

# Citotoksično djelovanje hlapljivih spojeva izoliranih iz sjemena *Lunaria annua* na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

---

Sučević, Darija

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:171:531782>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



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

**Darija Sučević**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA  
IZOLIRANIH IZ SJEMENA *LUNARIA ANNUA* NA RAZLIČITE  
STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA MJERENO MTT  
METODOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina 2018. /2019.**

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

**Split, rujan 2019. godine**

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

**Darija Sučević**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA  
IZOLIRANIH IZ SJEMENA *LUNARIA ANNUA* NA RAZLIČITE  
STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA MJERENO MTT  
METODOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina 2018. /2019.**

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

**Split, rujan 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 60. sjednici vijeća studija Farmacija te potvrđena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 14. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, izv. prof.  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, izv. prof.

### **Citotoksično djelovanje hlapljivih spojeva izoliranih iz sjemena *Lunaria annua* na različite stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom**

Darija Sučević, broj indeksa 131

#### **Sažetak:**

Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksični učinak hlapljivih spojeva izoliranih iz sjemena *Lunaria annua* na stanične linije humanih karcinoma dojke (MDA-MB-231) te pluća (A549). Korišteni su Clevenger destilat, mikrovalni ekstrakt te ekstrakt iz *Lunaria annua*. Stanice karcinoma dojke i pluća tretirane su Clevenger destilat, mikrovalnim ekstraktom te ekstraktom iz biljne vrste *Lunaria annua* u koncentraciji od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL pri različitim vremenskim intervalima (4, 24, 48 i 72 sata). Postotak vijabilnih stanica utvrđen je MTT metodom. Najbolji citotoksični učinak na staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231 imaju uzorci mikrovalnog ekstrakta i ekstrakta pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Najznačajniji citotoksični učinak na staničnu liniju karcinoma pluća A549 također imaju uzorci mikrovalnog ekstrakta i ekstrakta pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 72h inkubacije. Djelovanje izoliranih hlapljivih spojeva nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima dolazi do oporavka stanica. Citotoksični učinak hlapljivih spojeva izoliranih iz sjemena *Lunaria annua* je potvrđen, a idući korak je potvrđivanje tih učinaka u *in vivo* istraživanju na modelima karcinoma dojke i pluća 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:** 65 stranica, 21 slika, 3 tablice, 131 literaturna referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. dr.sc. Maja Valić, prof., predsjednik
2. dr.sc. Shelly Pranić, doc., član
3. dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić, izv. prof., član-mentor

**Datum obrane:** 24.9.2019.

**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, session no. 60 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19 Faculty Council of School of Medicine, session no. 14  
**Mentor:** Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof.  
**Technical assistance:** Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof.

### **The cytotoxic effect of volatile compounds isolated from *Lunaria annua* seeds on various cell lines of human cancers measured by the MTT assay**

Darija Sučević, index number 131

#### **Summary:**

The aim of the study was to examine the cytotoxic effect of volatile compounds isolated from *Lunaria annua* seeds on cell lines of human breast cancer (MDA-MB-231) and lung cancer (A549). Used samples were Clevenger distillate, microwave extract and extract from *Lunaria annua*. Breast and lung cancer cells were treated with Clevenger distillate, microwave extract and extract from *Lunaria annua* at a concentration of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL at different time intervals (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 MDA-MB-231 was achieved by microwave extract and extract samples at a concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time. In cell line A549, the most prominent effect on the reduction of metabolically active cells was achieved by microwave extract and extract samples 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 compounds isolated from *Lunaria annua* seeds has been confirmed, 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:** 65 pages, 21 figures, 3 tables, 131 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Maja Valić, PhD, full prof., chair person
2. Shelly Pranić, PhD, assist. prof., member
3. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, assoc. prof., member – supervisor

**Defence date:** September 24<sup>th</sup>, 2019

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

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 RAK.....	2
1.2 ONKOGENI.....	3
1.3 TUMORSUPRESORSKI GENI.....	3
1.4 EPIDEMIOLOGIJA RAKA.....	4
1.4.1 EPIDEMIOLOGIJA RAKA U SVIJETU .....	4
1.4.2 EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ .....	5
1.5 RAK DOJKE .....	6
1.5.1 ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA .....	6
1.5.2 KLINIČKA SLIKA.....	6
1.5.3 METODE PROBIRA .....	7
1.5.4 PATOHISTOLOGIJA.....	7
1.5.5 PROGNOСТИČKI I PREDIKTIVNI ČIMBENICI .....	8
1.5.6 TERAPIJSKI POSTUPAK .....	8
1.5.6.1 LIJEČENJE LOKALNOG, OPERABILNOG RAKA DOJKE .....	9
1.5.6.2 LIJEČENJE LOKALNOG, PRIMARNO NEOPERABILNOG RAKA DOJKE.....	11
1.5.6.3 LIJEČENJE METASTATSKE BOLESTI.....	11
1.6 RAK PLUĆA.....	12
1.6.1 ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA .....	12
1.6.2 KLINIČKA SLIKA.....	13
1.6.3 DIJAGNOSTIČKI POSTUPAK.....	13
1.6.4 TERAPIJSKI POSTUPAK .....	14
1.6.4.1 RAK PLUĆA NEMALIH STANICA.....	14
1.6.4.2 RAK PLUĆA MALIH STANICA .....	15
1.7 KUPUSNJAČE.....	17
1.8 GLUKOZINOLATI.....	17
1.9 <i>LUNARIA ANNUA</i> .....	19

