcinoma
T4c	prisutni kriteriji T4a i T4b
T4d	inflamirani karcinom
Nx	ne može se procijeniti (nije uzet uzorak za PHD analizu)
N0	nije se identificiralo metastaza u limfnim čvorovima ni ITC (eng. <i>isolated tumor cells</i> )
N0 (i+)	samo ITCs (nakupine malignih stanica ne veće od 0,2 mm) u regionalnim limfnim čvorovima
N0 (mol+)	pozitivan nalaz RT-PCR-om; nije se detektiralo ITCs
N1mi	mikrometastaze ( $> 0,2$ mm, ali $\leq 2,0$ mm)
N1a	metastaze u 1 – 3 aksilarna limfna čvora, najmanje 1 metastaza $> 2,0$ mm

N1b	metastaza u ipsilateralne interne mamarne limfne čvorove čuvare, isključujući ITC
N1c	N1a i N1b
N2a	metastaza u 4 – 9 aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit > 2,0 mm)
N2b	metastaze klinički detektirane u internim marnim limfnim čvorovima, sa ili bez mikroskopske potvrde; s patološki negativnim aksilarnim limfnim čvorovima
N3a	metastaza u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova (najmanje 1 tumorski depozit > 2,0 mm) ili metastaza u infraklavikularne limfne čvorove (razina III aksilarnih limfnih čvorova)
N3b	N1a ili N2a u prisutnosti N2b (slikovnim metodama pozitivni interni marni limfni čvorovi); ili N2a u prisutnosti N1b
N3c	metastaze u ipsilateralne supraklavikularne limfne čvorove
M0 (i+)	bez kliničkog ili radiološkog dokaza o postojanju metastaze, uz prisutnost depozita tumorskih stanica < 0,2 mm dokazanog mikroskopski ili molekularnim metodama
M1	metastaza dokazana klinički ili slikovnim metodama i/ili histološki dokazana metastaza > 0,2 mm

Nakon definiranja TNM statusa, definira se stadij bolesti (Tablica 7). Različiti stadiji bolesti definirani su na temelju različitih vjerojatnosti izlječenja. Viši stadij determinira manju vjerojatnost izlječenja od raka dojke (11).

**Tablica 7.** Stadiji raka dojke (11)

Stadij 0	Tis	N0	M0
Stadij IA	T1	N0	M0
Stadij IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	
Stadij IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	
	T2	N0	
Stadij IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	
Stadij IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	
	T2	N2	
	T3	N1,N2	
Stadij IIIB	T4	N0,N1,N2	M0
Stadij IIIC	bilo koji T	N3	M0
Stadij IV	bilo koji T	bilo koji N	M1

### 1.4.5. Liječenje

Liječenje raka dojke ovisi o vrsti raka, stadiju, osjetljivosti na hormone te dobi pacijenta i općem zdravlju (15).

Ako je potreban kirurški zahvat, vrsta operacije će ovisiti o obliku raka te o samom izboru pacijenta. Vrste operacija su: lumpektomija (poštedna operacija dojke), mastektomija (radikalna operacija), biopsija prvog drenirajućeg limfnog čvora u aksili te disekcija aksilarnih limfnih čvorova (15).

Nakon poštedne operacije mora se ordinirati poslijeoperacijska radioterapija. Kontrolirane doze zračenja usmjerene su na tumor da bi uništile stanice raka. Ovo djeluje na ubijanje svih preostalih stanica raka. Ovisno o tipu raka dojke određuje se koji tip zračenja je najprikladniji (11,15).

Liječnik može propisati citotoksične lijekove koji se mogu koristiti za ubijanje stanica raka, ako postoji visoki rizik od recidiva ili širenja. To se naziva adjuvantna kemoterapija. Kemoterapija može biti primijenjena prije operacije kako bi se smanjio tumor i olakšalo njegovo uklanjanje. To je neo-adjuvantna kemoterapija. Kemoterapija se može koristiti za liječenje raka koji je metastazirao te također može smanjiti proizvodnju estrogena, a estrogen može potaknuti rast nekih vrsta raka dojke (15).

Kod žena koje imaju pozitivan nalaz hormonskih receptora (estrogenskih ili progesteronskih) indicirana je adjuvantna hormonska terapija koja se provodi nakon kemoterapije i radioterapije. U premenopauzalnih pacijentica se primjenjuje tamoksifen 5 do 10 godina što smanjuje pojavu recidiva i rizik smrti od raka dojke. U liječenju postmenopauzalnih žena „zlatni standard“ predstavljaju inhibitori aromataze (letrozol, anastrozol i egzemestan) također u trajanju od 5 do 10 godina (11).

Cilj liječenja definiran je stupnjem proširenosti; kod lokalnog raka dojke svrha je izlječenje, dok je kod proširenog (diseminiranog) raka svrha osigurati maksimalno kvalitetan i dug život (11).



## 1.5. *Allium* spp.

*Allium* vrste, najvažniji rod porodice *Alliaceae*, spadaju u najstarije kultivirano povrće (16). *Allium* je latinska riječ za češnjak. Dio je roda cvjetnica koje se često nazivaju rodom luka (17).

*Allium* vrste nalaze se u većini regija svijeta osim tropskog područja, Novog Zelanda i Australije (18). Uporaba lukova seže tisućljećima u povijest. Gotovo svi dijelovi biljaka iz roda lukova (*Allium*) se koriste za hranu, lijekove, kao začini ili sirovine za daljnju preradu (19). Nekoliko je važnih biljaka za prehranu uključujući luk (*Allium cepa*), češnjak (*A. sativum*), vlasac (*A. schoenoprasum*) i poriluk (*A. porrum*), a neke se uzgajaju kao ukrasne biljke (18).

Lukovi su zeljaste trajnice (19). Karakteriziraju ih oštri linearni listovi i cvjetovi sa šest latica. Mnogi nastaju iz lukovice ili rizoma (18). Razlikuju se po visini koja varira od 5 cm do 150 cm. Cvjetovi formiraju cvat na vrhu stabljike bez lišća. Lukovice variraju u različitim vrstama, od vrlo malih (promjera oko 2-3 mm) do prilično velikih (8-10 cm). Neke vrste (poput velškog luka, *A. fistulosum*) razvijaju zadebljane listopadne baze umjesto da stvaraju lukovice (20). Cvjetovi se često nose u sfernim cvjetnim grozdovima i daju crne sjemenke. Neke se biljke nesporno razmnožavaju iz lukovica u cvjetnoj glavi (18).

*Allium* rod uključuje više od 700 vrsta široko rasprostranjenih po cijelom svijetu i cijenjenih zbog svog okusa, lakog rasta i dugog vremena skladištenja. Vrste se mogu razlikovati po obliku i okusu, ali bliski su prema biokemijskim i fitokemijskim sadržajima (16). U Hrvatskoj raste 54 vrste i podvrste roda *Allium* (19).

