

Citotoksično djelovanje ekstrakata pupa masline na staničnim linijama karcinoma dojke

Kuštre, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:171:794895>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

JOSIP KUŠTRE

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE EKSTRAKATA PUPA MASLINE NA STANIČNIM
LINIJAMA KARCINOMA DOJKE**

Diplomski rad

Akadska godina:

2021./2022.

Mentor:

doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

Split, listopad 2022. godine

**SVEUČLIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

JOSIP KUŠTRE

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE EKSTRAKATA PUPA MASLINE NA STANIČNIM
LINIJAMA KARCINOMA DOJKE**

Diplomski rad

Akadska godina:

2021./2022.

Mentor:

doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

Split, listopad 2022. godine

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumor	2
1.2. Karcinom	3
1.3. Onkogeni i tumor-supresorski geni	8
1.3.1. Onkogeni	8
1.3.2. Tumor-supresorski geni	9
1.4. Karcinom dojke	10
1.4.1. Epidemiologija i etiologija	10
1.4.2. Patohistologija	11
1.4.3. Klinička slika i dijagnostika	12
1.4.4. Klasifikacija i određivanje stadija	13
1.4.5. Liječenje i prognoza	15
1.5. Maslina	16
1.5.1. Fenolni spojevi masline	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
2.1. Cilj istraživanja	21
2.2. Hipoteza istraživanja	21
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1. Stanične linije	23
3.2. Postupak	25
3.3. Test citotoksičnosti	25
3.4. Kemijski spojevi	27
3.5. Ekstrakcija biljnog materijala	28
4. REZULTATI	30

4.1. Karcinom dojke – stanična linija MDA-MB-231	31
4.2. Karcinom dojke – stanična linija MCF-7	33
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČAK	40
7. LITERATURA.....	42
8. SAŽETAK.....	49
9. SUMMARY	51
10. ŽIVOTOPIS	53

ZAHVALA

Najveću i najvažniju zahvalu želio bih uputiti mojim roditeljima, Meri i Borisu. Bez njihove bezuvjetne podrške u svakom trenutku mog života, pa i školovanja, teško da bih mogao ostvariti ikakav uspjeh. Ovaj rad posvećujem upravo njima jer je njihova zasluga u završetku mog studija, u najmanju ruku, jednaka kao i moja.

Također, želim zahvaliti i mojim dvjema starijim sestrama, Andrei i Tei, što su mlađem bratu odlučile biti sve ono zbog čega vrijedi imati sestre i sve dobro što on sam nikad nije mogao biti.

Mojoj mentorici, doc. Nikolini Režić Mužinić, želim zahvaliti ne samo na vremenu i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada nego i na pristupu kojim je omogućila da i posljednje poglavlje mog školovanja prođe što lakše i bezbolnije.

Zahvaljujem i svim prijateljima na društvu i na činjenici da bi bez njih moj svijet bio puno lošije mjesto.

„But man is not made for defeat. A man can be destroyed but not defeated“.

- Ernest Hemingway

POPIS KRATICA

ACS – Američko društvo za borbu protiv raka (engl. *American Cancer Society*)

APC – Adematозна polipoza kolona (engl. *Adematous polyposis coli*)

BRCA1 – Gen za rak dojke 1 (engl. *Breast cancer gene 1*)

BRCA2 – Gen za rak dojke 2 (engl. *Breast cancer gene 2*)

DMSO – Dimetil sulfoksid (engl. *Dimethyl sulfoxide*)

DNA – Deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

EGFR – Receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal growth factor receptor*)

HDL – Lipoprotein visoke gustoće (engl. *High-density lipoprotein*)

HER2 – Ljudski receptor za epidermalni faktor rasta 2 (engl. *Human epidermal growth factor receptor 2*)

KOPB – Kronična opstruktivna plućna bolest

LDL – Lipoprotein niske gustoće (engl. *Low-density lipoprotein*)

MCF-7 – Michiganska zaklada protiv raka-7 (engl. *Michigan Cancer Foundation-7*)

NAD(P)H – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

RB – Retinoblastom (engl. *Retinoblastoma*)

TNM – Tumor, čvorovi i metastaze (engl. *Tumor, nodes and metastases*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

1. UVOD

1.1. Tumor

Tumorom se naziva patološka tvorba do koje dolazi zbog abnormalne proliferacije stanica. Naziv „tumor“ na latinskom znači oteklina, a drugi naziv za tumore je neoplazma (grč. *neos* – nov, *plasia* – rast) odnosno, u hrvatskom prijevodu, novotvorina. Bolest uzrokovana zloćudnim novotvorinama još se naziva i rak. Rast novotvorina može se opisati kao nepravilan, nesvrhovit, autonoman i parazitaran (1).

Po tipu stanica iz kojih nastaju, tumori se dijele u nekoliko skupina. Najčešći su karcinomi, koji nastaju iz epitelnih stanica. Sarkomi su relativno rijetki tumori, a predstavljaju solidne tumore veziva, odnosno tumore mišića, kosti i hrskavice. Leukemije i limfomi su tumori krvotvornih stanica i stanica imunološkog sustava. Tumori se mogu podijeliti i na temelju organa iz kojeg potječu i vrste stanica koje ih čine (2).

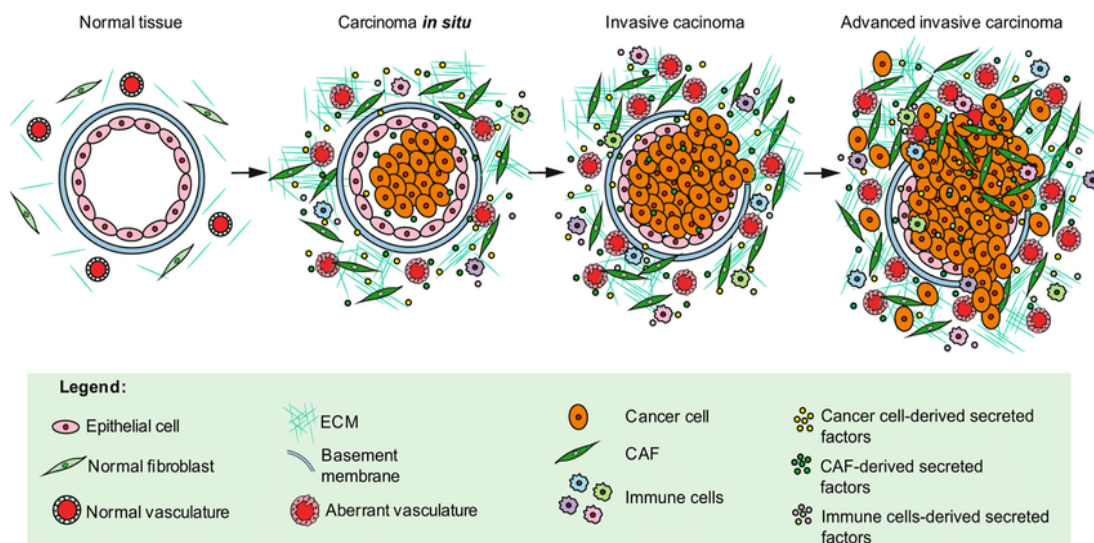
Klinički, tumori se mogu podijeliti u dvije skupine: dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne). Dobroćudni tumori uglavnom ne ugrožavaju zdravlje ozbiljno te im je klinički ishod u većini slučajeva povoljan. Zloćudni tumori predstavljaju ozbiljan klinički problem te ako se ne liječe, a u nekim slučajevima i unatoč liječenju, uzrokuju smrtni ishod. Dobroćudni tumori rastu sporo, u većini slučajeva su ograničeni na ishodišni organ, a obilježeni su ekspanzivnim rastom kojim pritiskuju okolno tkivo. Dobroćudni su tumori oštro ograničeni u odnosu na zdravo tkivo te zbog dobre krvne opskrbe u njima nema ulceracija ili područja nekroze. Građeni su od stanica koje nalikuju na normalne stanice, s malim, pravilnim jezgrama. Zloćudni tumori rastu puno većom brzinom nego dobroćudni. Nepravilni su i nisu jasno ograničeni od zdravog tkiva. Za razliku od ekspanzivnog rasta dobroćudnih tumora, zloćudni tumori rastu infiltrativno pri čemu razaraju tkivo ishodišnog organa. Karakteristika zloćudnih tumora je sposobnost metastaziranja (grč. *metastasis* – promjena mjesta), odnosno širenje tumora putem krvi ili limfe u druge, udaljene dijelove tijela. Zloćudni su tumori građeni od stanica koje ne nalikuju normalnim stanicama, a jezgre su im nepravilne, razlikuju se jedna od druge te im je nukleo-citoplazmatski omjer povećan u korist jezgre (3).

Etiološki, tumori spadaju među najkompleksnije bolesti. Uzrokovani su interakcijom utjecaja iz okoliša i genetičke predispozicije. Poremećaji tih dvaju čimbenika dovode do promjena DNA što za posljedicu ima nekontrolirani rast stanica. Neki tumori imaju i poznat uzrok pa se tako razlikuju:

1. Genski uvjetovani tumori – posljedica su genskih mutacija, a primjeri su tumori ovojnica perifernih živaca u neurofibromatozi tip I, tumori kolona u FAP (familijarna adenomatozna polipoza) ili tumori endokrinih žlijezda u MEN sindromima (multipla endokrini neoplazija).
2. Tumori uzrokovani egzogenim kancerogenima – primjeri su tumori kože uzrokovani štetnim djelovima UV zračenja ili rak pluća kod pušača.
3. Tumori uzrokovani virusima – primjeri tumora čiji su uzrok virusi su Kaposijev sarkom uzrokovan humanim herpesvirusom tip 8 (HHV-8), tumor vrata maternice koji uzrokuje humani papilomavirus (HPV) ili Burkittov limfom uzrokovan Epstein-Barr virusom (EBV) (4).

1.2. Karcinom

Karcinom je najčešći tip tumora. Karcinom je zloćudni tumor koji nastaje iz epitelnih stanica. Razlikuje se nekoliko oblika karcinoma kao što su: karcinom *in situ* (engl. *carcinoma in situ*), invazivni karcinom (engl. *invasive carcinoma*) i metastatski karcinom (engl. *advanced invasive carcinoma*) (Slika 1). Karcinom *in situ* je karcinom ranog stadija ograničen na jedan sloj tkiva od kojeg potječe. Invazivni se karcinom širi na okolna tkiva, dok metastatski karcinom daje udaljene metastaze. Maligni tumori žljezdanog podrijetla nazivaju se adenokarcinomima, dok zloćudni tumori solidnih organa nose nazive organa u kojima su nastali, npr. kolorektalni karcinom. Nastanak karcinoma povezan je s raznim čimbenicima rizika. Povećani rizik za gotovo sve tipove karcinoma predstavlja starija dob, konzumacija alkohola i nikotina, izlaganje ultraljubičastom zračenju te različitim kemijskim iritansima. Među važne čimbenike rizika ubraja se i prehrana. Veći je rizik povezan s prekomjernom tjelesnom težinom i tjelesnom neaktivnosti. Različite infekcije također mogu utjecati na razvoj karcinoma, poput infekcije humanim papilomavirusom kod karcinoma vrata maternice ili infekcije bakterijom *Helicobacter pylori* kod razvoja karcinoma želuca. Također, velik broj genetskih poremećaja povezan je s nastankom karcinoma, kao što su mutacije gena BRCA1 i BRCA2 kod karcinoma dojke ili pak mutacije gena APC kod nastanka kolorektalnog karcinoma (5).