1.9.1	ETIMOLOGIJA .....	19
1.9.2	KARAKTERISTIKE .....	19
1.9.3	KLIMA I STANIŠTE.....	19
1.9.4	UPOTREBA.....	19
1.9.5	SPOJEVI .....	20
1.9.5.1	NERVONSKA KISELINA .....	20
1.9.5.2	GLUKOZINOLATI .....	21
1.9.5.3	ALKALOIDI.....	21
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	22
2.1	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	23
2.2	HIPOTEZA.....	24
3.	MATERIJALI I METODE .....	25
3.1	STANIČNE LINIJE .....	26
3.1.1	MDA-MB-231.....	26
3.1.2	A549.....	27
3.2	POSTUPAK.....	28
3.2.1	STANIČNA KULTURA.....	28
3.2.2	ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH (VIJABILNIH) STANICA U KULTURI....	28
3.2.3.	TRETIRANJE STANICA KARCINOMA OTOPINAMA SJEMENA <i>LUNARIA ANNUA</i> .....	30
3.3	TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI .....	30
3.4	STATISTIČKA ANALIZA.....	31
4.	REZULTATI.....	32
4.1	MDA-MB-231 .....	33
4.1.1	<i>LUNARIA ANNUA</i> CLEVINGER DESTILAT .....	33
4.1.2	<i>LUNARIA ANNUA</i> MIKROVALNI EKSTRAKT.....	34
4.1.3	<i>LUNARIA ANNUA</i> EKSTRAKT .....	35
4.2	A549 .....	36

4.2.1	<i>LUNARIA ANNUA</i> CLEVINGER DESTILAT .....	36
4.2.2	<i>LUNARIA ANNUA</i> MIKROVALNI EKSTRAKT.....	37
4.2.3	<i>LUNARIA ANNUA</i> EKSTRAKT .....	38
5.	RASPRAVA.....	39
6.	ZAKLJUČAK .....	43
7.	LITERATURA.....	45
8.	SAŽETAK.....	58
9.	SUMMARY .....	61
10.	ŽIVOTOPIS .....	64

## *Zahvala...*

*Mojim roditeljima i sestri na beskrajnoj ljubavi i prijateljstvu. Ponajviše što su me naučili da ponekad treba ići krivim putem kako bi u konačnici došao na onaj pravi. Svojom bezrezervnom potporom vodili su me kroz sve aspekte mog života, što mi je uvelike olakšalo studentske dane.*

*Dugogodišnjim prijateljima i dečku koji su me učinili mnogo boljom verzijom same sebe.*

*Naposljetku, mojoj mentorici, profesorici Vedrani Čikeš Čulić na ukazanoj prilici za provođenje istraživanja na kojem se temelji ovaj diplomski rad.*

*Posveta...*

*Mom voljenom stricu Slavenu.*

## POPIS KRATICA

### A

ALK: anaplastična limfomna kinaza (eng. *anaplastic lymphoma kinase*)

### B

BRCA: tumorsupresorski gen

### C

CDK: ciklin-ovisna kinaza (eng. *cyclin-dependent kinase*)

CNS: središnji živčani sustav (eng. *central nervous system*)

CT: kompjuterizirana tomografija (eng. *computed tomography*)

CTLA-4: protein 4 vezan za citotoksični T-limfocit (eng. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)

### D

DMEM: Dulbecco modificirani Eagleov medij (eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: dimetil-sulfoksid (eng. *dimethyl sulfoxide*)

DNA: deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

### E

EGFR: receptor epidermalnog čimbenika rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*)

ER: estrogenski receptor (eng. *estrogen receptor*)

### F

FBS: fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*)

### G

GST: glutation-S-transferaza (eng. *Glutathione S-transferase*)

### H

HER2: receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*)

## **M**

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-tetrazolij (eng. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium*)

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (eng. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*)

## **N**

NADH: reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida (eng. *reduced nicotinamide adenine dinucleotide*)

NSCLC: rak pluća nemalih stanica (eng. *non small cell lung cancer*)

## **P**

p53 : transkripcijski čimbenik

P53: gen za protein p53

PAH: policiklički aromatski ugljikovodici (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbons*)

PARP: poli (ADP-ribozil) polimeraza (eng. *poly (ADP ribose) polymerase*)

PBS: fosfatni pufer (eng. *phosphate-buffered saline*)

PD-1: protein programirane stanične smrti 1 (eng. *programmed cell death-protein 1*)

PD-L1: ligand programirane stanične smrti 1 (eng. *programmed cell death-ligand 1*)

## **R**

RB: tumorsupresor

RDG: rendgensko snimanje

## **S**

SCLC: rak pluća malih stanica (eng. *small cell lung cancer*)

## **U**

UGT: UDP-glukuronoziltransferaza (eng. *UDP-glucuronosyltransferase*)

## **W**

WST-1: 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-tetrazolij (eng. *2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium*)



## **X**

XTT: 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamino)-karbonil-tetrazolijev bromid  
(eng. *2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-(phenylamino)-carbonyl-2H-tetrazolium  
hydroxide*)

## **1. UVOD**

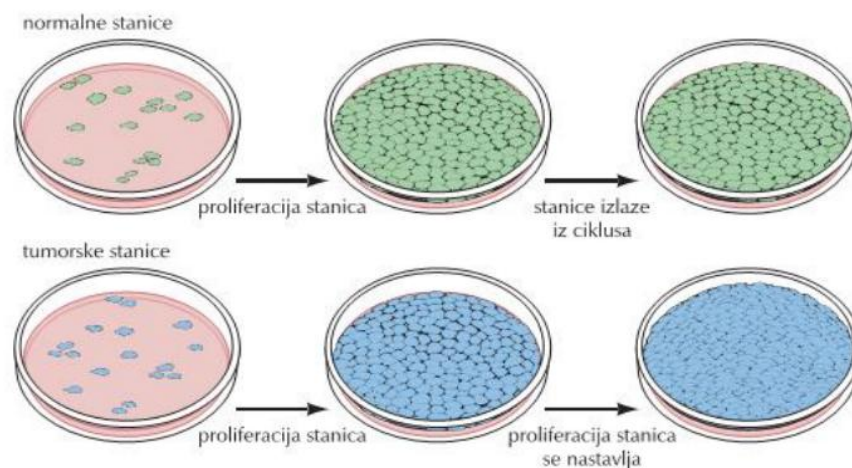
## 1.1 RAK

Novotvorine, koje se nazivaju još i tumorima ili neoplazmama, su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica [1]. Dobroćudni (benigni) tumor ne širi se u susjedna normalna tkiva niti u udaljene dijelove tijela te ostaje ograničen na mjesto na kojem je nastao. Naprotiv, zloćudni (maligni) tumor je u stanju proširiti se na susjedna normalna tkiva i čitavo tijelo preko krvožilnoga ili limfatičkog sustava (metastaze) [2]. Rak je naziv za zloćudne tumore, koji mogu biti opasni za život [1].