Preko 4000 godina ovo povrće je cijenjeno u mnogim kulturama ne samo zbog oštrog aroma i kulinarskih namjena već i zbog njihovih zdravstvenih koristi. Drevni medicinski tekstovi iz Egipta, Grčke, Rima, Kine i Indije navode terapijske primjene za povrće iz porodice *Allium*. Egipatski medicinski papirus, Codex Ebers (~ 1550 B.C.), navodi 22 pripravka u koje je dodan češnjak. Hipokrat je opisivao češnjak kao laksativ i diuretik, a Aristofan i Galen predlagali su češnjak za liječenje tumora maternice. Nadalje, nekoliko ljekovitih upotreba češnjaka i luka navodi rimski prirodoslovac Plinij stariji u svojoj *Historia naturalis* (17).

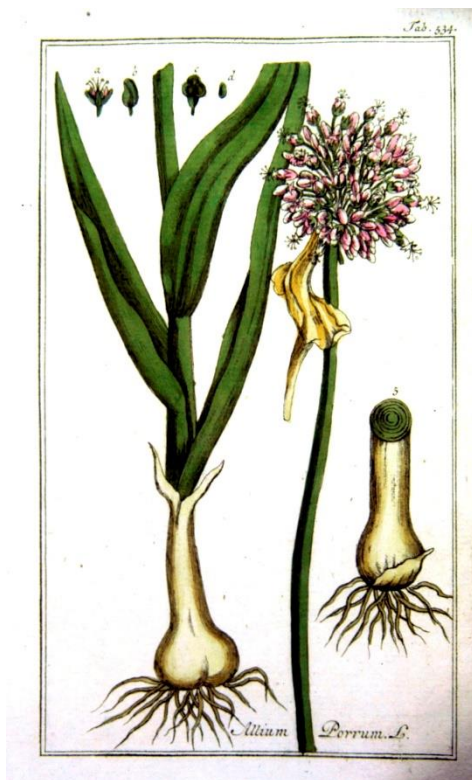
Mnoge vrste roda *Allium* sadrže hlapive sumporne spojeve kao što su aliin, propilensulfonsku kiselinu, metilaliin, propilaliin, cikloalein i dr. Ti spojevi su sastavni dio

biljnog soka što daje karakterističan miris 'luka' (19). Narodne ljekovite upotrebe *Alliuma* su mnogobrojne, a značajno je istraživanje usmjereno na identificiranje i ispitivanje spojeva za medicinsku upotrebu (20). Smatra se da funkcionalne komponente biljaka roda *Allium* igraju ključnu ulogu u modificiranju glavnih čimbenika rizika za kronične bolesti (21). Primjerice alicin, dobiven iz češnjaka, koristi se za suzbijanje gljivičnih infekcija i parazita, snižavanje kolesterola u krvi i poboljšanje cirkulacije (20). Biljke roda *Allium* poznate su po proizvodnji organskih sumpornih spojeva koji posjeduju zanimljiva biološka i farmakološka svojstva. Kad se ekstrahiraju i izoliraju, ovi spojevi pokazuju širok spektar korisnih učinaka protiv mikrobnih infekcija, kao i kardioprotektivno, antikancerogeno i protuupalno djelovanje (22).

### **1.5.1. *Allium porrum* L.**

Poriluk (*Allium porrum* L.) je dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice lukova (*Alliaceae*). Listovi su duguljasto lancetasti, širine do 3 cm. Lukovica je duguljasta, korijenje joj je čupavo. U drugoj godini stvara se stabljika visoka oko 150 cm i na vrhu sadrži štitasti cvat koji je okruglast i sadrži sitne dvospolne, pravilne cvjetove. Plod je tobolac koji nosi brojne sitne crne sjemenke (Slika 5) (23).

Ova vrsta ima iste ljekovite vrline kao i češnjak koji ima vrlo dugu narodnu povijest upotrebe u širokom rasponu bolesti, posebno kod bolesti poput kandidate i vaginitisa, gdje su se njegova fungicidna, antiseptička, i parazitska svojstva pokazala korisnima. Također se smatra da ima antikancerogeno djelovanje (24). Poriluk je važan sastojak u mnogim europskim i azijskim dijetama, a poznat je i po svojim ljekovitim svojstvima. Eterično ulje ove biljke sadrži sumporove spojeve za koje se smatra da imaju antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti (16). Svakodnevno korištenje u prehrani pokazalo se da ima vrlo blagotvoran učinak na tijelo, posebno na krvni sustav i srce. Lukovica ima antihelmintička, antiastmatična, antiseptička, diuretička te vazodilatatorna svojstva. Ako se smrvi može se primijeniti za ublažavanje boli od ugriza, uboda itd (24).



**Slika 5.** *Allium porrum* L.

Preuzeto s: <https://antropocene.it/en/2019/05/18/allium-porrum/>

### 1.5.2. *Allium ursinum*

Medvjeđi luk, zvan i srijemuš (*Allium ursinum* L.) je trajna zeljasta biljka iz porodice lukova (*Alliaceae*). Stabljika je uspravna, okrugla ili trokutasta i naraste do 40 cm visine. Lukovica je duguljasta i bijela, duga 2-4 cm te iz nje u proljeće narastu dva velika, tanka i plosnata lista koji su dugi 12-16 cm. Dvospolni cvjetovi se stvaraju na vrhu uspravne stabljike skupljeni u plosnati paštitasti cvat. Plod je tobolac koji sadrži nekoliko crnih sjemenki. Medonosna je biljka. Med je žut, proziran i ima miris karakterističan za luk. Rasprostranjen je u cijeloj Europi i zapadnoj Aziji. Raste u listopadnim šumama na svježim, hranjivim tlima. Razmnožava se sjemenom ili dijeljenjem lukovica (25).

Medvjeđi luk ima većinu zdravstvenih koristi kao i kultivirani češnjak, *A. sativum* iako je slabiji u djelovanju. Stoga je vrlo koristan dodatak prehrani, promičući opće zdravlje tijela ako se redovito koristi. Posebno je učinkovit u smanjenju visokog krvnog tlaka i razine kolesterola u krvi. Poznato je da ima dobar učinak na dispepsiju. Svi dijelovi biljke se mogu

koristiti, ali lukovica ima najbolja ljekovita svojstva. Medvjedi luk olakšava bolove u želucu i blagotvoran je za probavu, pa ga se može koristiti u liječenju proljeva, kolika, vjetra, probavnih smetnji i gubitka apetita. Biljka je korisna i u liječenju astme, bronhitisa i emfizema. Sok se koristi kao pomoć pri mršavljenju, a može se primijeniti i izvana na reumatskim i artritičnim zglobovima gdje njegovo blago nadražujuće djelovanje i stimulacija u lokalnoj cirkulaciji mogu biti od koristi (26).