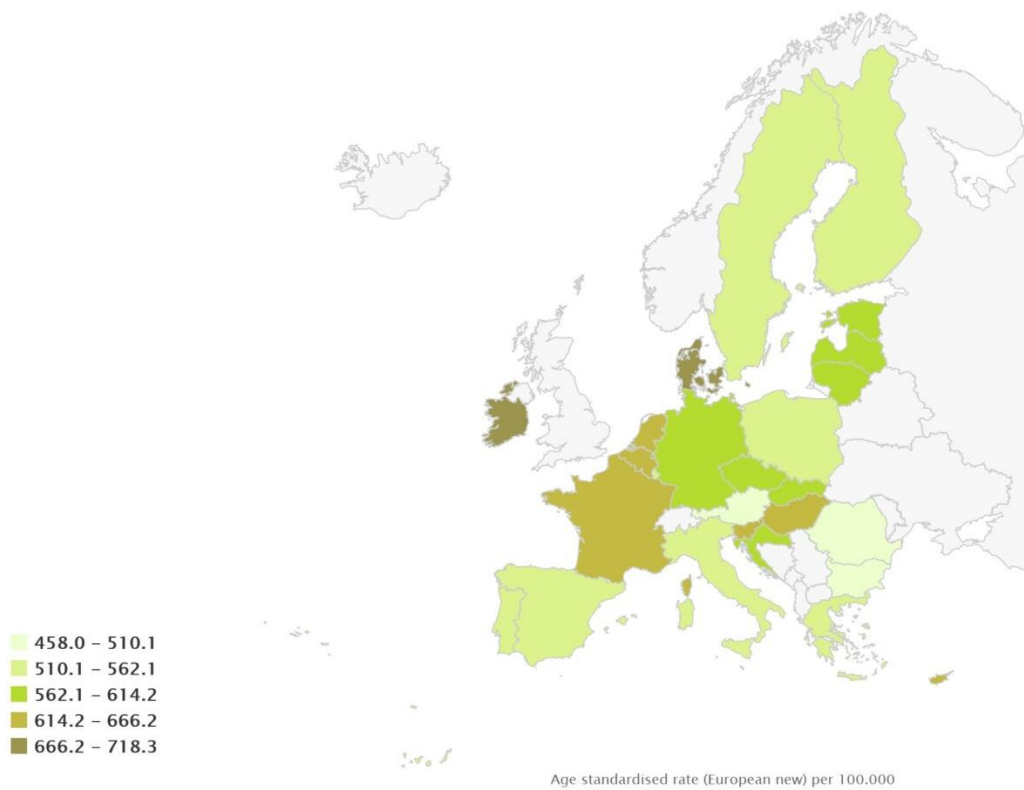


Slika 1. Progresija karcinoma (6).

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/Tumor-progression-Schematic-representation-of-tumor-development-with-highlighted-stromal_fig1_322089781

Datum preuzimanja: 13. 8. 2022.

Među svim ljudskim bolestima, prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) i Američkog društva za borbu protiv raka (engl. *American Cancer Society*, ACS) karcinomi, odnosno rak, predstavljaju najveće opterećenje u kliničkom, društvenom i ekonomskom smislu. Sveukupni rizik za razvoj raka je 20,2 % (22,4 % za muškarce i 18,2 % za žene). Tijekom 2018. godine dijagnosticirano je više od 18 milijuna novih slučajeva raka, od čega su najčešći bili rak pluća s 2,09 milijuna novih slučajeva, rak dojke s istim brojem kao i rak pluća te rak prostate s 1,28 milijuna novih slučajeva u svijetu. Incidencija raka se razlikuje u pojedinim državama, kao što je prikazano na primjeru Europske Unije na Slici 2. (7).



Slika 2. Incidencija raka u zemljama EU (7).

Preuzeto s: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>

Datum preuzimanja: 13. 8. 2022.

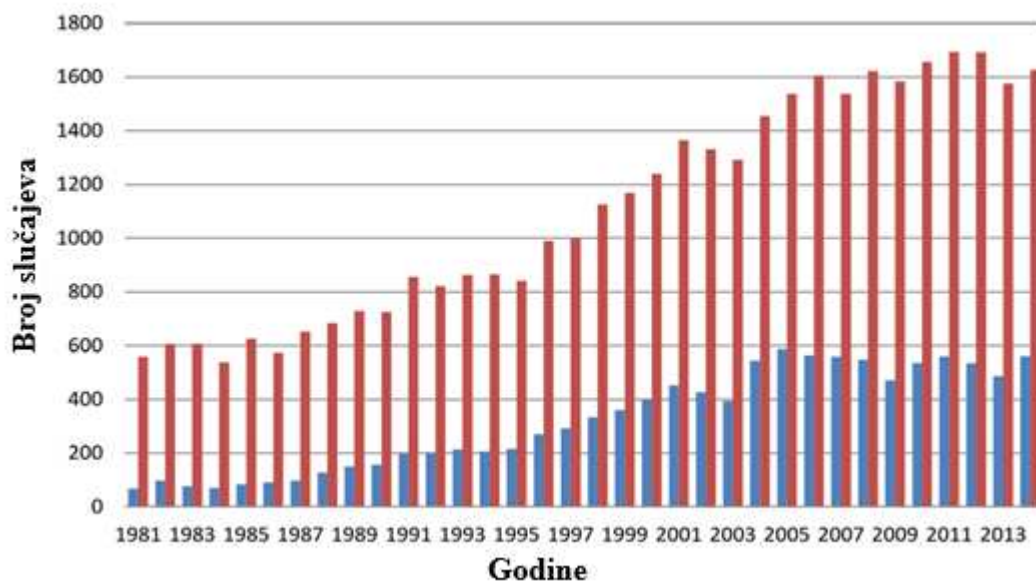
Rak je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu, nakon kardiovaskularnih bolesti, a očekuje se da će do 2060. godine postati prvi te uzrokovati gotovo 19 milijuna smrtnih slučajeva diljem svijeta. Među najsmrtonosnije karcinome ubrajaju se karcinom želuca, pluća, jetre, jednjaka, gušterače te multiformni glioblastom na mozgu. Sveukupno je rak pluća vodeći uzrok smrti u muškaraca, a rak dojke u žena. Među karcinome s najboljom prognozom ubrajaju se karcinom prostate i određene vrste karcinoma štitnjače s petogodišnjim preživljenjem od gotovo 100 % dok karcinom jednjaka, jetre i gušterače tijekom pet godina imaju preživljenje manje od 20 %. Zbog starenja populacije očekivano je povećanje broja oboljelih od raka u svijetu (8).

Kao i u ostatku svijeta (Slika 3.), i u Hrvatskoj rak predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Hrvatski zavod za javno zdravstvo redovno objavljuje podatke važne za borbu protiv raka putem Registra za rak. Stopa incidencije i mortaliteta od raka je u porastu u razdoblju od 1990. g. do 2014. g. te je u 2014. godini incidencija iznosila 500,2/100 000 stanovnika, a mortalitet 325,3/100 000. Pet najčešćih sijela raka u muškaraca su traheja, bronh i pluća, kolon, rektum, rektosigma i anus, prostata te mokraćni mjehur. Kod žena su to pak bili dojka, kolon, traheja, bronh i pluća, štitnjača te trup maternice. Tijekom života može se promijeniti sklonost pojavnosti određenih sijela. Kako bi se spriječilo povećanje incidencije zloćudnih bolesti najvažnije su intenzivne mjere primarne prevencije (9).

Primarna prevencija zloćudnih bolesti podrazumijeva edukaciju o čimbenicima rizika, uklanjanje ili smanjenje izloženosti tim istim čimbenicima te usvajanje zdravih životnih navika u cilju očuvanja i poboljšanja zdravlja. Primarna prevencija odnosi se na mjere kojima je cilj sprječavanje nastanka bolesti te se one provode prije razvoja bolesti. Mjere primarne prevencije odnose se na cjelokupnu populaciju, na sve dobne skupine, a posebna odgovornost leži na zdravstvenim djelatnicima koji imaju značajnu ulogu u podizanju razine svijesti o problemima zloćudnih bolesti (10).

Najvažniji promjenjivi (preventabilni) čimbenik rizika za nastanak zloćudnih bolesti je pušenje. Ono je povezano s razvojem raka različitih sijela kao što su pluća, grkljan, usna šupljina, jednjak, gušterača, bubreg, kolon itd. Pušenje povećava rizik i od brojnih drugih bolesti kao što su respiratorne bolesti (astma i KOPB) i kardiovaskularne bolesti. Liječnici bi trebali uložiti značajne napore da pokušaju svoje pacijente odvratiti od pušenja i pomognu im prestati pušiti ako su pacijenti već pušači (11).

Mjere sekundarne prevencije zloćudnih bolesti uključuju probir odnosno „screening“ za različite vrste raka. Mjere probira povećavaju šanse za rano otkrivanje raka odnosno premalignih lezija. Neke od zloćudnih bolesti za koje se provodi probir su rak dojke (mamografija), rak vrata maternice (Papa test) ili kolorektalni karcinom (test na okultno krvarenje). Nažalost, suradljivost pacijenata i uporaba mjera probira je još uvijek ispod zadovoljavajuće razine (12).



Slika 3. Broj slučajeva raka u razdoblju od 1981. do 2013. godine na karipskom području (13).

Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/Number-of-cancer-cases-per-year-over-the-period-1981-2014-as-per-2017-data-from-the_fig2_326630571

Datum pristupa: 13. 8. 2022.

1.3. Onkogeni i tumor-supresorski geni

1.3.1. Onkogeni

Onkogeni predstavljaju mutacije regulatornih gena koje nazivamo protoonkogenima. Onkogeni su otkriveni kod retrovirusa gdje su izazivali brojne vrste raka kod životinja. Promjene protoonkogeni uzrokuju promjene u kvaliteti ili kvantiteti njihovih proteinskih produkata koji se nazivaju onkoproteinima. Onkogeni, u odsutnosti tumor-supresorskih gena i uz djelovanje brojnih drugih onkogeni, blokiraju apoptozu, potiču staničnu proliferaciju te uzrokuju gubitak regulacije staničnih ciklusa te tako sudjeluju u nastanku tumora (14).