Rak nastaje kada stanica izgubi sposobnost adekvatnog odgovora na brojne signale, što dovodi do nekontrolirane diobe zloćudno preobražene stanice kojom nastaje nakupina takvih stanica. Za nastanak i progresiju raka važnu ulogu imaju mutacije, epigenetičke promjene, kao i aktivnost telomeraza [3].

Deset ključnih obilježja koja su zajednička svim tipovima raka jesu: neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, samodostatnost s obzirom na signale rasta, sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora, zaobilaznje programirane stanične smrti (apoptoze), neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza, sposobnost tkivne invazije i presađivanja, poremećen metabolizam, genomska nestabilnost te upala (*Slika 1*) [3].

Karcinomi su zloćudne bolesti epitelnih stanica na koje otpada otprilike 90% slučajeva raka u ljudi [2].



*Slika 1.* Inhibicija ovisna o gustoći. Razlika između normalne i tumorske stanice.

Preuzeto iz: Cooper MG, Hausman RE. Rak. U: Gordan Lauc, ur. Stanica. Peto izdanje.

Zagreb: Medicinska naklada; 2010. p. 730.

## 1.2 ONKOGENI

Onkogeni su promijenjena inačica normalnih staničnih gena koje nazivamo protoonkogenima, a koji su uključeni u prijenos signala u stanici. Putevi prijenosa signala u stanici pomažu da se dioba, stanični rast, diferencijacija i preživljenje usklađuju s uvjetima u okolišu stanice. Ako se protoonkogeni promijene tako da oni sami ili njihovi proteinski produkti postanu aktivniji, tada u procesu koji nazivamo aktivacijom onkogenata, nastaju onkogeni. Posljedica aktivacije onkogenata jest nekontrolirana dioba i rast stanice, što uzrokuje nastanak raka. Onkogeni se mogu aktivirati zbog mutacija u samom genu ili kao posljedica kromosomske translokacije (dio kromosoma se „odlomi“ i premjesti na drugi kromosom). Mogu se, također, aktivirati kao posljedica genske amplifikacije (povećanja broja kopija gena) kao u slučaju onkogenata HER2/neu kod raka dojke [3].

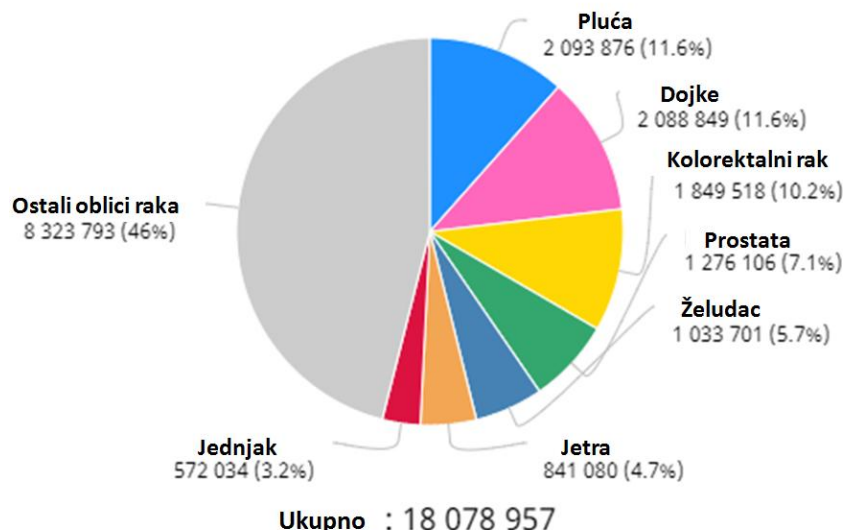
## 1.3 TUMORSUPRESORSKI GENI

Suprotno od onkogenata čija pojačana aktivnost dovodi do nastanka raka, tumorsupresorski geni su geni čija inaktivacija ili gubitak njih samih, odnosno njihovih proteinskih produkata dovodi do nastanka raka. Prvi otkriveni tumorsupresorski gen bio je RB, koji je povezan s retinoblastomom, rakom mrežnice. P53 je posebno važan tumorsupresorski gen, koji je često mutiran u različitim tipovima raka u ljudi. Njegov proteinski produkt, transkripcijski čimbenik p53, aktivira se zbog oštećenja stanične DNA ili drugih poremećaja povezanih sa staničnim stresom. Uloga aktiviranog p53 je da zaustavi stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA te da potiče apoptozu. Ako gen P53 u stanici nedostaje ili je inaktiviran, tada u diobu mogu ući i stanice kojima je DNA oštećena, čime se povećava vjerojatnost nastanka raka. Inaktivacija p53 u stanicama raka povezana je i s rezistencijom na radioterapiju i kemoterapiju te tumorskom angiogenezom [3].

## 1.4 EPIDEMIOLOGIJA RAKA

### 1.4.1 EPIDEMIOLOGIJA RAKA U SVIJETU

Rak je u svjetskim razmjerima vodeći javnozdravstveni problem. U razvijenim zemljama on je drugi uzrok smrti, po učestalosti nakon kardiovaskularnih bolesti [4]. U 2012. godini, najčešće dijagnosticirani su bili: rak pluća (1,82 milijuna oboljelih), rak dojke (1,67 milijuna oboljelih) te kolorektalni rak (1,36 milijuna oboljelih). Vodeći uzrok smrtnosti od raka je rak pluća (1,6 milijuna umrlih), rak jetre (745 000 umrlih) i rak želudca (723 000 umrlih) [5]. Procjenjuje se da je u 2018. godini 9,6 milijuna ljudi umrlo zbog raka [6]. Kod muškaraca, rak pluća je najčešće dijagnosticiran rak i vodeći uzrok smrtnosti od raka, nakon čega slijede rak prostate i kolorektalni rak zbog incidencije te rak jetre i rak želudca zbog smrtnosti. Kod žena, rak dojke je najčešće dijagnosticiran rak i vodeći uzrok smrtnosti od raka, nakon čega slijede kolorektalni rak te rak pluća zbog incidencije i obrnuto, zbog smrtnosti, dok je rak grlića maternice četvrti po incidenciji i smrtnosti (*Slika 2*) [7]. Socioekonomski čimbenici također utječu na incidenciju raka. U razvijenijim zemljama, 2008. godine, rak dojke, rak pluća, kolorektalni rak i rak prostate činili su polovicu ukupne incidencije, dok su u srednje razvijenim zemljama učestali bili i rak jednjaka, rak želudca i rak jetre. U slabije razvijenim zemljama, rak grlića maternice bio je češći od raka dojke i raka jetre [8, 9].