**Slika 6.** *Allium ursinum* L.

Preuzeto s: <https://antropocene.it/en/2017/06/06/allium-ursinum/>

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je ispitati citotoksično djelovanje ekstrakata i destilata iz biljnih vrsta *Allium porrum* i *Allium ursinum* na humane karcinomske stanice. Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnoj aktivnosti ispitivat će se na staničnim linijama karcinoma pluća A549 te karcinoma dojke MDA-MB-231.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Stanične linije

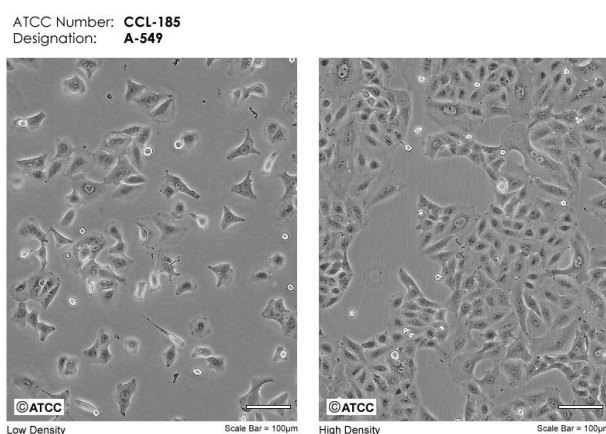
*In vitro* istraživanje ispitivanja djelovanja određenih hlapljivih izolata biljaka iz roda lukova se provodilo na staničnim linijama humanih karcinoma A549 i MDA-MB-231. Obilježja tih staničnih linija su prikazana u tablicama.

#### 3.1.1. A549

**Tablica 8.** Obilježja stanične linije A549

Preuzeto s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx>

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	pluća
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	karcinom
Dob	58 godina
Spol	muški
Etnicitet	bijeli
Primjena	ova stanična linija je pogodan domaćin za transfekciju
Uvjeti pohrane	tekući dušik



**Slika 7.** Stanice karcinomske linije A549

Preuzeto s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx>

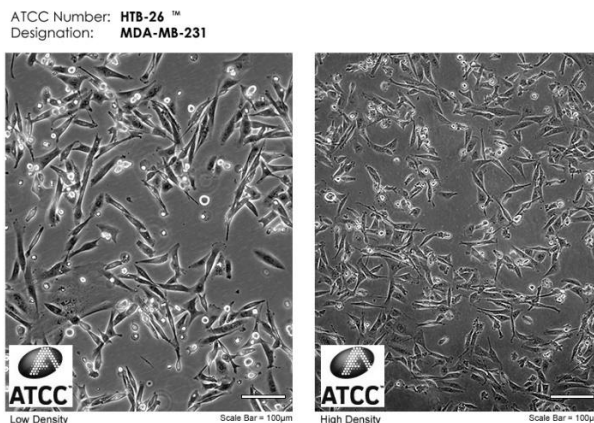


### 3.1.2. MDA-MB-231

**Tablica 9.** Obilježja stanične linije MDA-MB-231

Preuzeto s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	mlječna žlijezda/ dojka
Format proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježja kulture	adherentna
Bolest	adenokarcinom
Dob	51 godina
Spol	ženski
Etnicitet	bijeli
Primjena	ova stanična linija je pogodan domaćin za transfekciju
Uvjeti pohrane	tekući dušik



**Slika 8.** Stanice karcinomske linije MDA-MB-231

Preuzeto s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx>

### 3.2. Postupak

Postupak uzgoja stanica se provodio u laboratoriju koji ima kabinete za sterilan rad uz laminarni protok zraka da ne bi došlo do kontaminacije staničnih kultura.

Stanične linije su nakon odmrzavanja uzgojene u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. DMEM medij sadrži potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline i minerali te FBS (goveđi serum). Osim toga, u njemu se nalaze i antibiotici, te indikator fenolno crvenilo koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti. Nakon što je dodan DMEM medij, pločice sa stanicama su ostavljene preko noći za prihvata na podlogu.

Da bi se uklonio zaostali DMEM medij, stanične linije se ispiru s PBS-om. Nakon toga, stanice koje su adherirale na podlogu tretiraju se tripsinom, enzimom koji cijepanjem peptidnih veza omogućuje odvajanje stanica od podloge te njihovo presađivanje.

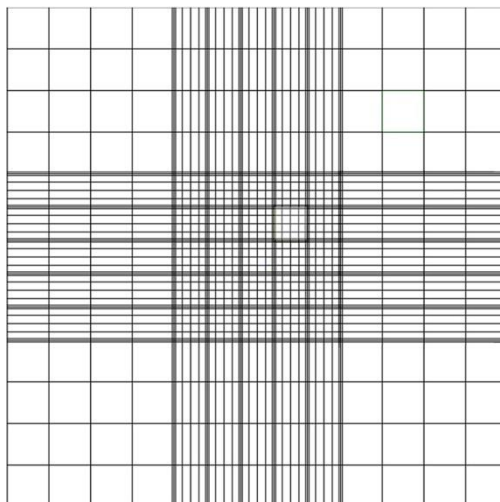
Brojanje stanica se odvija pomoću Bürker- Türkove komorice tako da se 10 µl stanica pomiješa s 90 µl Trypan Blue boje koja oboji mrtve stanice te tako omogućava brojenje živih stanica koje nisu obojane. Staničnu suspenziju s bojom nanosimo na Bürker-Türkovu komoricu i pod mikroskopom brojimo žive stanice (Slika 9). Žive stanice se prebrojavaju unutar pet kvadratića te se ukupan broj određuje prema formuli:

$$R = N \times 10 \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

R- ukupan broj živih stanica

N- broj živih stanica određen u Bürker-Türkovoj komorici

10- faktor razrjeđenja



**Slika 9.** Bürker-Türkova komorica

Preuzeto s: <https://www.scienceabc.com/pure-sciences/what-is-a-hemocytometer-calculation-counting-how-to-use.html>

Nakon toga jednak broj stanica se presađuje u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu.

U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim otopinama izolata lukova u koncentracijama 1  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  i 100  $\mu\text{g/mL}$  tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice koje predstavljaju kontrolu su ostavljene u samom mediju te u njih nisu dodani izolati lukova.

### **3.3. Test citotoksične aktivnosti**

Stanična živost i proliferacija određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu. Žuti tetrazolin MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) se reducira u metabolički aktivnim stanicama. MTT testom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja jednom od ekstrakata biljaka, jer mrtve, odnosno metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Rezultirajući intracelularni ljubičasti formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski. Da bi se mogla očitati apsorbancija (na 570 nm) novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid). Nakon jednog sata MTT je ispran i dodan je DMSO. Pločice su inkubirane 10 min na 37°C uz treskanje. Apsorbancija je mjerena na 570 nm.

Omjer apsorbancije stanica tretiranih destilatima i ekstraktima iz luka te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih dijelova biljaka.