Mnogi protoonkogeni su geni za tirozin-kinaze, jer se signali unutar stanice često prenose procesom fosforilacije proteina. Aktivacija onkogeni je proces kojim protoonkogeni postaju aktivniji te tako nastaju onkogeni, čime dolazi do rasta i diobe stanica bez adekvatne kontrole. Postoje brojni načini na koje može doći do aktivacije protoonkogeni i nastanka onkogeni. Mutacije mogu biti u samom genomu, kao kod onkogeni *RAS*, kod onkogeni *ERBB2 (HER2/neu)* dolazi do povećanja broja kopija gena tj. do amplifikacije gena, dok je kod određenih aktivacija prisutna kromosomska aberacija npr. u Burkittovu limfomu se kao posljedica kromosomske translokacije aktivira onkogen *MYC*, dok se u bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom nalazi tzv. *Philadelphia* kromosom koji nastaje translokacijom između 9. i 22. kromosoma čime se protoonkogen *ABL* spoji s genskom regijom *BCR* te se time aktivira. Pojačana aktivnost onkoproteina rezultat je pojačane transkripcije ili promjene u strukturi samog proteina. Zajedničko svim mutacijama je da dovode do gubitka regulacije aktivnosti određenog onkoproteina. Onkogeni se mogu svrstati u brojne skupine kao što su geni za receptore čimbenika rasta (*KIT, RET, ERBB1, ERBB2*), geni koji sudjeluju u prijenosu signala (*RAS, RAF, MOS*) ili pak geni za transkripcijske čimbenike na kraju signalnih puteva (*MYC, FOS, JUN*). Istraživanja na onkogenima i njihovim signalnim putevima otvaraju brojne mogućnosti za razvoj lijekova koji ciljano djeluju kao što su monoklono protutijelo cetuksimab, koje djeluje inhibitorno na receptor za epidermalni čimbenik rasta (*EGFR*) ili neki drugi lijekovi poput imatiniba koji djeluje kao inhibitor protein-kinaza (15).

1.3.2. Tumor-supresorski geni

Za razliku od onkogeni, kod tumor-supresorskih gena mora doći do inaktivacije da bi došlo do nastanka raka (Tablica 1). Druga važna razlika je da mutacije tumor-supresorskih gena imaju recesivan učinak, što znači da oba alela moraju biti inaktivirana da bi došlo do učinka, dok je kod onkogeni vidljiv dominantan učinak gdje je aktivacija samo jednog alela dovoljna. Gen *RB* bio je prvi otkriveni tumor-supresorski gen, a povezan je s retinoblastomom. Jedan od najvažnijih tumor-supresorskih gena je *P53*, čiji se proteinski produkt aktivira zbog oštećenja DNA stanice. Taj gen djeluje na dva načina: zaustavljanjem stanice u jednoj od faza staničnog ciklusa uz aktiviranje popravka DNA i indukcijom apoptoze u slučaju da popravak DNA bude neuspješan. Apoptoza je kontrolirani način umiranja stanica koji među ostalim uzrokuje i smrt potencijalnih tumorskih stanica. Kad u stanici nedostaje gen *P53* u diobu ulaze i stanice s oštećenom DNA što povećava mogućnost za nastanak tumora odnosno raka. Do nastanka raka može doći i zbog poremećaja u staničnom ciklusu. Različite kontrolne točke postoje u staničnom ciklusu u kojima se provjerava može li stanica ući u sljedeću fazu, a u tim točkama se stanicama s oštećenom DNA priječi prelazak u sljedeću fazu. Najvažniji regulatori staničnog ciklusa su ciklini, kinaze ovisne o ciklinima i njihovi inhibitori. Kada se aktiviraju onkogeni koji sudjeluju u određenim putevima staničnog ciklusa dolazi do poremećaja kao što je nekontrolirana proliferacija stanica (16).

Mutacije koje dovode do gubitka funkcije tumor-supresorskih gena mogu se pronaći u mnogim tipovima raka, poput raka jajnika, pluća, kolona, gušterače, glave i vrata, mokraćnog mjehura ili dojke. Postoje i određeni sindromi koji su karakterizirani mutacijama tumor-supresorskih gena poput Li-Fraumenijeva sindroma koji je povezan s gubitkom funkcije gena *P53* (17).

S obzirom na to da tumor-supresorski geni sudjeluju u regulaciji različitih staničnih mehanizama, kao što su regulacija kontrolnih točki, detekcija i popravak oštećenja DNA, regulacija signalnih puteva, degradacija proteina, migracija i diferencijacija stanica te angiogeneza, postali su središnja tema suvremenih istraživanja o raku (18).

Tablica 1. Razlika tumor-supresorskih gena i protoonkogeni (19).

Preuzeto s: <https://pediaa.com/difference-between-tumor-suppressor-genes-and-Proto-oncogenes/>

Datum pristupa: 17. 8. 2022.

TUMOR-SUPRESORSKI GENI	PROTOONKOGENI
Protektivni geni koji pomažu u kontroli rasta stanica	Normalni geni koje mutacije pretvaraju u onkogene te sudjeluju u nastanku tumora
Mutacije uzrokuju tumore mijenjajući genske produkte koji inhibiraju progresiju staničnog ciklusa	Mutacije uzrokuju tumore mijenjajući genske produkte tako da povećaju njihovu ekspresiju
Suprimiraju staničnu diobu	Potiču staničnu diobu
Inaktivacija uzrokuje tumore	Aktivacija uzrokuje tumore
Delecije ili točkaste mutacije su najčešći oblici mutacija	Točkaste mutacije, amplifikacije te kromosomske translokacije su najčešći oblici mutacija
Mutacije mogu nastati u somatskim stanicama ili stanicama zametne linije	Mutacije nastaju u somatskim stanicama
Pokazuju visoku tkivnu specifičnost	Pokazuju nisku tkivnu specifičnost
Oba alela moraju biti mutirana, dakle razvoj tumora je recesivan	Mutacija jednog alela uzrokuje tumore, dakle razvoj tumora je dominantan
Manje agresivno ponašanje	Agresivnije ponašanje
Primjeri: <i>RB, APC, BRCA1</i>	Primjeri: <i>Ras, HER-2, BCR/ABL, EGFR, VEGF</i>
Mutacije uzrokuju retinoblastom, karcinom kolona, karcinom dojke itd.	Mutacije uzrokuju mijeloidnu leukemiju, karcinom dojke, karcinom bubrega itd.

1.4. Karcinom dojke

1.4.1. Epidemiologija i etiologija

Najčešći rak i najčešći uzrok smrti od raka u žena je upravo rak dojke. Postoje brojni čimbenici rizika za nastanak raka dojke, a među najvažnijima su prehrana, pušenje, uznapredovala dob, pozitivna obiteljska anamneza, zračenje i hormonska terapija. Također, i genetske promjene mogu utjecati na nastanak raka dojke, pa su tako otkrivena dva tumor-supresorska gena *BRCA 1* i *BRCA 2* čije mutacije imaju direktan utjecaj na nastanak raka dojke. Rana detekcija važna je za uspjeh terapije i preživljenje (20).

Manje od 10 % raka dojke uzrokovano je nasljednim mutacijama, a češće je rak dojke povezan s okolišnim i reproduktivnim čimbenicima, kao i stilom života (21).

Rak dojke, s nešto manje od milijun i 400 tisuća novih slučajeva godišnje, značajan je javnozdravstveni problem. Pokazuje izrazitu heterogenost u smislu da postoje oblici s izrazito sporim rastom i odličnom prognozom, ali i vrlo agresivni oblici. Prema procjenama Američkog društva za borbu protiv raka (engl. *American cancer society*) svaka osma žena u Sjedinjenim Američkim Državama razvit će rak dojke tijekom svog života. Također procjenjuje se da će svjetska incidencija raka dojke doseći oko 3,2 milijuna novih slučajeva godišnje do 2050. godine. Različita tehnološka dostignuća uvelike su doprinijela ranom otkrivanju bolesti i sprječavanju nastanka metastaza. Međutim, i dalje su prisutne brojne prepreke i pitanja kako rak dojke djeluje na molekularnoj razini. Epidemiološka istraživanja su pokazala i da su problemi socio-ekonomske prirode vrlo važni tako da svaka žena ima jednak pristup medicinskoj skrbi od probira pa do najnaprednijih oblika liječenja, i samo odlučne mjere mogu dovesti do ozbiljnog napretka u borbi protiv ove bolesti (22).

Godišnje se u Hrvatskoj dijagnosticira oko 2600, dok oko 800 žena umre svake godine. Rak dojke je i u Hrvatskoj, kao i u ostatku zapadnog svijeta, na prvom mjestu po incidenciji kod ženskog spola te se Hrvatska svrstava u zemlje s visokom incidencijom. Standardizirana incidencija iznosi 66/100000 žena. Nasuprot tomu učestalost je u Aziji mnogo niža (23).

1.4.2. Patohistologija

Rak dojke heterogena je bolest s različitim biološkim i histološkim osobinama, kliničkim prezentacijama i odgovorom na terapiju. Studije su otkrile molekularnu podlogu nekoliko karakteristika ove bolesti, između ostaloga i histološki stupanj te sklonost metastaziranju. Nadalje, molekularne analize na mišjim modelima dokazale su izravnu povezanost određenih gena u nastanku određenih histološki posebnih tipova raka dojke (24).

Rak dojke nastaje iz epitela terminalnih duktulo-lobularnih jedinica žljezdanog parenhima dojke. Dijeli se na karcinom *in situ* koji ne probija bazalnu membranu i na invazivni karcinom koji je probio bazalnu membranu. Najčešći tipovi raka su invazivni duktalni karcinom, invazivni lobularni karcinom i invazivni karcinom nespecifičnog tipa (NST). Postoje i specifični oblici koji su ipak rjeđi, kao što su mucinozni, tubularni, metaplastični, papilarni, mikropapilarni te medularni oblik karcinoma. Na osnovi genskih i imunohistokemijskih obilježja, tumori dojke dijele se na luminalne tumore tipa A i tipa B, HER2 pozitivne i trostruko

negativne tumore. Luminalni tumori tipa A imaju visoku razinu progesteronskih i estrogenskih receptora, Ki-67 (pokazatelj proliferacije tumorskih stanica) manji od 20 % i pokazuju HER2 pozitivnost. Luminalni tumori tipa B imaju razinu receptora za progesteron nižu od 20 % ili Ki-67 viši od 20 % ili pokazuju HER2 pozitivnost. Trostruko negativni tumori ne pokazuju ni estrogensku ni progesteronsku ni HER2 pozitivnost te imaju najlošiju prognozu. Pri opisivanju raka dojke potrebno je navesti veličinu tumora u dvije dimenzije, stupanj zloćudnosti, aktivnost proliferacije ili udio stanica u mitozu kroz Ki-67 indeks, status HER2 i hormonskih receptora, status limfnih čvorova aksile, moguću invaziju krvnih i limfnih žila te navesti je li tumor u potpunosti uklonjen operativnim zahvatom (25).

Postoje dvije vrste heterogenosti tumora dojke: intertumorska i intratumorska heterogenost. Heterogenost može postojati i između primarnog tumora i metastaza kao i unutar samog primarnog tumora, iako je još uvijek ta vrsta heterogenosti slabo istražena. Sve navedene vrste heterogenosti mogle bi imati velik klinički značaj. Kako se razvija sve više specijalizirana i personalizirana medicina važno je odrediti svaki poseban tip tumora te će nova otkrića o heterogenosti tumora pomoći u razvoju individualnog pristupa liječenju tumora dojke (26).