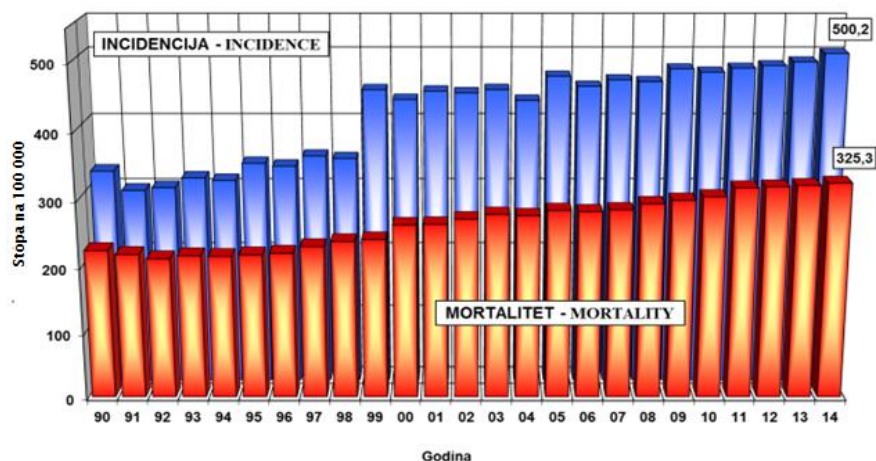


*Slika 2.* Incidencija raka u svijetu u 2018. godini.

Preuzeto i modificirano s: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>

## 1.4.2 EPIDEMIOLOGIJA RAKA U HRVATSKOJ

Rak je značajan javnozdravstveni problem u Hrvatskoj. Poslije bolesti srca i krvnih žila, drugi je najvažniji uzrok smrti. U razdoblju od 1990. do 2014. godine stopa incidencije raka u Hrvatskoj raste te u 2014. godini iznosi 500,2/100 000, a u tom razdoblju također raste i stopa mortaliteta od raka te u 2014. godini iznosi 325,3/100 000 (Slika 3) [4].



Slika 3. Stope incidencije i mortaliteta od raka u Hrvatskoj od 1990. do 2014. godine.

Preuzeto s: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske.

Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.

U Hrvatskoj je 2015. godine od raka umrlo 14 012 osoba, 8 030 muškaraca i 5 982 žene. Stope mortaliteta bile su 333,3/100 000; odnosno 395,8/100 000 (M) i 275,0/100 000 (Ž). Odnos M:Ž je 57:43 [10]. Za muškarce je u 2015. godini stopa incidencije raka bila najniža u Šibensko-kninskoj županiji (462,6), a najviša u Brodsko-posavskoj županiji (806,4). Za žene je najniža stopa incidencije zabilježena u Splitsko-dalmatinskoj županiji (384,8), a najviša u Požeško-slavonskoj županiji (518) [10].

Pet najčešćih sijela raka čine ukupno 58% novih slučajeva raka u muškaraca: traheja, bronh i pluća (18%), prostata (18%), kolon (9%), rektum, rektosigma i anus (7%) i mokraćni mjehur (6%). Pet najčešćih sijela raka u žena: dojka (26%), kolon (8%), traheja, bronh i pluća (8%), tijelo maternice (6%) i štitnjača (6%), čine 53% novih slučajeva raka u žena. Kolon, rektum, rektosigma i anus zajedno u incidenciji sudjeluju s 16% u muškaraca i 13% u žena [10].

## 1.5 RAK DOJKE

### 1.5.1 ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA

Rak dojke je najčešće dijagnosticiran rak kod žena i vodeći je uzrok smrtnosti od raka kod žena diljem svijeta, a incidencija se povećava u slabije razvijenim zemljama [11, 12]. Uzrokuje oko 15 % smrti zbog raka i čini gotovo 25% tumora u žena. Pretpostavlja se da će svaka deveta žena dobiti rak dojke tijekom svog života. I u Hrvatskoj je, također, na prvom mjestu po incidenciji. Oko 2 600 žena godišnje oboli u Hrvatskoj, što nas svrstava među zemlje s visokom incidencijom [13]. Razlike u stopama incidencije raka dojke među populacijama upućuju na to da se etiološki čimbenici razlikuju po biološkoj ekspresiji i utjecaju na ishod bolesti. Sociodemografske razlike i razlike u ponašanju različitih populacija utječu na to kako se biološka bolest izražava među različitim rasama i etničkim skupinama, što doprinosi varijacijama u incidenciji, smrtnosti i preživljenju raka dojke [14]. Pokazalo se da su čimbenici rizika za nastanak raka dojke: dob, indeks tjelesne težine (BMI), dob nastupa menarhe i menopauze, dob kod prve trudnoće, uzimanje oralnih kontraceptiva te hormonske nadomjesne terapije, laktacija, pozitivna obiteljska anamneza i zračenje [15, 16]. Unatoč značajnom napretku u istraživanju raka, rak dojke ostaje vodeći javnozdravstveni problem i jedan od najvećih prioriteta biomedicinskih istraživanja. Očekuje se da će se incidencija i stopa smrtnosti značajno povećati u narednim godinama [17].

### 1.5.2 KLINIČKA SLIKA

Najučestaliji simptom raka dojke je bezbolan čvor u dojci. Ostali simptomi mogu biti zadebljanje kože, uvlačenje bradavice, krvavi iscjedak iz bradavice, upala, crvenilo kože te oteknuće regionalnih limfnih čvorova [18]. Kod metastatskog raka dojke na simptome utječe mjesto metastaza, a ti se simptomi često javljaju zajedno s boli, umorom te problemima sa spavanjem [19]. Inflamacijski (upalni) rak dojke popraćen je eritemom koji zahvaća više od 1/3 dojke, ružičastom do crvenom bojom kože, osjećajem topline u zahvaćenoj dojci, edemom, povećanjem dojke te kožom poput kore naranče [20].