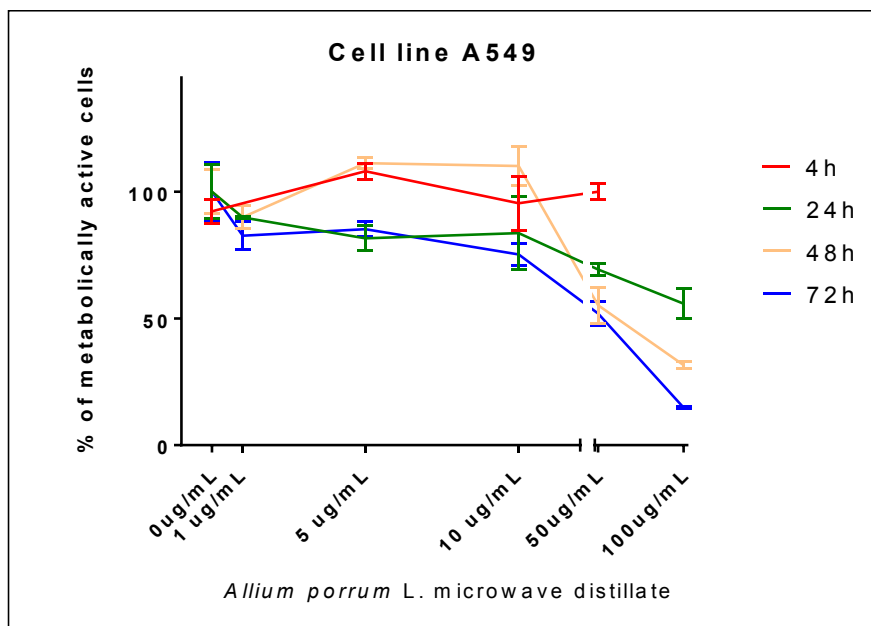
## **4. REZULTATI**

## Empirijska obrada:

Kao ograničenje istraživanja uzima se premala serija podataka.

### 4.1. Rak pluća (A549)

#### 4.1.1. *Allium porrum* L., mikrovalni destilat

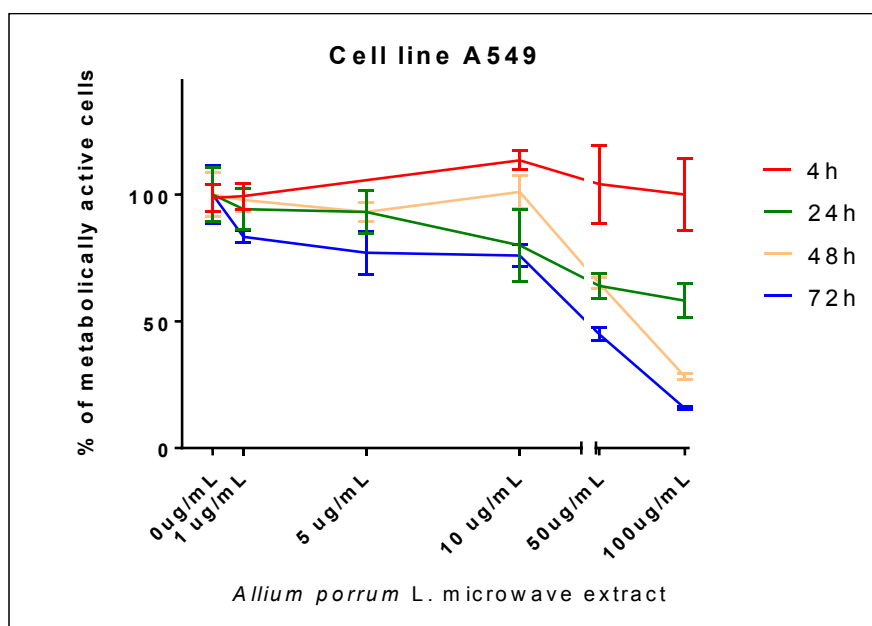


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	71.72	33.51

**Slika 10.** Mikrovalni destilat *Allium porrum* L.

Mikrovalni destilat *Allium porrum* pokazuje učinak pri svim ispitivanim koncentracijama nakon 24h inkubacije, nakon čega stanice tretirane koncentracijama od 1, 5 i 10  $\mu\text{g/mL}$  pokazuju porast dok se povećanjem koncentracije destilata s dužim vremenom inkubacije vidi pad broja metabolički aktivnih stanica. Najbolji učinak se ostvaruje pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$  nakon 72 h inkubacije. IC50 iznosi 71,72  $\mu\text{g/mL}$  nakon 24 h inkubacije, odnosno 33,51  $\mu\text{g/mL}$  nakon 72 h. IC50 za 4 i 24 h nije moguće odrediti u rasponu ispitivanih koncentracija.

#### 4.1.2. *Allium porrum* L., mikrovalni ekstrakt

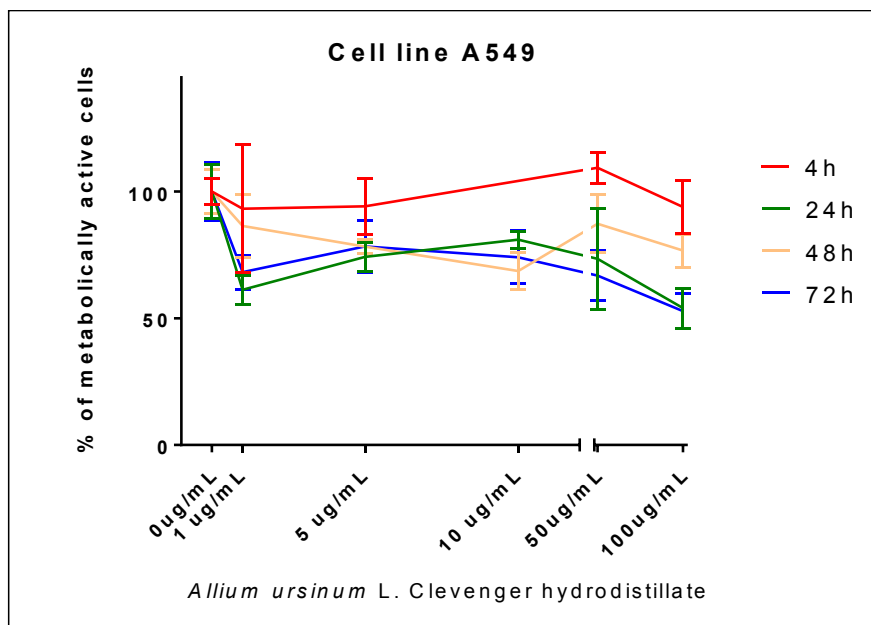


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	69.77	27.98

**Slika 11.** Mikrovalni ekstrakt *Allium porrum* L.

*Allium porrum* ekstrakt ostvaruje značajan učinak pri koncentracijama od 10, 50 i 100 ug/mL nakon 24 h inkubacije, no pri koncentraciji od 10 ug/mL nakon 48 h inkubacije se vidi porast broja metabolički aktivnih stanica. Nakon 72 h inkubacije ekstrakt pokazuje inhibicijski učinak pri svim ispitivanim koncentracijama, a najbolji je pri koncentraciji od 100 ug/mL. IC50 za vremenske periode inkubacije od 4 i 24 h nije moguće odrediti pri ispitivanim koncentracijama, dok za 48 h iznosi 69,77 ug/mL, a za 72 h 27,98 ug/mL.