1.4.3. Klinička slika i dijagnostika

Najčešći simptom raka dojke je kvržica na dojci, koji se može naći u oko četiri petine svih pacijenata. Slijede različiti simptomi poput nepravilnosti bradavice, otečenosti dojke, iritacije kože regije, krvavog iscjetka iz bradavice i boli u dojci. Uz rak dojke vežu se i različiti opći simptomi kao što su umor, smetnje disanja, bol ili kvržica u području aksile, bol u leđima, kvržica na vratu i gubitak tjelesne težine (27).

Kao što je i uobičajeno u medicini, dijagnostika raka dojke započinje anamnezom i kliničkim pregledom. Potrebno je definirati izloženost čimbenicima rizika te postojanje simptoma, eventualno vrijeme njihove pojave i duljinu trajanja. Klinički pregled započinje inspekcijom kojom se istražuje simetrija dojki i postojanje nepravilnosti kože ili limfnih čvorova. Zatim slijedi palpacija dojke i regionalnih limfnih čvorova. Jako važna metoda ranog otkrivanja raka dojke je mamografija koja se koristi x-zrakama niskih energija, a koristi se i za potvrdu palpabilnog nalaza. Preporuka je da svaka žena napravi prvi mamogram u dobi od četrdeset godina (ranije u slučaju pozitivne obiteljske anamneze), a nakon toga se ponavlja svake dvije do tri godine ili po potrebi i češće. Pregled dojki ultrazvukom metoda je koja se

najviše koristi u dijagnostici raka dojke. Manje je specifičan i senzitivan u postavljanju rane dijagnoze nego mamografija. Nakon što se u dojci pronađe tvorba za koju se sumnja na tumor mora se provesti punkcija te patohistološka ili citološka analiza kojom se može isključiti ili potvrditi dijagnoza maligne bolesti. Nakon potvrđene dijagnoze maligne bolesti potrebno je bolesnicu uputiti na daljnju obradu usmjerenu na otkrivanje ili isključenje metastatske bolesti. Potrebno je napraviti laboratorijske pretrage krvi (KKS, DKS, biokemija), RTG pregled prsišta i UZV pregled abdomena, a ako postoje opravdane sumnje provode se usmjerene pretrage, npr. scintigrafija skeleta (28).

Neki oblici karcinoma dojke može se dijagnosticirati i slučajno ili kroz probir mamografijom. Zajedničke karakteristike zloćudnih bolesti dojke su palpabilna masa u dojci, uvlačenje kože oko tumora te edem zbog kojega koža dobiva izgled narančine kore (franc. *peau d'orange*), fiksacija tumora za prsnu stijenku, promjene u limfnim čvorovima te, ako karcinom napreduje, pojavljivanje udaljenih metastaza (29).

1.4.4. Klasifikacija i određivanje stadija

Za određivanje stadija karcinoma dojke koristi se TNM klasifikacija (Tablica 2.), pri čemu T označava veličinu primarnog tumora, N označava zahvaćenost limfnih čvorova, a M označava prisustvo udaljenih metastaza. Iako TNM klasifikacija ne može odrediti tijek i ishod bolesti kod pojedinih pacijentica sa sigurnošću, liječnicima ta klasifikacija može pružiti pomoć pri procjeni ishoda i prognoze bolesti (30).

Tablica 2. TNM klasifikacija karcinoma dojke (31).

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 ≤ 20 mm u najvećem promjeru
T1mi	tumor ≤ 1 mm u najvećem promjeru
T1a	tumor > 1 mm, ali ≤ 5 mm u najvećem promjeru
T1b	tumor > 5 mm, ali ≤ 10 mm u najvećem promjeru
T1c	tumor > 10 mm, ali ≤ 20 mm u najvećem promjeru
T2	tumor > 20 mm, ali ≤ 50 mm u najvećem promjeru

T3	tumor > 50 mm u najvećem promjeru
T4	tumor bilo koje veličine s direktnom invazijom stijenke 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 stijenke 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 (engl. <i>isolated tumor cells</i>)
N0 (i+)	samo ITC (nakupine malignih stanica ne veće od 0,2 mm) u regionalnim limfnim čvorovima
N0 (mol+)	pozitivan nalaz RT-PCR-om; nije se detektiralo ITC
N1mi	mikrometastaze (> 0,2 mm, ali ≤ 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 čuvarne, 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 mamarnim limfnim čvorovima, s 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 mamarni 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

Osim određivanja TNM stupnja potrebno je odrediti i stadij bolesti (Tablica 3.).

Tablica 3. Stadiji karcinoma dojke (31).

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 i prognoza

Liječenje raka dojke je multidisciplinarno, a cilj liječenja je određen stupnjem proširenosti tumora. U ranom stadiju pokušava se provesti liječenje u kojem je cilj sačuvati dojku. Biopsija tzv. čvora čuvara (*sentinel* čvor) tj. prvog čvora u aksilarnom drenažnom području se rabi kao metoda probira za disekciju limfnih čvorova. Adjuvantna sistemska terapija koristi se u pacijentica u kojih je dokazan pozitivan učinak takve terapije na preživljenje (32).

Kirurški zahvati u liječenju raka dojke kreću se od mastektomije (uklanjanja dojke) do pošteđenih operacija poput segmentektomije ili kvadrantektomije, čime se uklanja samo dio zahvaćene dojke. Nakon pošteđenih operacija potrebno je provesti radioterapiju za koju se pokazalo da smanjuje učestalost lokalnih recidiva. Nakon kirurškog zahvata određuje se stadij bolesti te se u određenih pacijentica provodi adjuvantna radioterapija, kemoterapija, imunoterapija ili hormonska terapija. Adjuvantna radioterapija se uvijek ordinira nakon pošteđenih zahvata, a u nekim slučajevima i nakon mastektomije, ako je riječ o velikim

tumorima te ta vrsta terapije značajno smanjuje učestalost recidiva. Adjuvantna kemoterapija primjenjuje se u pacijentica sa srednjim i visokim rizikom za pojavu recidiva, a primjenjuje se prije adjuvantne hormonske i radioterapije. Najčešće se primjenjuju kombinacija ciklofosfamida i doksorubicina praćeni aplikacijom paklitaksela. Adjuvantna imunoterapija primjenjuje se kod pacijentica s HER2 pozitivnim karcinomima većim od 0,5 cm. Koristi se trastuzumab, a značajno utječe na preživljenje. Adjuvantna hormonska terapija provodi se u pacijentica s pozitivnim nalazom hormonskih receptora. Provodi se nakon adjuvantne kemoterapije i radioterapije jer ako se provodi istodobno može smanjiti njihovu učinkovitost. Zlatni standard adjuvantne hormonske terapije je tamoksifen, selektivni estrogenski receptor modulator, a koristi se kod premenopauzalnih pacijentica. U postmenopauzalnih žena koriste se inhibitori aromataze kao što su anastrozol i letrozol (33).

Liječenje raka dojke također ovisi i o stadiju bolesti. Kada je riječ o lokaliziranom stadiju bolesti najčešće se koristi kirurški zahvat kojem je cilj uklanjanje primarnog tumora i mogućih metastaza. Karcinomi stadija I i II liječe se poštednim kirurškim zahvatom i radioterapijom. Kod stadija III potrebno je kemoterapijom pokušati smanjiti veličinu tumora kako bi kirurški zahvat mogao biti što poštedniji, dok upalni oblici raka dojke zahtijevaju liječenje kemoterapijom koju slijedi mastektomija, kao i disekcija aksilarnih limfnih čvorova te radioterapija. Kada je riječ o stadiju IV odluka se donosi na temelju ravnoteže između štetnog djelovanja liječenja i potrebe za produženjem života te poboljšanjem njegove kvalitete (34).

U žena s tumorima manjim od jednog centimetra petogodišnje preživljenje iznosi više od 99%. Kod tumora veličine između tri i pet centimetara preživljenje se smanjuje na 86%. Za tumore veće od pet centimetara u promjeru s pozitivnim limfnim čvorovima petogodišnje preživljenje iznosi samo 45,5%. Osim veličine tumora, dokazano je da je najvažniji prognostički čimbenik zahvaćenost limfnih čvorova (35).

1.5. Maslina

Maslina (lat. *Olea europaea L.*) stara je biljna vrsta. Široko je rasprostranjena i uzgajana na mediteranskom području, gdje se ujedno nalaze i najstariji primjerci. Ljudi su od najranijih dana prepoznali određene ljekovite i blagotvorne učinke masline. Još je Hipokrat koristio ulje masline kako bi liječio razne bolesti. Na području Republike Hrvatske uzgaja se na primorskom području i smatra se kako su je tu donijeli stari Grci (36).

Leccino sorta masline (Slika 4.) jedna je od najstarijih talijanskih sorti, uzgajana još u srednjem vijeku. Jedna je od najkorištenijih sorti za izradu maslinovog ulja, ali se zbog svog blagog okusa često miješa s drugim sortama. Može biti tamnosmeđe, intenzivno ljubičaste te crnozelene boje. Sorta *Frantoio* (Slika 5.) veoma je rasprostranjena po središnjoj Italiji, posebice regiji Toskani. Boja joj može varirati od žutozelene do tamnocrvene. Koristi se za izradu kvalitetnog maslinovog ulja bogate arome, a često se miješa s drugim sortama, uključujući sortu *Leccino* (37).



Slika 4. *Leccino* sorta masline (38).

Preuzeto s: <https://www.waimeanurseries.co.nz/our-products/fruit-trees/olives/leccino/>

Datum pristupa: 24. 8. 2022.



Slika 5. *Frantoio* sorta masline (39).

Preuzeto s: <https://en.excelentesprecios.com/frantoio-olive-tree>

Datum pristupa: 24. 8. 2022.

1.5.1. Fenolni spojevi masline

Mnogi fenolni spojevi čine dio bioaktivnih komponenti lista masline. To su sekundarni biljni metaboliti koji sprječavaju razvoj bolesti i stvaranje slobodnih radikala kod biljaka. Najpoznatiji spojevi su tirozol, hidroksitirozol, oleacein i oleuropein. Fenolni spojevi masline, između ostalog, imaju zaštitnu ulogu u raznim bolestima, poput ateroskleroze, tumora ili Alzheimerove bolesti (40).

Pup masline također sadrži brojne fenolne spojeve različitih skupina. Najvažnije skupine uključuju jednostavne fenole, sekoiridoide, flavonoide, lignane te derivate cinaminske kiseline. Kemijski sastav pupa masline pokazuje određene sličnosti sa sastavom cvijeta masline, uz određene razlike. Flavonoidi su zastupljeniji u pupu, a sekoiridoidi u cvijetu, dok su jednostavni fenoli i cinaminska kiselina sa svojim derivatima podjednako zastupljeni u oba navedena dijela masline (41).