### 1.5.3 METODE PROBIRA

Mamografija kao metoda probira široko je dostupna u mnogim zemljama diljem svijeta. Predstavljena je kao veliko postignuće za zdravlje žena [21]. Jedina je metoda probira koja dokazano smanjuje smrtnost od raka dojke, za otprilike 25% u žena starijih od 50 godina. Metoda ima visoku specifičnost (90%) i osjetljivost (90%) u postmenopauzalnih žena. Nije dokazana korist mamografije u žena mlađih od 50 godina. Problem kod mamografije jest to što je 80% žena smatra neugodnom, što smanjuje njihovu suradnju [22]. 1% testova daje lažno pozitivan rezultat što može dovesti do nepotrebnih biopsija i straha kod pacijentica [22, 23]. Također, problem je što se tumori dojke mogu se razviti i u razdobljima između dviju mamografija [22].

Primjena samopregleda dojke, još jedne metode probira, je dvojbena jer je većina napipanih kvržica dobroćudna [22]. Nema dokaza da metoda umanjuje smrtnost od raka dojke. Štoviše, samopregled dojke povećava broj provedenih mamografskih pregleda te nepotrebnih biopsija s negativnim (benignim) rezultatom [24].

### 1.5.4 PATOHISTOLOGIJA

Tumori dojke mogu biti benigni i maligni. Histogenetski, tumori nastaju iz strome ili epitela: epitelni su tumori mnogo učestaliji od stromalnih. Među malignim tumorima najčešći su karcinomi dojke koji gotovo svi spadaju u histološku skupinu adenokarcinoma. S obzirom na invazivnost, dijele se na invazivne, neinvazivne i mikroinvazivne oblike. Neinvazivni karcinomi dojke nazivaju se još i karcinomima *in situ* te, za razliku od invazivnih karcinoma, imaju održanu bazalnu membranu. Nekoliko je osnovnih molekularnih subtipova karcinoma dojke i to: luminalni tip A koji nastaje iz luminalnih stanica kanalića, luminalni tip B karcinoma dojke istog podrijetla, ali nešto lošije prognoze, trostruko negativni karcinom dojke podrijetla bazalnih stanica i HER2 pozitivni karcinom dojke. Najbolju prognozu imaju luminalni tip A, a najlošiju trostruko negativni tumori [25].



### 1.5.5 PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI ČIMBENICI

Prognoštički čimbenici imaju ulogu u ocjeni prognoze i u liječenju bolesnica s invazivnim karcinomom dojke, a prediktivni čimbenici procjenjuju vjerojatnost odgovora na određenu vrstu terapije (*Tablica 1*) [25].

*Tablica 1.* Prognoštički i prediktivni čimbenici raka dojke.

Podaci preuzeti iz: Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti dojke: Tumori dojke. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. p. 654- 656.

Prognoštički čimbenici	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, veličina tumora, histološki tip tumora, diferenciranost tumora, vaskularna invazija, tumorska nekroza, Ki-67 mitotički indeks, dob bolesnice, status receptora za steroidne hormone, HER2 status</b></li></ul>
Prediktivni čimbenici	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>status receptora za steroidne hormone, status receptora za čimbenike rasta (HER2 status)</b></li></ul>

### 1.5.6 TERAPIJSKI POSTUPAK

Kod lokalnog raka dojke cilj je izlječenje i sprječavanje recidiva, dok je kod metastatskog raka cilj produljenje života te ublažavanje simptoma kako bi se osigurala što bolja kvaliteta života [26]. Terapija je znatno napredovala proteklih godina, a plan liječenja se sastavlja pomoću multidisciplinarnog tima [27].

### 1.5.6.1 LIJEČENJE LOKALNOG, OPERABILNOG RAKA DOJKE

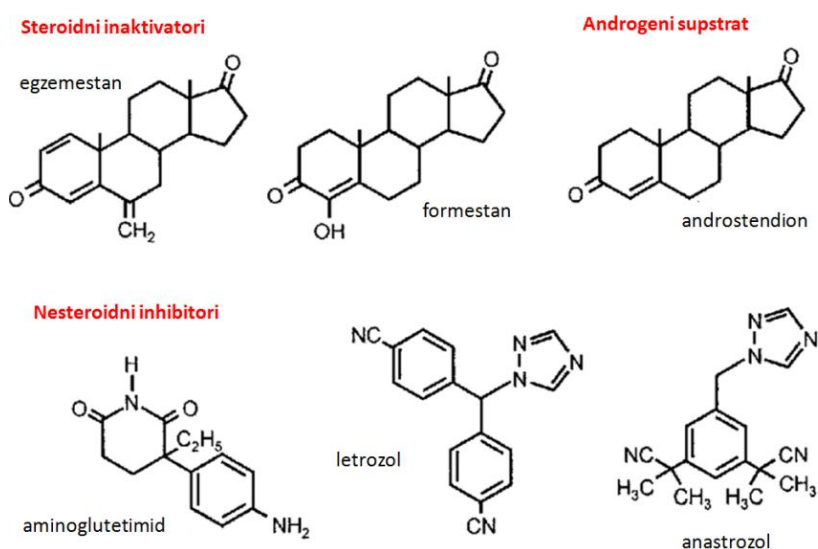
U slučaju lokalnog raka kirurški zahvat je inicijalni terapijski modalitet, čija je svrha uklanjanje primarnog tumora te mogućih presadnica u limfnim čvorovima aksile [13]. Više je mogućnosti kirurškog postupka: kvadrantektomija (poštedna operacija kada se uklanja kvadrant ili dio dojke oko tumora i limfni čvorovi iz pazušne jame), jednostavna mastektomija (uklanjanje žljezdanog tkiva dojke, kože i bradavice iznad pektoralnog mišića), modificirana radikalna mastektomija (uklanjanje dojke kao kod jednostavne mastektomije i limfnih čvorova iz pazušne jame iz triju razina) te mastektomija s poštedom dojke (uklanjanje žljezdanog tkiva dojke uz očuvanje kože i bradavice u slučaju kada se radi primarna rekonstrukcija dojke) [28]. Iako je mastektomija ponekad nužna za spašavanje života, može uzrokovati fizičku i psihološku traumu kod pacijentice zbog čega se radi rekonstrukcija, koja doprinosi obnovi kvalitete života [29]. Moguće su i postoperativne komplikacije (npr. infekcija rane) koje su pod utjecajem više čimbenika rizika (pušenje, prethodno zračenje, pretilost, dijabetes itd.) [30]. Stadij bolesti, odnosno stupanj vjerojatnosti pojave lokalnog recidiva ili diseminacije raka dojke procjenjuje se nakon kirurškog zahvata i patohistološkog opisa tumora [13].