### 4.1.3. *Allium ursinum* L., Clevenger hidrodestilat



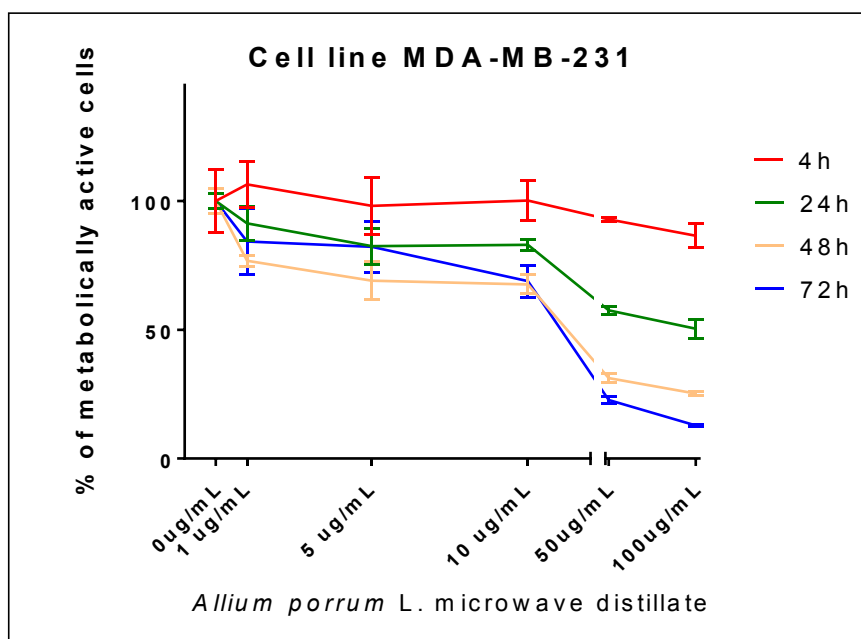
	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	Not determined	84.68

**Slika 12.** Clevenger hidrodestilat *Allium ursinum* L.

Hidrodestilat *Allium ursinum* ostvaruje učinak nakon 24 h inkubacije pri svim ispitivanim koncentracijama nakon čega dolazi do porasta broja metabolički aktivnih stanica pri koncentracijama od 1, 5, 50 i 100 ug/mL dok se pri koncentraciji od 10 ug/mL primjećuje blagi pad broja stanica. IC50 za ispitivane koncentracije hidrodestilata je moguće odrediti samo za vrijeme inkubacije od 72 h i iznosi 84,68 ug/mL.

## 4.2. Rak dojke (MDA-MB-231)

### 4.2.1. *Allium porrum* L., mikrovalni destilat



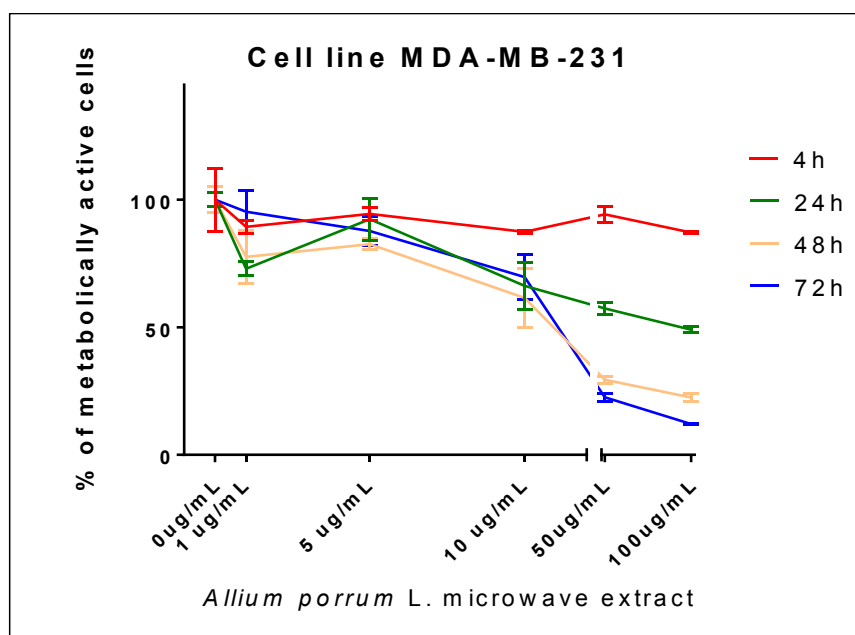
	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	74.75	18.85	18.19

**Slika 13.** Mikrovalni destilat *Allium porrum* L.

Destilat *Allium porrum* na stanice raka dojke pokazuje učinak nakon 24 h inkubacije pri svim koncentracijama, a najbolji je pri koncentraciji od 100 ug/mL. Daljnjom inkubacijom smanjuje se broj metabolički aktivnih stanica pri svim koncentracijama, no nakon 72 h pri koncentracijama od 1 i 5 ug/mL prisutan je blagi rast broja metabolički aktivnih stanica. Najmanji postotak metabolički aktivnih stanica je nakon 72 h inkubacije pri koncentraciji destilata od 100 ug/mL. IC50 iznosi 74,75 ug/mL za 24 h, 18,85 ug/mL za 48 h te 18,19 ug/mL za 72 h inkubacije, dok se za vrijeme inkubacije od 4 h IC50 ne može odrediti za ispitivane koncentracije.



#### 4.2.2. *Allium porrum* L., mikrovalni ekstrakt

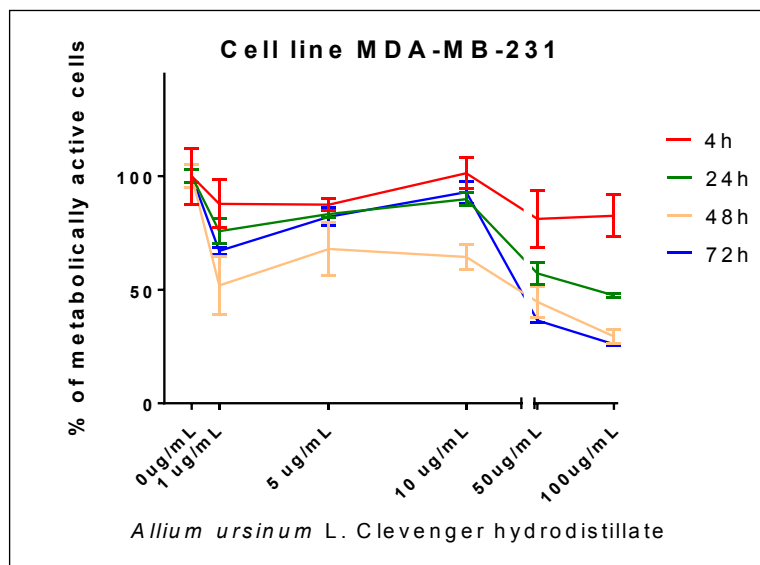


	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	63.41	19.11	20.03

**Slika 14.** Mikrovalni ekstrakt *Allium porrum* L.

Ekstrakt *Allium porrum* učinak nakon 24 h inkubacije postiže pri koncentracijama od 1, 10, 50 i 100 ug/mL. Značajniji učinak nakon 48 h inkubacije je postignut pri koncentracijama od 50 i 100 ug/mL. Nakon 72 h inkubacije pri koncentracijama od 1, 5 i 10 ug/mL dolazi do oporavka dijela metabolički aktivnih stanica dok se pri koncentracijama od 50 i 100 ug/mL nastavlja pad aktivnosti. Najbolji učinak ispitivani ekstrakt postiže pri koncentraciji od 100 ug/mL nakon 72 h inkubacije. IC50 za 4 h inkubacije nije moguće odrediti za ispitivane koncentracije dok za 24 h iznosi 63,41 ug/mL, za 48 h 19,11 ug/mL te za 72 h 20,03 ug/mL.