Ovi spojevi sudjeluju u raznim staničnim i biokemijskim procesima. Njihova antioksidativna aktivnost postala je predmetom proučavanja u svrhu potencijalnih korisnih učinaka za ljudsko zdravlje. Ostala svojstva, poput protuupalnog i protutumorskog djelovanja,

također su značajna (42). List masline sadrži veću koncentraciju fenola nego proizvodi masline poput maslinovog ulja, koje je još uvijek daleko najpoznatiji proizvod dobiven od masline. Fenolni spojevi masline koriste se u medicini, kozmetičkoj te farmaceutskoj industriji te se smatra da bi njihova svojstva mogla biti važna u smanjenju rizika i težine nekih kroničnih bolesti (43).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje ekstrakata pupa masline iz sorti *Leccino* i *Frantoio* na dvije stanične linije humanih karcinoma dojke.

2.2. Hipoteza istraživanja

Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnoj aktivnosti ispitivana je na stanicama karcinoma dojke s estrogenskim, progesteronskim i glukokortikoidnim receptorima (MCF-7) i trostruko negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231).

1. Ekstrakt pupa masline E3 (sorta *Leccino*) smanjit će broj stanica karcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-231
2. Ekstrakt pupa masline E4 (sorta *Frantoio*) smanjit će broj stanica karcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-231

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanične linije

In vitro ispitivanje citotoksičnog djelovanja provodilo se na stanicama humanih karcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-231. Obilježja ovih staničnih linija prikazana su u tablicama 4. i 5.

Tablica 4. Obilježja stanične linije karcinoma dojke MCF-7.

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/crl-3435>

Datum pristupa: 23. 8. 2022.

Kategorija proizvoda	Ljudske stanice
Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tip stanica	Epitelne
Morfologija	Epitelna
Tkivo	Dojka; Mliječna žlijezda
Bolest	Karcinom; duktalni
Primjena	Istraživanje karcinoma 3D kultura stanica
Spol	Ženski
Dob	69 godina
Obilježja kulture	Adherentna
Format proizvoda	Smrznuto
Uvjeti pohrane	Parna faza tekućeg dušika

Tablica 5. Obilježja stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231.

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-26>

Datum pristupa: 23. 8. 2022.

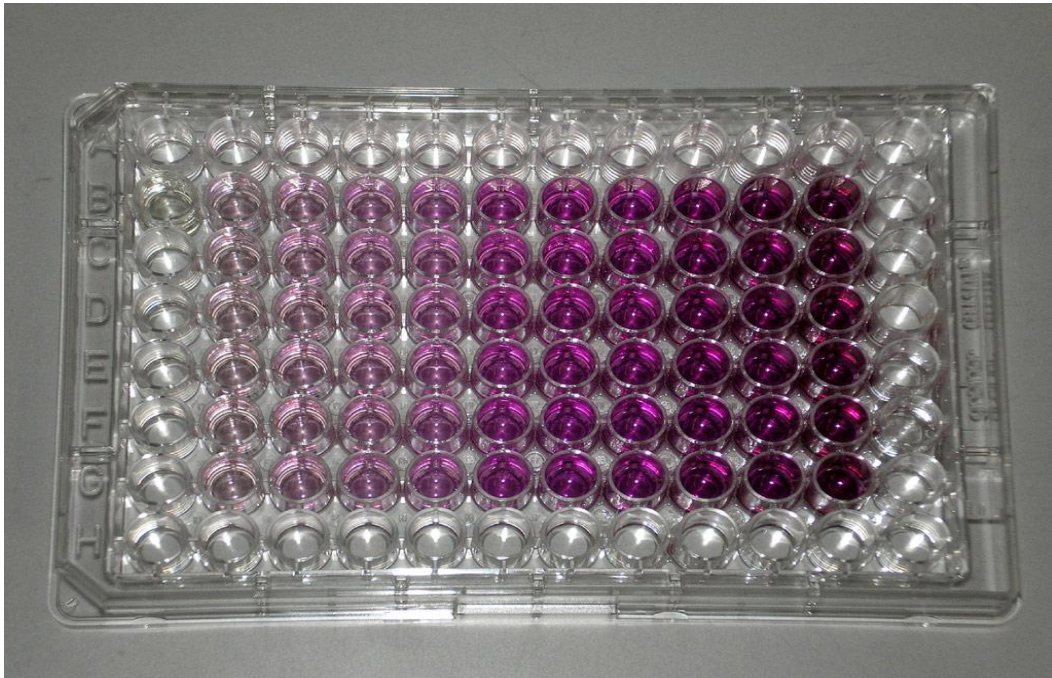
Kategorija proizvoda	Ljudske stanice
Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tip stanica	Epitelne
Morfologija	Epitelna
Tkivo	Dojka; Mliječna žlijezda
Bolest	Adenokarcinom
Primjena	Stanična linija prikladan je domaćin za transfekciju
Spol	Ženski
Dob	51 godina
Obilježja kulture	Adherentna
Format proizvoda	Smrznuto
Uvjeti pohrane	Parna faza tekućeg dušika

3.2. Postupak

Kako bi se utvrdila potencijalna citotoksična aktivnost ulja i ekstrakata masline proveden je test vijabilnosti stanica. Test je proveden na dvije stanične linije humanih karcinoma: adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i metastatskog adenokarcinoma dojke MCF-7. Ove dvije stanične linije inkubirane su preko noći u pločicama s 96 jažica na gustoći od 9000 stanica po jažici. Nakon toga slijedila je inkubacija s ekstraktima u koncentracijama od 1 do 200 $\mu\text{g/mL}$ tijekom 72 sata u tri replikata. Nakon toga stanice su inkubirane s 0,5 g MTT/L na 37°C tijekom dva sata. Nakon uklanjanja medija dodan je dimetil sulfoksid (DMSO) još deset minuta na 37°C. Formazan, indikator metabolički aktivnih stanica, mjerio se na 570 nm na čitaču mikropločica (BioSan, Riga, Latvija). Za izračun IC_{50} vrijednosti (50% maksimalne inhibitorne koncentracije) korišten je program Microsoft Excel 2016. Kako bi se utvrdile razlike između testiranih koncentracija, analiza varijance (ANOVA) izvedena je korištenjem verzije 3.14 Past 3.X programa (Sveučilište u Oslu, Norveška) sa statističkom značajnošću $p < 0,05$.

3.3. Test citotoksičnosti

Test citotoksične aktivnosti koristi se za određivanje vitalnosti stanica. Vitalnost stanica određena je mjerenjem staničnog metabolizma korištenjem MTT metode. Žuti 3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid se uz prisustvo NAD(P)H-ovisnih staničnih oksidoreduktaza reducira u netopivi formazan koji karakterizira ljubičasta boja (Slika 6.). Kako mrtve stanice ne vežu MTT, ovim testom može se odrediti postotak metabolički aktivnih stanica, dakle MTT test je, između ostalog, pogodan i za procjenu djelotvornosti raznih spojeva s mogućim antitumorskim djelovanjem. Ljubičasti formazan koji nastaje redukcijom tetrazolina može se izmjeriti u spektrofotometru. S obzirom na netopljivost formazana, potrebno je dodati otapalo DMSO (dimetil sulfoksid) kako bismo mogli očitati apsorbanciju novonastalog ljubičastog formazana. Apsorbancija se mjeri na određenoj valnoj duljini, obično između 500 i 600 nm.



Slika 6. Mikrotitarska pločica nakon MTT testa. Povećan broj stanica rezultira većom količinom ljubičaste boje (44).

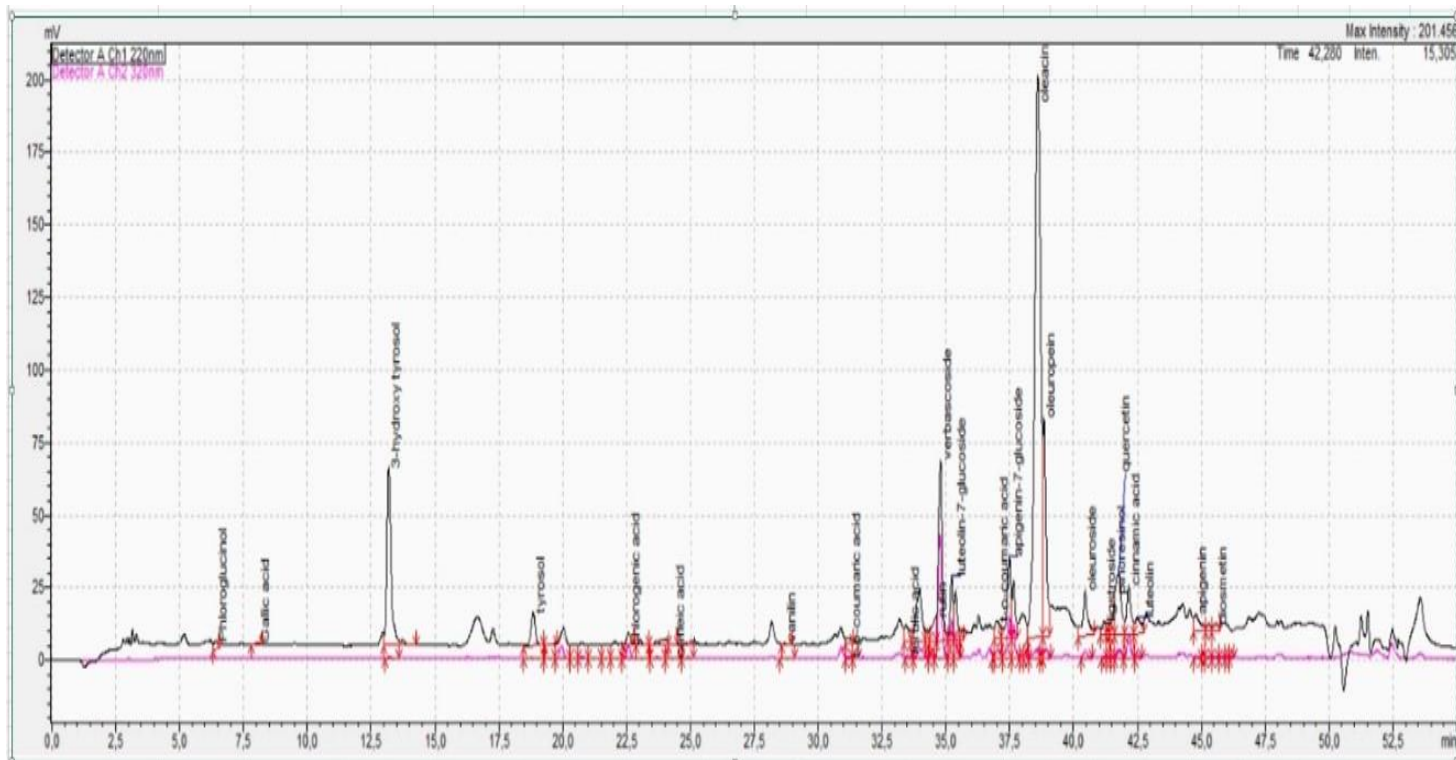
Preuzeto s: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay#/media/File:MTT_Plate.jpg

Datum pristupa: 25. 8. 2022.