Adjuvantna kemoterapija primjenjuje se nakon operacije raka dojke, s ciljem iskorjenjivanja mikroskopskih žarišta stanica raka koje, ako se ne liječe, mogu rasti i metastazirati. Smanjuje rizik od recidiva i poboljšava preživljenje, ali apsolutna korist u bolesnica s niskim rizikom recidiva može biti mala. Stoga, prilikom odluke o primjeni adjuvantne kemoterapije, moraju se uzeti u obzir čimbenici rizika, kao i dob bolesnice te komorbiditeti. Ne postoji jedinstveni svjetski standardni adjuvantni kemoterapijski protokol u liječenju raka dojke, no većinom se koristi tzv. AC-T protokol koji uključuje kombinaciju doksorubicina i ciklofosfamida (AC) praćenu paklitakselom (T) [31].

Adjuvantna radioterapija koristi se u liječenju lokoregionalne bolesti dojke. Za pacijentice s negativnim limfnim čvorovima kod kojih je proveden poštedni kirurški zahvat, preporuča se radioterapija cijele dojke [32]. Ordinira se uobičajeno mjesec dana nakon operacije, odnosno nakon cijeljenja rane. Adjuvantna radioterapija se ordinira mjesec dana nakon kemoterapije (6 mjeseci nakon kirurškog zahvata) ako se u bolesnice planira ordinirati i adjuvantna kemoterapija [13].

Adjuvantna hormonska terapija indicirana je u bolesnica koje imaju rak dojke koji je pozitivan na hormonske steroidne receptore. U liječenju premenopauzalnih bolesnica lijek izbora je tamoksifen (20 mg dnevno), u trajanju od 5 do 10 godina [33]. Tamoksifen ima inhibitorno djelovanje na dojku, ali ekscitacijsko na endometriju [34]. Adjuvantna terapija tamoksifenom povezana je s povećanim rizikom za nastanak raka endometrija [35]. U liječenju postmenopauzalnih bolesnica lijekovi izbora su aromatazni inhibitori (anastrozol - 1 mg dnevno, letrozol - 2,5 mg dnevno i egzemestan - 25 mg dnevno) u trajanju od 5 do 10 godina (Slika 4). Aromatazni inhibitori mogu dovesti do osteoporoze pa se prije početka liječenja radi denzitometrija skeleta te se pacijenticama preporučuje uzimanje kalcija i vitamina D [33].

Adjuvantna imunoterapija trastuzumabom u trajanju od jedne godine primjenjuje se u bolesnica kojima je tumor veći od 0,5 cm, a koje su HER2 pozitivne [13].



Slika 4. Kemijska struktura aromataznih inhibitora.

Preuzeto i modificirano s: [https://www.researchgate.net/figure/Different-classes-of-aromatase-inhibitor-Steroidal-inhibitors-are-androgen-analogues-and\\_fig2\\_227140597](https://www.researchgate.net/figure/Different-classes-of-aromatase-inhibitor-Steroidal-inhibitors-are-androgen-analogues-and_fig2_227140597)

### 1.5.6.2 LIJEČENJE LOKALNOG, PRIMARNO NEOPERABILNOG RAKA DOJKE

Kod liječenja lokalnog, ali inicijalno neoperabilnog raka dojke stadija IIIA i B, primarno se primjenjuje kemoterapija ili rjeđe hormonska terapija. Kirurški zahvat - mastektomija s uklanjanjem regionalnih limfnih čvorova obavi se nakon postignutog smanjenja primarnog tumora [13].

### 1.5.6.3 LIJEČENJE METASTATSKE BOLESTI

Ako je dijagnosticiran metastatski rak dojke, često će se napraviti nova biopsija presadnice kako bi se ponovno procijenila izraženost bioloških biljega i potvrdio histološki nalaz. Cilj sustavnog liječenja je poboljšanje kvalitete života te njegovo produljenje, što se najbolje postiže ciljanim liječenjem, koje se obično koristi kao primarno liječenje u većine bolesnica. Uz sustavno liječenje, u bolesnica se može provesti radioterapija ili se mogu podvrgnuti kirurškom zahvatu. Lijekovi kao što su denosumab i bisfosfonati mogu pomoći smanjiti bolnost i učestalost prijeloma kosti, koji su obično povezani s prisustvom presadnica u kostima. Kemoterapija je standardno liječenje za trostruko negativni rak dojke i za ER pozitivne, HER2 negativne bolesnice koje više ne reagiraju na hormonsko liječenje. Kemoterapije se obično daju sekvencijski za metastatsku bolest, ali se mogu dati i u kombinaciji ako rak napreduje brzo. Bolesnice će obično dobiti vinorelbin, kapecitabin ili eribulin. ER pozitivnu, HER2 negativnu bolest treba gotovo uvijek inicijalno liječiti endokrinim liječenjem: inhibitorom aromataze, fulvestrantom ili tamoksifenom. Za HER2 pozitivnu uznapredovalu bolest prva linija liječenja će vjerojatno biti trastuzumab i pertuzumab u kombinaciji s kemoterapijom (obično docetaksel ili paklitaksel). CDK4/6 inhibitori (ribociklib, palbociklib i abemaciclib) mogući su izbor liječenja za ER pozitivni uznapredovali rak dojke, u kombinaciji s inhibitorom aromataze ili fulvestrantom. Noviji lijekovi, talazoparib i olaparib su PARP inhibitori koji se mogu koristiti kao alternativa kemoterapiji u bolesnica s BRCA1/2 mutacijama [36]. Prosječno preživljenje bolesnice s metastatskom bolešću iznosi oko 3-5 godina. Nešto je dulje za HER2 pozitivnu bolest (oko 60 mjeseci), srednje za luminalni tip tumora (45 mjeseci) te najkraće za trostruke negativne tumore (24-36 mjeseci) [13].