### 4.2.3. *Allium ursinum* L., Clevenger hidrodestilat



	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	73.26	21.73	35.26

**Slika 15.** Clevenger hidrodestilat *Allium ursinum* L.

Hidrodestilat *Allium ursinum* učinak na smanjenje metaboličke aktivnosti stanica raka dojke postiže već nakon 4 h inkubacije pri koncentracijama od 1,5, 50 i 100 ug/mL. Daljnjom inkubacijom (24 i 48 h) nastavlja se smanjenje metabolički aktivnih stanica pri svim koncentracijama, no nakon 72 h dolazi do povećanja aktivnosti stanica pri koncentracijama od 1, 5 te 10 ug/mL dok koncentracije hidrodestilata od 50 i 100 ug/mL pokazuju najbolji učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica. IC50 za vrijeme inkubacije od 24 h iznosi 73,26 ug/mL, za 48 h 21,73 ug/mL te za 72 h 35,26 ug/mL, a za vrijeme inkubacije od 4 h IC50 nije moguće utvrditi za ispitivane koncentracije hidrodestilata.

## **5. RASPRAVA**

Rak je po život opasna bolest karakterizirana abnormalnom proliferacijom stanica koje se širi na susjedna tkiva i uzrokuje njihovo razaranje. Širi se do udaljenih organa putem krvi i limfe. Do nastanka raka dolazi kada se poremete dvije vrste gena, tj. onkogeni odgovorni za rast stanica raka i tumor supresorskih gena koji sprečavaju razvoj raka (27). Može utjecati na gotovo bilo koji dio tijela i ima mnogo anatomskih i molekularnih podtipova za koje svaki zahtijeva posebne strategije liječenja (28). Rak se imenuje prema vrsti stanice iz kojih tumor nastane, na primjer karcinom ako se pojavi iz epitelnih stanica, sarkom ako nastaje iz mezodermalnih stanica (rak mišića, kostiju, hrskavice i vezivnog tkiva), limfom ako nastane iz stanica imunološkog sustava, leukemija ako potječe od stanica koštane srži (27). Rak je i dalje jedan od vodećih uzroka obolijevanja i smrtnosti na globalnoj razini. Među nezaraznim bolestima rak je drugi vodeći uzrok smrti, nakon kardiovaskularne bolesti. Odgovoran je za jedan od osam smrtnih slučajeva širom svijeta - više nego AIDS, tuberkuloza i malarija zajedno (29).

Često je nemoguće procijeniti točan uzrok za određeni rak. No, postoje čimbenici za koje se zna da mogu povećati rizik od raka poput upotrebe duhana, alkohola, zagađivača okoliša, uzročnika infekcija, određene navike i stil života. Približno 10 do 15% karcinoma je u potpunosti nasljedno (27). Prevencija se definira kao smanjenje smrtnosti od raka smanjenjem incidencije raka. To se može postići izbjegavanjem kancerogena ili promjenom njegovog metabolizma, pravilnim načinom života ili prehranom koji mijenjaju čimbenike koji uzrokuju rak ili genetsku predispoziciju, medicinskim intervencijama (npr. kemoprevencija) ili kirurškim zahvatima za smanjenje rizika ili strategijama ranog otkrivanja koje mogu rezultirati uklanjanjem prekanceroznih lezija, kao što je kolonoskopija za kolorektalne polipe (30).

Rak pluća je najčešći rak i vodeći uzrok smrti od raka kod muškaraca. Treći je najčešći rak (nakon karcinoma dojke i debelog crijeva) i drugi vodeći uzrok smrti od raka (nakon karcinoma dojke) kod žena (7). U 2018. godini dijagnosticirano je oko 2 milijuna novih slučajeva karcinoma pluća, što čini 11,6 % ukupne svjetske incidencije raka. U svijetu stopa smrtnosti od raka pluća iznosila je 1,76 milijuna smrtnih slučajeva u 2018. godini što čini 18,4% ukupnog broja umrlih od raka (31). Nedavne epidemiološke studije otkrivaju da su upotreba duhana, izlaganje radonu, zagađenje zraka, štetna izloženost na radu, nasljedna osjetljivost, izloženost zračenju i neuravnotežena prehrana odgovorni za sve veću učestalost raka pluća (7).

Rak dojke je najčešće dijagnosticirani rak i vodeći uzrok smrti od raka kod žena u cijelom svijetu (32). 2018. godine dijagnosticirano je oko 2 milijuna novih slučajeva karcinoma dojke u svijetu, a to je 11,6% ukupne incidencije raka. Stopa smrtnosti je iznosila oko 620 tisuća

pacijenata što čini 6,6% ukupnog broja umrlih od raka u svijetu (33). Čimbenici rizika za karcinom dojke uključuju reproduktivne i hormonske čimbenike, poput dobivanja prve menstruacije u ranoj dobi, primjene oralne kontracepcije i ne rađanja djece. Rođenje djece te dojenje smanjuju rizik od raka dojke. Potencijalno promjenjivi faktori rizika uključuju debljanje nakon 18. godine, prekomjerna tjelesna težina ili pretilost (za karcinom dojke u postmenopauzalnih žena), upotreba hormonske terapije u menopauzi (kombinirani estrogen i progesteron), tjelesna neaktivnost i konzumacija alkohola. Održavanje zdrave tjelesne težine, povećanje tjelesne aktivnosti i minimiziranje unosa alkohola najbolje su strategije za smanjenje rizika od razvoja karcinoma dojke (32).

Rak predstavlja stalnu bitku s puno napora za izlječenje i pronalaskom preventivne terapije. Trenutačna terapija uključuje kemoterapiju, radioterapiju i sintetske lijekove (34). Kemoterapija se rutinski koristi za liječenje raka. Budući da stanice raka gube mnoge regulatorne funkcije prisutne u normalnim stanicama, nastavljaju se dijeliti i onda kada normalne stanice nisu u fazi dijeljenja. Ovo svojstvo čini stanice raka osjetljivim na kemoterapijske lijekove. Unatoč otkriću velikog broja korisnih kemoterapeutskih lijekova, kao posljedica kemoterapije mogu se pojaviti različite vrste toksičnosti (29). Korak prema razvoju raka uključuje promjene epigenetskih procesa i njihovu deregulaciju. Kontrola hipermetilacije tumor supresorskih gena na CpG otocima deregulirana je u stanicama karcinoma. Ovo može rezultirati prigušivanjem gena i inaktivacijom tumor supresorskih gena. Lijekovi koji mogu inhibirati ili preokrenuti epigenetske promjene su u razvoju posljednjih godina. Međutim, teško je izraditi sintetski lijek koji je netoksičan za normalne stanice i specifičan je za citotoksičnost stanica raka (34). Alternativno rješenje za štetne učinke sintetičkih sredstava je upotreba ljekovitih biljaka (27).