3.4. Kemijski spojevi

Navedeni fenolni standardi kupljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SAD): 3-hidroksitirozol, klorogenska kiselina, vanilin, kafeinska kiselina, t-p-kumarinska kiselina, t-o-kumarinska kiselina, oleuropein, apigenin, apigenin-7-glukozid, pinorezinol, luteolin, kvercetin, diosmetin tirozol, rutin trihidrat, luteolin-7-glukozid, oleacin i ligstrozid. Od kompanije Acros Organics (Geel, Belgija) kupljena je galna kiselina, verbaskozid od HWI grupe (Rülzheim, Njemačka), ferulična kiselina od Fluka Chemie (Buchs, Švicarska) te oleurozid od kompanije Phytolab (Vestenbergsgreuth, Njemačka). Acetonitril i metanol kupljeni su od VWR (Radnor, Pennsylvania, SAD), a fosfatna kiselina od Fluka Chemie (Buchs, Švicarska).

Na Slici 8. prikazan je kromatogram fenolnih spojeva u pupovima masline. Najzastupljeniji spojevi su oleuropein, 3-hidroksitirozol i oleacin. Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) analizirani su fenolni spojevi pupa masline koristeći instrument Nexera LC-40 (Shimadzu, Kyoto, Japan) tijekom 55 minuta na 40°C uz protok od 1 mL/min na valnim duljinama od 220 i 230 nm. Faza A: 0,2 % fosfatna kiselina u ultračistoj vodi. Faza B: metanol/acetonitril (omjer 1:1). Korištena kolona je Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm, veličina čestica 5 µm) proizvođača Phenomenex (Kalifornija, SAD).



Slika 8. HPLC kromatogram fenolnih spojeva prisutnih u pupovima masline. Najzastupljeniji spojevi su oleuropein, 3-hidroksitirozol i oleacin.

3.5. Ekstrakcija biljnog materijala

Uzorci pupova masline uzeti su iz maslinika u Kaštel Starom od dvije sorte masline, *Leccino* (E3) i *Frantoio* (E4). Materijal je osušen smrzavanjem u uređaju FreeZone 2.5 (Labconco, Kansas City, MO, SAD) prikazanim na Slici 7. Suhi pupovi samljeveni su u prah pomoću mlina od nehrđajućeg čelika A11 Analytical mill (IKA, Staufen, Germany). Za ekstrakciju fenola korištena je metoda koju su opisali Marinova i suradnici (45). Postupak: 0.25 g pupova u prahu ekstrahirano je s 10 mL metanola i vode (omjer 80:20) tijekom 20 minuta pomoću ultrazvučne kupelji Sonorex Digitec DT 100H (Bandelin, Berlin, Germany). Alikvot se centrifugirao pet minuta na 14,000 okretaja u minuti pomoću centrifuge Beckman Instruments J2-21 (Palo Alto, CA, SAD).



Slika 7. FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System uređaj (46).

Preuzeto s: <https://www.labconco.com/product/freezone-25-liter-benchtop-freeze-dry-system/271>

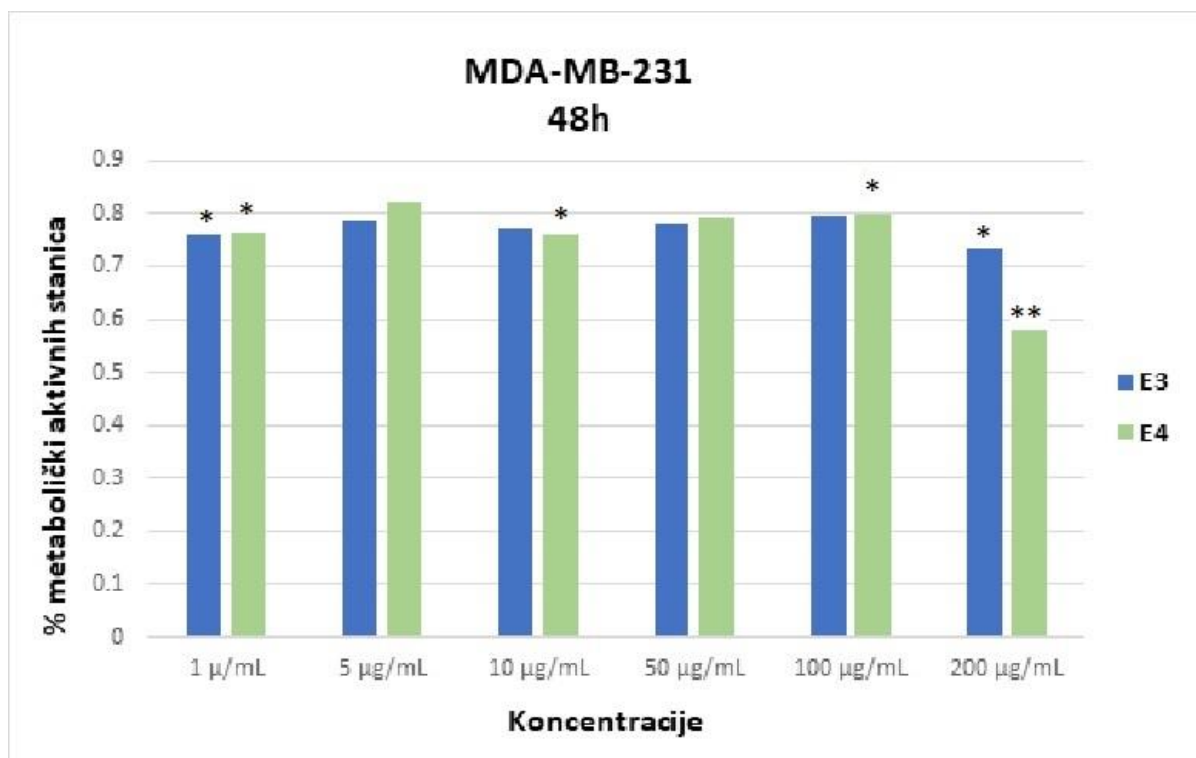
Datum pristupa: 25. 8. 2022.

4. REZULTATI

Korištenjem testa citotoksičnosti pomoću MTT metode istraživali smo potencijalni citotoksični utjecaj ekstrakata masline sorte *Leccino* (E3) i sorte *Frantoio* (E4) na dvije stanične linije humanih karcinoma dojke. Citotoksična aktivnost istraživana je nakon inkubacije od 4, 24, 48 i 72 sata u različitim koncentracijama.

4.1. Karcinom dojke – stanična linija MDA-MB-231

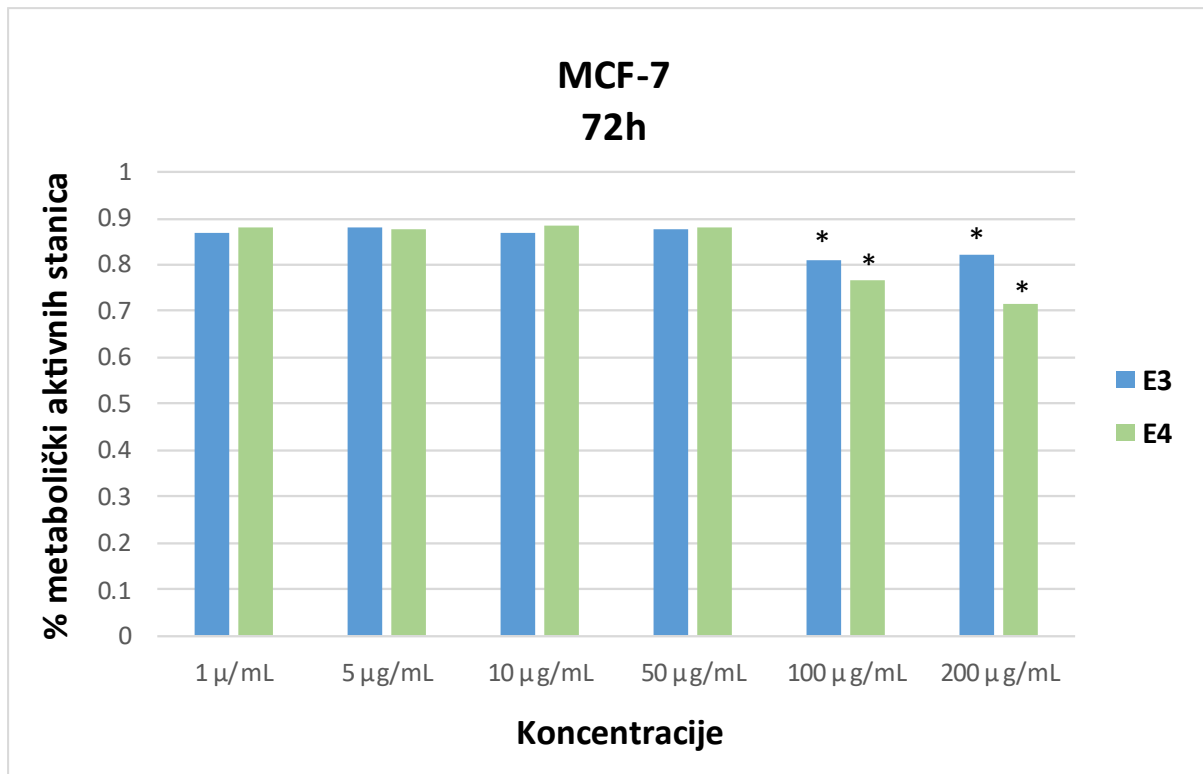
Na Slici 9. prikazano je djelovanje ekstrakata pupa masline sorte *Leccino* (E3) i sorte *Frantoio* (E4) na staničnu liniju MDA-MB-231. Ekstrakti pokazuju određeno citotoksično djelovanje na ovu staničnu liniju nakon inkubacije od 48 sati. Utjecaj je sličan za različite koncentracije, a najznačajniji je za obje sorte u koncentraciji od 200 µg/mL gdje se broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 73 % za sortu E3, odnosno na 58 % za sortu E4, što je i najznačajniji rezultat istraživanja za ove dvije sorte, s p vrijednosti manjom od 0,001. Analizom rezultata nakon 4, 24 i 72 sata nije pokazan značajniji utjecaj.



Slika 9. Citotoksičnost ekstrakata pupa masline sorte *Leccino* (E3) i sorte *Frantoio* (E4) na staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon 48 sati (* < 0,01, ** p < 0,001)

4.2. Karcinom dojke – stanična linija MCF-7

Na Slici 10. prikazano je djelovanje ekstrakata masline na staničnu liniju MCF-7. Ekstrakti pokazuju određeno citotoksično djelovanje na ovu staničnu liniju nakon inkubacije od 72 sata. Utjecaj je sličan za različite koncentracije, a najznačajniji je za sortu E3 u koncentraciji od 100 µg/mL gdje se broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 80 %, a za sortu E4 u koncentraciji od 200 µg/mL gdje se broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 71 %. Analizom rezultata nakon 4, 24 i 48 sati nije pokazan značajniji utjecaj.