## 1.6 RAK PLUĆA

### 1.6.1 ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA

Diljem svijeta, rak pluća je najčešće dijagnosticiran rak čija se incidencija te smrtnost znatno povećala od 30-ih godina 20. stoljeća, uglavnom zbog pušenja cigareta. Stoga se, tijekom prošlog stoljeća, rak pluća pretvorio u globalni problem [37-39]. Procjenjuje se da je 2018. godine od raka pluća oboljelo 2,1 milijuna ljudi, a da je zbog njega umrlo 1,8 milijuna ljudi [40]. Rak pluća najčešća je zloćudna bolest u muškaraca, dok u ženskoj populaciji zauzima treće mjesto po učestalosti i drugo po smrtnosti. U Hrvatskoj je 2014. godine rak pluća u muškaraca bio prvi po incidenciji i po mortalitetu, dok je u žena bio treći po incidenciji te drugi po mortalitetu [41]. Učestalost raka pluća značajno se razlikuje ovisno o spolu, dobi, rasnoj / etničkoj pripadnosti, socioekonomskom statusu i geografskom položaju [42]. U ljudi nižeg socioekonomskog statusa i obrazovanja učestalost raka pluća je veća, što se povezuje s njihovom češćom navikom pušenja, ali i većom izloženosti ostalim čimbenicima rizika [41]. U posljednje vrijeme, stopa smrtnosti od raka pluća povećala se kod žena, što se pripisuje pušenju cigareta [43]. Čimbenici rizika za razvoj raka pluća su pušenje cigareta, pasivno pušenje, onečišćenost zraka, profesionalna izloženost (npr. azbest) te pozitivna obiteljska anamneza [44]. Najvažniji čimbenik rizika je pušenje cigareta u kojima postoji niz štetnih spojeva, potencijalnih karcinogena kao što su: PAH, aromatski amini, N-nitrozamini te spojevi kao što je benzen [45, 46]. Postoji povezanost između broja popušanih cigareta na dan, broja godina pušenja, dobi kada je osoba počela pušiti, učestalosti pušenja (svakodnevno ili povremeno) te je li osoba i dalje aktivno puši ili je pušila u prošlosti s rizikom razvoja raka pluća [47]. Dokazano je da dugogodišnje pasivno pušenje (npr. u kućanstvima) povećava rizik od razvoja raka pluća [48]. Etiološki čimbenici raka pluća postaju složeniji zajedno s industrijalizacijom, urbanizacijom i zagađenjem okoliša [49].

## 1.6.2 KLINIČKA SLIKA

Simptomi karcinoma pluća pojavljuju se zbog lokalne iritacije, pritiska na bronhe ili druge anatomske strukture. Tumori se zbog toga očituju kašljem, zaduhom te bolom u prsištu. Drugi simptomi mogu nastati i zbog širenja tumora unutar prsišta ili izvan njega. Treća skupina simptoma povezuje se s djelovanjem tumora na cijeli organizam što dovodi do mršavljenja, gubitka teka, mučnine itd. Četvrtu skupinu simptoma čine takozvani paraneoplastični sindromi. Iako su svi tipovi tumora pluća sposobni proizvoditi hormone, najčešće ih luči sitnostanični karcinom. Može doći do prekomjerna lučenja adrenokortikotropnog hormona ili antidiuretičkog hormona [50].

## 1.6.3 DIJAGNOSTIČKI POSTUPAK

Ako se postavi sumnja na postojanje raka pluća na osnovi anamneze i/ili kliničkoga pregleda, treba napraviti RTG pluća. Međutim, uredan nalaz ne isključuje postojanje raka pluća. U usporedbi s RTG-om, CT toraksa nadmoćna je pretraga, osobito u procjeni ekstenzije tumora te u detekciji povećanih medijastinalnih limfnih čvorova (*Slika 5*). Patohistološka dijagnoza postavlja se najčešće pregledom bronhoskopski uzetog tkiva. Alternativno, postavlja se citološka dijagnoza, i to najčešće analizom iskašljaja, odnosno bronhoskopski uzetih uzoraka (ispirak, bronhoalveolarna lavaža, otisak). Nakon utvrđivanja lokoregionalnog statusa bolesti te postavljanja citološke/patohistološke dijagnoze, dodatnim pretragama treba utvrditi postoji li udaljena diseminacija [41].



*Slika 5.* Karcinom pluća prikazan CT-om.

Preuzeto s: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/lung-cancer-screening-challenges>

Dvije skupine raka pluća su rak pluća malih stanica (SCLC, 15%) te rak pluća nemalih stanica (NSCLC, 85%). U skupinu raka pluća nemalih stanica spadaju adenokarcinom (40-45%), rak pločastih stanica (30%) te rak velikih stanica (10-15%) [41, 51]. SCLC je agresivniji od NSCLC, s lošijom prognozom, gdje ukupno 5-godišnje preživljenje iznosi oko 5% [52].