Dugi niz godina prirodna medicina se koristila i još se koristi u zemljama u razvoju kao primarni izvor liječenja. Biljke su korištene u medicini zbog svojih prirodnih antiseptičkih svojstava. U tumorskom tkivu apoptoza se ne događa, a angiogeneza se održava što omogućava preživljavanje stanica raka, no spojevi dobiveni iz biljaka pokazuju svojstva da inhibiraju aktivnost stanica karcinoma, kao što su inhibiranje proliferacije stanica raka i induciranje apoptotske smrti stanica. Proučavani su sekundarni metaboliti u biljnom carstvu poput polifenola, flavonoida i brasinosteroida radi njihove potencijalne upotrebe kao antikancerogenih sredstava. Za njih se pokazalo da posjeduju antikancerogene aktivnosti koje uključuju; antioksidativno djelovanje; inhibiciju rasta stanica karcinoma; indukciju apoptoze; ciljnu specifičnost; citotoksičnost stanica karcinoma (34).

U svijetu se svake godine dogodi više od šest milijuna smrtnih slučajeva uslijed raka. U svijetu je dijagnosticirano oko 12,7 milijuna karcinoma, a u 2008. je zabilježeno 7,6 milijuna smrtnih slučajeva. U 2012. zabilježeno je oko 14,1 milijuna slučajeva širom svijeta, od ovih 7,4 milijuna slučajeva su bili muškarci i 6,4 milijuna žene. Očekuje se da će taj broj porast na 24 milijuna do 2035. godine. Ljekovite biljke korištene su za liječenje različitih bolesti, uključujući rak, tisućama godina. Veliki broj ljekovitih biljaka koje imaju antitumorska svojstva je dostupan u prirodi, ali nisu u potpunosti fitokemijski istražene. Trebalo bi još dublje istražiti antikancerogeni potencijal ljekovitih biljnih ekstrakta za izolaciju i karakterizaciju aktivnih tvari biljaka tako da se mogu razviti bolji, sigurniji i jeftiniji lijekovi za liječenje raka (27).

Epidemiološke studije pokazuju povezanost konzumiranja povrća iz porodice *Allium* sa smanjenim rizikom od raka. Ove studije ističu potencijalne mehanizme pojedinačnih spojeva koji sadrže sumpor te raznih pripravaka i ekstrakta ovog povrća, uključujući smanjenu bioaktivaciju karcinogena, antimikrobne aktivnosti i redoks modifikaciju. *Allium* povrće i njihove komponente imaju učinke u svakoj fazi karcinogeneze i utječu na mnoge biološke procese koji modificiraju rizik od raka (17).

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su ekstrakti iz biljnih vrsta roda *Allium*, odnosno promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije: A549 (karcinom pluća) i MDA-MB-231 (rak dojke).

Utjecaj na stanice karcinoma pluća A549 kod svih korištenih ekstrakata je značajniji pri većim koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najveći citotoksični učinak imaju ekstrakt i destilat *Allium porrum* L. pri koncentracijama od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije.

*In vitro* istraživanje na stanicama raka dojke MDA-MB-231 pokazalo je da svi ispitivani ekstrakti imaju određeni učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica, a najznačajniji učinak opet imaju ekstrakt te destilat *Allium porrum* L. pri koncentracijama od 50 µg/mL i 100 µg/mL nakon 48h inkubacije.

Na temelju dobivenih rezultata, vidljivo je da biljna vrsta *Allium spp.* ima veliki potencijal za liječenje različitih bolesti, a osobito su važna kemoprotektivna i antitumorska svojstva, koja smo u našem *in vitro* ispitivanju pokazali na stanicama karcinoma pluća i dojke. Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica tj. citotoksični učinak ovisi o njihovoj koncentraciji i vremenu izlaganja, te je glavna hipoteza potvrđena i ostvaren je cilj istraživanja. Potrebne su još dodatne *in vivo* studije koje će utvrditi njihove pozitivne učinke, kako bi se ovi spojevi ili lijekovi temeljeni na njihovoj strukturi mogli uvrstiti u terapiju različitih bolesti.

## **6. ZAKLJUČAK**

- 1) *In vitro* izlaganje stanica karcinoma pluća (A-549) i dojke (MDA-MB-231) hlapljivim spojevima izoliranih iz biljnih vrsta *Allium porrum* i *Allium ursinum* dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica.
- 2) Ispitivani hlapljivi spojevi pokazuju citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- 3) Djelovanje izoliranih hlapljivih spojeva nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica.
- 4) Citotoksični učinak hlapljivih spojeva izoliranih iz biljaka *Allium porrum* te *Allium ursinum*, što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma pluća i dojke kod životinja.



## **7. LITERATURA**

1. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 3-10.
2. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, ur. Stanica: molekularni pristup. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. Str. 631-68.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
4. <https://www.who.int/cancer/en/> Datum pristupa: 20.07.2019.
5. Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Čukelj P, Lončar J, Štruc K i sur. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Bilten 41, Zagreb, 2019. [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2016\\_zavrsna.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/01/Bilten-2016_zavrsna.pdf)
6. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i-onkologija/pregled-malignih-tumora/stanicne-i-molekularne-osnove-zlocudnosti> Datum pristupa: 03.09.2019.
7. Mao Y, Yang D, He J, Krasna M. Epidemiology of lung cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2016; 25(3):439-45.
8. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Tumori dišnog sustava i sredoprsja. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 124-31.
9. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. Chest. 1997;111(6): 1710–17.
10. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/pulmologija/tumori-pluca/karcinom-pluca> Datum pristupa: 22.07.2019.
11. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 203-13.
12. Chalasani P. Breast cancer. U: Kiluk JV, ur. Medscape. 2019. <https://emedicine.medscape.com/article/1947145-overview> Datum pristupa: 23.07.2019.
13. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/specificne-bolesti-zena/bolesti-dojke/rak-dojke> Datum pristupa: 23.07.2019.
14. Sparano JA. Breast cancer staging. U: Lee MC, ur. Medscape. 2019. <https://emedicine.medscape.com/article/2007112-overview> Datum pristupa: 23.07.2019.
15. Nordqvist C. What to know about breast cancer: treatment. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/37136.php> Datum pristupa: 24.07.2019.

16. Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Hamieh T, Nehme N, Ferrant C i sur. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Six Essentials Oils from the *Alliaceae* Family. *Molecules*. 2014; 19(12): 20034-53.
17. Nicastro HL, Ross SA, Milner JA. Garlic and Onions: Their Cancer Prevention Properties. *Cancer Prev Res*. 2015;8(3): 181-89.
18. The Editors of Encyclopædia Britannica. Allium. Encyclopædia Britannica. 2018. <https://www.britannica.com/plant/allium-plant>
19. Nikolić T. Lilianae: Aliiaceae Aghardh. U: Novoselić D, ur. Sistematska botanika: raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Zagreb: Alfa; 2013. Str. 406-09
20. Block E. Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science. Royal Society of Chemistry; 2010. Str. 21-36.
21. Zeng Y, Li Y, Yang J, Pu X, Du J, Yang X i sur. Therapeutic Role of Functional Components in Alliums for Preventive Chronic Disease in Human Being. *Evid-Based Compl Alt*. 2017.
22. Arreola R, Quintero-Fabián S, López-Roa RI, Flores-Gutiérrez EO, Reyes-Grajeda JP, Carrera-Quintanar L i sur. Immunomodulation and Anti-Inflammatory Effects of Garlic Compounds. *J Immunol Res*. 2015.
23. <https://www.plantea.com.hr/poriluk/> Datum pristupa: 08.08.2019.
24. <https://pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Allium+porrum> Datum pristupa: 08.08.2019.
25. <https://www.plantea.com.hr/medvjedi-luk/> Datum pristupa: 09.08.2019.
26. <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Allium+ursinum> Datum pristupa: 09.08.2019.
27. Sultana S, Asif HM, Nazar HMI, Akhtar N, Rehman JU, Rehman RU. Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach. *Asian Pac J Cancer P*. 2014;15(11): 4385-94.
28. <https://www.who.int/cancer/en/> Datum pristupa: 07.09.2019.
29. Desai AG, Qazi GN, Ganju RK, El-Tamer M, Singh J, Saxena AJ i sur. Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. *Curr Drug Metab*. 2008; 9(7): 581–91.
30. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Cancer Prevention Overview (PDQ®): Health Professional Version. 2019. dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66016/> Datum pristupa: 12.09.2019.
31. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf> Datum pristupa: 12.09.2019.
32. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *Ca-Cancer J Clin*. 2015;65(2): 87–108.

33. <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf> Datum pristupa:  
12.09.2019.
34. Greenwell M, Rahman PKSM. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. Int J Pharm Sci Res. 2015;6(10): 4103-12.

## **8. SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje hlapljivih izolata iz biljaka porodice lukova (*Allium spp.*) na humane karcinomske stanice pluća (A549) i dojke (MDA-MB-231). Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica, nakon izlaganja hlapljivim spojevima, smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **Materijali i metode:**

Citotoksičnost stanica se ispitivala MTT metodom kojom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja mikrovalnom destilatu i mikrovalnom ekstraktu biljne vrste *Allium porrum* te Clevenger destilatu vrste *Allium ursinum*. Uzorci biljaka su pripremljeni u pet različitih koncentracija (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL), a učinak je gledan nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost izolata određivana je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm.

### **Rezultati:**

Rezultati su prikazani grafički u odnosu vremena inkubacije i postotka metabolički aktivnih stanica.

Kod stanica karcinoma pluća, hlapljivi izolati iz biljaka porodice *Allium* (uzorci mikrovalni destilat i mikrovalni ekstrakt iz *Allium porrum*) ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama, pri različitim vremenima inkubacije. Kod uzorka Clevenger hidrodestilata iz *Allium ursinum* dugoročno gledano svaka od koncentracija daje otprilike jednak (konstantan) učinak. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju uzorci mikrovalni destilat i mikrovalni ekstrakt pri koncentraciji od 100 µg/mL, nakon 72h inkubacije.

Kod stanica karcinoma dojke, hlapljivi izolati iz biljaka porodice *Allium* (uzorci mikrovalni destilat i mikrovalni ekstrakt iz *Allium porrum* te Clevenger hidrodestilat iz *Allium ursinum*) također ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama, pri različitim vremenima inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju uzorci mikrovalni destilat i mikrovalni ekstrakt pri koncentraciji od 100 µg/mL, nakon 72h inkubacije.

### **Zaključak:**

*In vitro* izlaganje stanica karcinoma pluća (A-549) i dojke (MDA-MB-231) hlapljivim izolatima iz biljaka porodice *Allium* dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Ispitivani hlapljivi spojevi pokazuju citotoksični učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.

Djelovanje izoliranih hlapljivih spojeva nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak hlapljivih izolata iz biljaka porodice lukova (*Allium spp.*), što je ujedno i hipoteza našeg ispitivanja, je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka *in vivo* ispitivanjem na modelima karcinoma dojke i pluća kod životinja.

## **9. SUMMARY**



**The aim of the research:**

The aim of the research is to examine the potential cytotoxic effects of volatile isolates from *Allium* family on human carcinoma cells of lungs (A549) and breast (MDA-MB-231). The assumption is that after the exposure of carcinoma cells to volatile compounds their number will be reduced in comparison to the control group.

**Material and methods:**

The cytotoxicity of cells was tested by the MTT method used to determine the percentage of metabolically active cells after exposure to microwave distillate and microwave extract from *Allium porrum* and Clevenger hydrodistillate from *Allium ursinum*. Plant samples were prepared at five different concentrations (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL), and the effect is seen after 4, 24, 48 and 72 hours. The efficacy of the extracts was observed spectrophotometrically after measurement of absorbance at 570 nm.

**Results:**

The results are graphically presented in relation to incubation times and the percentages of metabolically active cells.

In lung cancer cells, volatile isolates from *Allium* family (microwave distillate and microwave extract from *Allium porrum* samples) have a better effect at higher concentrations, at different incubation times. In the Clevenger hydrodistillate sample from *Allium ursinum*, in the long run, each of the concentrations has approximately the same (constant) effect. The most significant effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by microwave distillate and microwave extract samples at a concentration of 100 µg /mL after 72-hour incubation time.

In breast carcinoma cells, volatile isolates from *Allium* family (microwave distillate and microwave extract from *Allium porrum* and Clevenger hydrodistillate from *Allium ursinum* samples) also have a better effect at higher concentrations, at different incubation times. The most significant effect on the reduction of metabolically active cells is achieved by the microwave distillate and microwave extract samples at the concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time.

**Conclusion:**

*In vitro* exposure of human carcinoma cells of lungs (A549) breast (MDA-MB-231) to volatile isolates from *Allium* family leads to reduced cell survival rate. Cytotoxic effects of volatile

compounds depend on concentration and incubation time. Effect of isolated volatile compounds is not always proportional to the increase in concentration and incubation time and in some cases cell recovery occurs. The cytotoxic effect of volatile isolates from *Allium* family is confirmed, which was the hypothesis of the research, and the next step is the confirmation of these effects by *in vivo* studies on the models of animal breast and lung cancers.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OPĆI PODATCI**

**Ime i prezime:** Petra Kljenak

**Datum i mjesto rođenja:** 23. prosinca 1994., Split, Republika Hrvatska

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa stanovanja:** Kašićeva 23, 21312 Podstrana, Republika Hrvatska

**E-adresa:** [pkljenak23@gmail.com](mailto:pkljenak23@gmail.com)

## **OBRAZOVANJE**

2001. – 2009. Osnovna škola „Strožanac“, Podstrana

2009. – 2013. I. gimnazija, Split

2013. – 2019. Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, studij farmacije

## **ZNANJA I VJEŠTINE**

Vozačka dozvola B kategorije

Aktivno korištenje engleskog jezika

Poznavanje talijanskog jezika