Slika 10. Citotoksičnost ekstrakata pupa masline sorte *Leccino* (E3) i sorte *Frantoio* (E4) na staničnu liniju karcinoma dojke MCF-7 nakon 72 sata (* $p < 0,01$)

5. RASPRAVA

Rak je jedna od najozbiljnijih bolesti prošlog stoljeća te njegova incidencija stalno raste. Vjeruje se da svaka četvrta osoba ima rizik za nastanak raka tijekom života. Diljem svijeta se na godišnjoj razini otkrije preko 14 milijuna novih slučajeva raka. Ključ uspješnog izlječenja raka je njegovo rano otkrivanje. Postoji nekoliko načina da se spriječi rast stanica raka, a to su uklanjanje maligne mase kirurškim putem, uporaba određenog liječenja poput kemoterapije ili hormonske terapije, uporaba radioterapije te u nekim slučajevima smanjivanje i povlačenje raka spontano, bez uporabe terapije (47).

Incidencija raka, a time i pritisak na zdravstvene sustave diljem svijeta zbog raka povećava se. Najvažniji razlozi za to su rast i starenje svjetske populacije te učestalost životnih navika koje su povezane s nastankom raka, najčešće pušenja. Većina slučajeva i smrti od raka događa se u zemljama u razvoju. Najčešći tip raka u žena je rak dojke te je vodeći uzrok smrti od raka, a čini 23 % svih slučajeva raka kod žena te 14 % svih smrti. Smatra se da uzrokuje skoro milijun i 400 tisuća novih slučajeva širom svijeta i gotovo 460 tisuća povezanih smrtnih slučajeva. U muškaraca, najčešće sjelo raka su pluća te kod njih rak pluća čini 17 % svih novih slučajeva i 23 % svih smrti. Preživljenje raka je lošije u zemljama u razvoju, najvjerojatnije zbog kasnijeg otkrivanja te lošije dostupnosti kako novijih tako i standardnih terapijskih postupaka. Veliki postotak slučajeva raka mogao bi se spriječiti. Najvažniji postupci sprječavanja nastanka novih slučajeva raka su korištenje postojećih saznanja o kontroli nastanka raka te uporaba raznih programa kao što su kontrola pušenja, provođenje cijepljenja, programi probira, rano otkrivanje i liječenje. Liječnici te ostali zdravstveni djelatnici u suradnji s osobama odgovornim za stvaranje programa na razini države trebali bi sudjelovati i u promoviranju zdravih životnih navika kao što su zdrava prehrana i tjelesna aktivnost (48).

Incidencija i smrtnost od raka dojke u porastu su zadnjih desetljeća. Sve to usmjerava pozornost na važnost probira, primjerene odgovarajuće terapije te smanjivanja individualnog rizika. Prednosti ranog otkrivanja raka dojke prate i neke neželjene pojave, kao što su prevelik broj profilaktičkih mastektomija. Napredak u dijagnostici i liječenju omogućili su nove podjele raka dojke, čak i na molekularnoj razini. Mnogi podatci vezani uz rak dojke, a posebno epidemiološki podatci zahtijevaju česte izmjene i dopune (49).

Maslina (lat. *Olea europaea L.*) jedna je od najvažnijih biljaka mediteranskog područja. Različiti dijelovi stabla masline odavna se koriste kako u prehrani, tako i u terapiji brojnih stanja. Najpoznatiji proizvod masline je maslinovo ulje, ali koriste se i listovi, plodovi, sjemenke te kora masline (50).

Bogatstvo masline mononezasićenim masnim kiselinama, poglavito oleinskom kiselinom, vlaknima te vitaminima od kojih je najvažniji vitamin E, važna je karakteristika za nutritivne dobrobiti masline. Također, maslina sadrži i različite fitokemikalije, od kojih je najvažniji hidroksitirozol, fenolni spoj prisutan u svim tipovima maslina. Pretpostavlja se da je blagotvorni učinak proizvoda masline povezan najviše s učincima mononezasićenih masnih kiselina na kardiovaskularni sustav, antioksidativnim djelovanjem vitamina E te protuupalnim i antioksidativnim djelovanjem hidroksitirozola (51).

Najpoznatiji proizvod masline, maslinovo ulje, jedna je od glavnih namirnica na kojoj počiva mediteranska prehrana. Maslinovo ulje pokazalo je mnogo koristi za ljudsko zdravlje. Mononezasićene masne kiseline imaju povoljan utjecaj na biološke membrane, a antioksidansi koje nalazimo u maslinovom ulju štite od slobodnih radikala. Maslinovo ulje također snižava razinu LDL-kolesterola, a povećava razinu HDL-kolesterola, čime smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti. Također, određena istraživanja pokazala su da maslinovo ulje pomaže u raznih autoimunim i upalnim bolestima, smanjuje rizik od kolelitijaze, smanjuje želučanu sekreciju, kao i egzokrinu sekreciju gušterače te pomaže u cijeljenju želučanih ulkusa (52). Maslinovo ulje također sadrži i najmanje trideset fenolnih spojeva. Najvažniji od tih spojeva su hidroksitirozol, tirozol i oleuropein. Kroz brojna istraživanja otkriveno je da ovi spojevi imaju snažna antioksidativna svojstva te da imaju važnu ulogu u obrani od slobodnih radikala. Smatra se da hidroksitirozol i oleuropein imaju i antimikrobna svojstva (53).

Današnje studije proučavaju različite dijelove masline, a značajan porast može se uočiti kod studija koje proučavaju pup, list i ulje masline. S druge strane, broj studija koje se bave proučavanjem cvijeta masline još uvijek je prilično ograničen. Analize kemijskog sastava cvijeta masline omogućile su pronalazak šezdeset i tri sekundarna spoja koji pripadaju skupinama flavonoida, feniletanoida, triterpenoida i sekoiridoida. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdili potencijalni terapijski učinci navedenih spojeva (54). Istraživanja pokazuju da fenolni spojevi cijele masline imaju značajno protuupalno, antimikrobno i protutumorsko djelovanje (55).

Unatoč napretku medicine, i danas kemoterapija izaziva brojne neželjene učinke s obzirom na to da su kemoterapeutici nerijetko jako toksični kako prema tumorskim, tako i prema zdravim stanicama, što dovodi do stalne potrage za povoljnijim spojevima koji će djelovati što selektivnije. Istraživanja na stanicama tumora prostate, gušterače i dojke pokazala su da fenolni spojevi masline, poput tirozola, hidroksitirozola i oleuropeina, izazivaju apoptozu tumorskih stanica, a da pritom ne utječu na zdrave stanice (56).

In vitro studije pokazale su učinkovitost fenolnih spojeva masline kao protutumorskih agensa. Najveći zaštitni učinak ovi spojevi pokazali su u kombinaciji s ostalim protutumorskim lijekovima. Rezultati ovakvih istraživanja ukazuju na moguću potrebu oprezne konzumacije maslinovog ulja tijekom terapije tumora. Potrebna su daljnja istraživanja o mehanizmima protektivnosti fenola i mogućoj uporabi specifičnih fenolnih spojeva u terapiji ili smanjenju nuspojava konvencionalne kemoterapije (57).

Uz protutumorsko djelovanje, fenolni spojevi masline pokazali su i brojne druge koristi u liječenju ili sprječavanju kroničnih bolesti poput kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te osteoporoze. Brojna svojstva kao što su antioksidativno, antiproliferativno, protuupalno i proapoptotsko imaju ulogu u sprječavanju nastanka tumora, bolesti srca i mozga. Također, fenoli su pokazali neuroprotektivno i neuromodulatorno djelovanje, a potiču i regeneraciju kostiju (58).

Predmet našeg istraživanja bio je ispitivanje citotoksičnog utjecaja ekstrakata pupa masline sorti *Leccino* (E3) i *Frantoio* (E4) na dvije stanične linije karcinoma dojke. Ispitivanje je izvršeno na staničnim linijama MDA-MB-231 i MCF-7. Učinak ekstrakata na stanice promatran je nakon inkubacije od 4, 24, 48 i 72 sata.

Ekstrakti pupa masline pokazuju određeno citotoksično djelovanje na staničnu liniju trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon inkubacije od 48 sati. Utjecaj je sličan za različite koncentracije, osim koncentracije od 200 µg/mL za sortu E4 gdje se broj metabolički aktivnih stanica smanjio na 58 %.

Ekstrakti pupa masline pokazuju određeno citotoksično djelovanje na staničnu liniju metastatskog adenokarcinoma dojke MCF-7 nakon inkubacije od 72 sata, a utjecaj je nešto veći pri višim koncentracijama od 100 i 200 µg/mL.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da maslina i njeni proizvodi imaju određeni potencijal u liječenju nekih bolesti, posebno s obzirom na to da su protutumorska, protuupalna i antimikrobna svojstva fenolnih spojeva masline već dokazana. Spojevi korišteni u našem istraživanju nisu uspjeli dosegnuti IC_{50} vrijednost. No, podatci dobiveni ovom studijom, kao i studijama drugih sorti masline, vrijedni su daljnjeg istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

- 1) Ekstrakti masline sorti *Leccino* (E3) i *Frantoio* (E4) pokazali su određeni citotoksični utjecaj na stanične linije humanih karcinoma dojke MDA-MB-231 i MCF-7.

- 2) Najveći citotoksični utjecaj na staničnu liniju MDA-MB-231 prikazan je nakon 48 sati izlaganja, a na staničnu liniju MCF-7 nakon 72 sata.

- 3) Najznačajniji učinak postigao je ekstrakt E4 pri koncentraciji od 200 µg/mL djelujući na staničnu liniju MDA-MB-231 nakon izlaganja od 48 sati, smanjujući postotak metabolički aktivnih stanica na 58 %.

- 4) Ekstraktima sorti korištenih u našem istraživanju nije dosegnuta IC₅₀ vrijednost.

7. LITERATURA

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. 5. prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 149.
2. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica: molekularni pristup. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 725-30.
3. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Jukić S, Nola M, Damjanov I, Gatalica Z, Seiwerth S, urednici. Patologija. 5. prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 150.
4. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Jukić S, Nola M, Damjanov I, Gatalica Z, Seiwerth S, urednici. Patologija. 5. prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 157.
5. What are the common categories of cancer? [Internet]. Cancer Treatment Centers of America. 2019. Dostupno na: <https://www.cancercenter.com/carcinoma/> Datum pristupa: 12. 8. 2022.
6. Figure 1. Tumor progression. Schematic representation of tumor... [Internet]. ResearchGate. Dostupno na: https://www.researchgate.net/figure/Tumor-progression-Schematic-representation-of-tumor-development-with-highlighted-stromal_fig1_322089781/ Datum pristupa: 12. 8. 2022.
7. European Cancer Information System [Internet]. ecis.jrc.ec.europa.eu. Dostupno na: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/> Datum pristupa: 13. 8. 2022.
8. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. J Epidemiol Glob Health. 2019;9(4):217-22.
9. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Epidemiologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 19-22.
10. Primarna prevencija | My CMS [Internet]. Dostupno na: <https://www.nppr.hr/primarna-prevencija/> Datum pristupa: 13. 8. 2022.
11. Sealock T, Sharma S. Smoking Cessation. 2022 Jan 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29494049.

12. Moleyar-Narayana P, Ranganathan S. Cancer Screening. 2021 Oct 9. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 33085285.
13. Cohort profile: the Martinique Cancer Registry and the quality of life prostate cancer cohort (QoL Prostate-MQ): challenges and prospects for reducing disparities in the Caribbean - Scientific Figure on ResearchGate. Dostupno na: https://www.researchgate.net/figure/Number-of-cancer-cases-per-year-over-the-period-1981-2014-as-per-2017-data-from-the_fig2_326630571/ Datum pristupa: 13. 8. 2022.
14. Todd R, Wong DT. Oncogenes. *Anticancer Res.* 1999;19(6a):4729-46.
15. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. *Biologija raka. U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 4-7.*
16. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. *Biologija raka. U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 8-10.*
17. Joyce C, Rayi A, Kasi A. Tumor-Suppressor Genes. 2021 Sep 6. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30335276.
18. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell.* 2004;116(2):235-46.
19. Lakna. Difference Between Tumor Suppressor Genes and Proto Oncogenes [Internet]. Pediaa.com. 2018. Dostupno na: <https://pediaa.com/difference-between-tumor-suppressor-genes-and-proto-oncogenes/> Datum pristupa: 18. 8. 2022.
20. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast cancer epidemiology, prevention, and screening. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;151:1-32.
21. Rojas K, Stuckey A. Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol.* 2016;59(4):651-72.
22. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: epidemiology and etiology. *Cell Biochem Biophys.* 2015;72(2):333-8.
23. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. *Rak dojke. U: Raić A.,ur. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 203-13.*

24. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol.* 2010;4(3):192-208.
25. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. *Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 207.
26. Roulot A, Héquet D, Guinebretière JM, Vincent-Salomon A, Lerebours F, Dubot C, Rouzier R. Tumoral heterogeneity of breast cancer. *Ann Biol Clin (Paris).* 2016 Dec 1;74(6):653-60.
27. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, McPhail S, Rubin GP, Lyratzopoulos G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2017;48:140-46.
28. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. *Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 206-7.
29. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti dojke. U: Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, urednici. *Patologija. 5. prerađeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 639-58.
30. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI i sur. Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(17):3628-36.
31. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. *Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 203-13.
32. Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of breast cancer therapy. *PET Clin.* 2018;13(3):339-54.
33. Vrdoljak E., Belac Lovasić I., Kusić Z., Gugić D., Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. *Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 208-12.
34. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician.* 2010;81(11):1339-46.

35. Cao SS, Lu CT. Recent perspectives of breast cancer prognosis and predictive factors. *Oncol Lett.* 2016;12(5):3674-8.
36. Guerrero Maldonado, N., López, M. J., Caudullo, G., de Rigo, D. (2016) *Olea europaea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: *European Atlas of Forest Tree Species*, San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A., ur., Luxembourg, str. 111.
37. Leccino [Internet]. Carapelli. Dostupno na: <https://carapelli.com/en/productos/leccino-olives/#:~:text=Leccino%20is%20an%20olive%20variety/> Datum pristupa: 24. 8. 2022.
38. OLIVE Leccino [Internet]. Waimea Nurseries. [citirano 24. kolovoza 2022]. Dostupno na: <https://www.waimeanurseries.co.nz/our-products/fruit-trees/olives/leccino/> Datum pristupa: 24. 8. 2022.
39. Frantoio Olive tree: Characteristics of olive oil, tree, olives.. [Internet]. [citirano 24. kolovoza 2022]. Dostupno na: <https://en.excelentesprecios.com/frantoio-olive-tree/> Datum pristupa: 24. 8. 2022.
40. Vogel P, Kasper Machado I, Garavaglia J, Zani VT, de Souza D, Morelo Dal Bosco S. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutr Hosp.* 2014;31(3):1427-33.
41. Taamalli A, Abaza L, Arráez Román D, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A, Zarrouk M i sur. Characterisation of phenolic compounds by HPLC-TOF/IT/MS in buds and open flowers of 'Chemlali' olive cultivar. *Phytochem Anal.* 2013;24(5):504-12.
42. Silva S, Gomes L, Leitão F, Coelho AV, Boas LV. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International.* 2006;12(5):385-95.
43. Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M. Olive Tree (*Olea europaea* L.) leaves: importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants (Basel).* 2015;4(4):682-98.
44. MTT assay [Internet]. Wikipedia. 2022 [citirano 25. kolovoza 2022]. Dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay#/media/File:MTT_Plate.jpg/ Datum pristupa: 25. 8. 2022.

45. Marinova, D.; Ribarova, F.; Atanassova, M. Total phenolics and flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *J. Univer. Chem. Technol. Metall.* 2005, 40, 255–60.
46. Labconco. FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System [Internet]. Labconco. [citirano 25. kolovoza 2022]. Dostupno na: <https://www.labconco.com/product/freezone-25-liter-benchtop-freeze-dry-system/271/> Datum pristupa: 25. 8. 2022.
47. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer.* 2016;53(3):441-2.
48. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
49. Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. *Radiologia.* 2017;59(5):368-79.
50. Langgut D, Cheddadi R, Carrión JS, Cavanagh M, Colombaroli D, Eastwood WJ, et al. The origin and spread of olive cultivation in the Mediterranean Basin: The fossil pollen evidence. *The Holocene.* 2019;29(5):902-22.
51. Rocha J, Borges N, Pinho O. Table olives and health: a review. *J Nutr Sci.* 2020;9:e57.
52. Alarcón de la Lastra C, Barranco MD, Motilva V, Herrerías JM. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr Pharm Des.* 2001;7(10):933-50.
53. Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem.* 2002;13(11):636-44.
54. Angelis A, Mavros P, Nikolaou PE, Mitakou S, Halabalaki M, Skaltsounis L. Phytochemical analysis of olive flowers' hydroalcoholic extract and in vitro evaluation of tyrosinase, elastase and collagenase inhibition activity. *Fitoterapia.* 2020;143:104602.
55. Talhaoui N, Taamalli A, Gómez-Caravaca AM, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Phenolic compounds in olive leaves: analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International.* 2015;77:92-108.
56. Goldsmith CD, Bond DR, Jankowski H, Weidenhofer J, Stathopoulos CE, Roach PD i sur. The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).

57. Torić J, Brozovic A, Baus Lončar M, Jakobušić Brala C, Karković Marković A, Benčić Đ i sur. Biological activity of phenolic compounds in extra virgin olive oils through their phenolic profile and their combination with anticancer drugs observed in human cervical carcinoma and colon adenocarcinoma cells. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(5).

58. Garcia-Martinez O, Ruiz C, Gutierrez-Ibanez A, Illescas-Montes R, Melguizo-Rodriguez L. Benefits of olive oil phenolic compounds in disease prevention. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(4):333-40.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj je istraživanja bio ispitati potencijalno citotoksično djelovanje fenolnih spojeva izoliranih iz pupa masline sorti *Leccino* i *Frantoio* na dvije stanične linije humanih karcinoma dojke: MDA-MB-231 i MCF-7. Broj karcinomskih stanica nakon izlaganja uzorcima pretpostavljeno se trebao smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

Materijali i metode: Ispitivanje citotoksičnosti fenolnih spojeva na dvjema staničnim linijama karcinoma dojke rađeno je MTT testom nakon 4, 24, 48 i 72 sata inkubacije. Usporedbom apsorbancije nastalog formazana kod stanica tretiranih spojevima dobivenih iz uzoraka masline te apsorbancije kontrolne skupine, odnosno netretiranih stanica, dobiven je postotak preživljenja karcinomskih stanica.

Rezultati: Rezultati izlaganja stanica karcinoma dojke (stanične linije MDA-MB-231 i MCF-7) ekstraktima masline E3 (sorta *Leccino*) i E4 (sorta *Frantoio*) prikazani su grafički u odnosu postotka metabolički aktivnih stanica i koncentracije spoja. Najznačajniji učinak na staničnu liniju MDA-MB-231 postignut je nakon inkubacije od 48 sati pri koncentraciji od 200 µg/mL za obje sorte, a na staničnu liniju MCF-7 nakon inkubacije od 72 sata pri koncentraciji od 100 µg/mL za sortu E3 i koncentraciji od 200 µg/mL za sortu E4.

Zaključak: Ekstrakti pupa masline pokazuju određen citotoksični utjecaj na stanične linije humanih karcinoma dojke MDA-MB-231 i MCF-7, koji ovisi o vremenu izlaganja i koncentraciji, te u određenoj mjeri smanjuju preživljenje stanica karcinoma. Učinak ekstrakata nije uvijek razmjernan povećanju koncentracije. Ekstraktima sorti maslina korištenih u našem istraživanju nije dostignuta IC₅₀ vrijednost.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Cytotoxic effect of olive bud extracts on breast carcinoma cell lines

Objective: The aim of the research was to examine the potential cytotoxic effects of phenolic compounds isolated from *Leccino* and *Frantoio* olive buds on two cell lines of human breast cancer: MDA-MB-231 and MCF-7. The number of carcinoma cells was assumed to be reduced after exposure to phenolic compounds in comparison with the control group.

Materials and methods: Cytotoxic effects of phenolic compounds on breast cancer cell lines were determined with MTT assay, after the periods of 4, 24, 48 and 72 hours of incubation. The comparison between the absorbance of created formazan in cells treated with samples obtained from the olive buds and the absorbance of the control group (cells untreated with olive bud samples) established the survival rates of carcinoma cells.

Results: The results of breast cancer cells (cell lines MDA-MB-231 and MCF-7) exposure to olive extracts E3 (*Leccino* sort) and E4 (*Frantoio* sort) are shown graphically as relation of the percentage of metabolically active cells to the concentration of the compound. The most significant effect on the MDA-MB-231 cell line was achieved after incubation of 48 hours at a concentration of 200 µg/mL for both sorts, and on the MCF-7 cell line after incubation of 72 hours at a concentration of 100 µg/mL for the E3 sort and concentration of 200 µg/mL for the E4 sort.

Conclusion: Olive bud extracts show a certain cytotoxic effect on human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7, which depends on exposure time and concentration, and to a certain extent reduce the survival of said cancer cells. The effect of extracts is not always proportional to the increase in concentration. The extracts of the cultivars used in our research did not reach the IC₅₀ value.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Josip Kuštre

Datum i mjesto rođenja: 3. rujna 1995. godine, Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Pelinovac 17, 21230 Sinj

e-mail: josipkustrel@gmail.com

OBRAZOVANJE:

- **2002. – 2010.** Osnovna škola fra Pavla Vučkovića, Sinj, Republika Hrvatska
- **2010. – 2014.** Gimnazija Dinka Šimunovića u Sinju, Sinj, Republika Hrvatska
- **2014. – 2022.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, smjer: Medicina

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office

Strani jezici: engleski jezik, francuski jezik

Vozačka dozvola: B kategorija