#### 1.6.4 TERAPIJSKI POSTUPAK

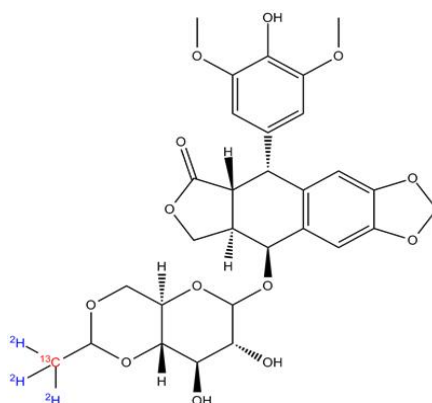
##### 1.6.4.1 RAK PLUĆA NEMALIH STANICA

Pacijentima sa stadijima bolesti I, II. i III. A moguće je napraviti kirurški zahvat pri kojem kirurg može ukloniti dio pluća ili režanj koji sadrži tumor, ako se procijeni da je pacijent zadovoljavajućeg općeg stanja prilikom procjene čimbenika za utvrđivanje operabilnosti. Nakon kirurškog zahvata, pacijentima se može ordinirati kemoterapiju s ciljem da se ubiju preostale stanice raka te produlji preživljenje. Za IV. stadij bolesti, kombinirana kemoterapija čini osnovu liječenja, a na izbor mogu utjecati komorbiditeti, dob te opće stanje pacijenta. Polikemoterapija, koja se ordinira kada je pacijent zadovoljavajućeg općeg stanja temelji se na kombinaciji spojeva platine (karboplatin, cisplatin) s paklitakselom, gemcitabinom, docetakselom, vinorelbinom, irinotekanom te pemetreksedom. Monokemoterapija je prikladnija kod pacijenata lošijeg općeg stanja. Bolesnici kojima je NSCLC lokaliziran u prsima, a nisu kandidati za kiruršku resekciju, mogu imati koristi od radioterapije. Radioterapija također može biti dio palijativne skrbi za poboljšanje kvalitete života kod pacijenata koji ne reagiraju na kemoterapiju [53]. Između 10% i 15% ljudi s NSCLC imaju specifičan tip karcinoma koji je pozitivan na EGFR, gdje postoje određene promjene gena tumorskih stanica koji kontroliraju stanični rast. Erlotinib, gefitinib i afatinib su tirozin-kinazni inhibitori EGFR-a koji odgađaju daljnje širenje karcinoma pluća i poboljšavaju kvalitetu života, ali ne produljuju preživljenje [53, 54]. U bolesnika s NSCLC-om pozitivnim na ALK stvara se abnormalni oblik ALK-a koji stimulira diobu i nekontrolirani rast stanica raka. ALK pripada obitelji enzima naziva receptorske tirozin kinaze, koja je uključena u rast stanica i razvoj novih krvnih žila koje ih opskrbljuju. Krizotinib, ceritinib i alektinib su tirozin - kinazni inhibitori rearanžiranog ALK-a čime se smanjuje rast i širenje stanica raka [55]. Novi pristup liječenja u imunoterapiji cilja mehanizme koji moduliraju imunost, a koji pomažu tumorskim stanicama da se obrane od imunološkog sustava. Koriste se inhibitori kontrolnih točaka, protutijela usmjerena na molekule koje su odgovorne za regulaciju imunološkog odgovora [41, 53].

#### 1.6.4.2 RAK PLUĆA MALIH STANICA

##### Ograničena bolest

Operativni zahvat je rijetko indiciran, ali ga nedavne kliničke smjernice preporučuju za I. stadij bolesti, nakon čega slijedi adjuvantna kemoterapija i profilaktička kranijalna radioterapija na temelju pretpostavke da se SCLC rano širi i da je kemosenzitivan [56, 57]. Istraživanja su pokazala da konkominantna kemoterapija i rano započeta radioterapija (nakon prvog ili drugog ciklusa), omogućuju bolju kontrolu bolesti [57]. Trenutni standard u liječenju ograničene bolesti SCLC je istodobna kemoradioterapija, odnosno polikemoterapija (četiri ciklusa cisplatina i etopozida) te terapija torakalnog zračenja tijekom prvog ili drugog ciklusa kemoterapije [58]. Cisplatin je alkilirajući spoj na bazi platine koji se izlučuje uglavnom putem bubrega što može dovesti do nefrotoksičnosti [59]. Etopozid je polusintetski derivat podofilotoksina, a njegov mehanizam djelovanja uključuje inhibiciju topoizomeraze II, što uzrokuje prekid lanca DNA i stvaranje kompleksa lijek-DNA-enzim (*Slika 6*) [60]. CNS je uobičajeno mjesto metastaza pa će oko 45% pacijenata koji postignu odgovor na početno liječenje, razviti metastaze u CNS-u kao jedino mjesto recidiva nakon 2 godine. Profilaksa recidiva u CNS-u je, stoga, iznimno bitna. Nakon završetka kemoterapije u pacijenata zadovoljavajućeg općeg stanja, potrebno je razmotriti profilaktičku iradijaciju mozga [57, 61].



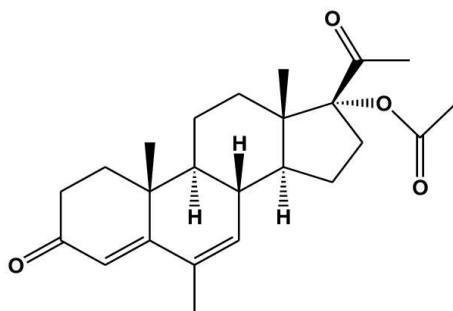
*Slika 6.* Kemijska struktura etopozida.

Preuzeto s: <https://www.indiamart.com/alpas-chemicals/anti-cancer-or-chemotherapy-apis.html>



## Proširena bolest

Napredni stadij i dalje predstavlja neizlječiv oblik bolesti, a standard liječenja čini kemoterapija s ciljem ublažavanja simptoma i produljenja preživljenja. Polikemoterapija se obično sastoji od kombinacije cisplatina ili karboplatina i etopozida do šest ciklusa, nakon čega se pacijenta pažljivo nadzire [57, 62]. Palijativna radioterapija se primjenjuje kod bolesnika sa sindromom gornje šuplje vene te kod presadnica u mozgu i kostima [41]. Imunoterapija inhibitorima kontrolnih točaka (anti-PD1: nivolumab, pembrolizumab; anti-PD-L1: atezolizumab, durvalumab; anti-CTLA-4: ipilimumab, tremelimumab) pokazala je obećavajuće antitumorsko djelovanje s potencijalnim produljenjem preživljenja. Atezolizumab je u kombinaciji s kemoterapijom postigao poboljšanje preživljenja kod pacijenata s novodijagnosticiranim naprednim stadijem SCLC [63]. Važno je na vrijeme započeti ordiniranje simptomatsko-potporne terapije lijekovima za poboljšanje teka (megestrol-acetat) odnosno visokoenergijskim pripravcima kao dodacima prehrani zbog čestog gubitka tjelesne mase [41]. Megestrol-acetat poboljšava apetit, unos kalorija te nutritivni status (*Slika 7*) [64].



*Slika 7.* Kemijska struktura megestrol-acetata.

Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-megestrol-acetate\\_fig4\\_264043387](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-megestrol-acetate_fig4_264043387)

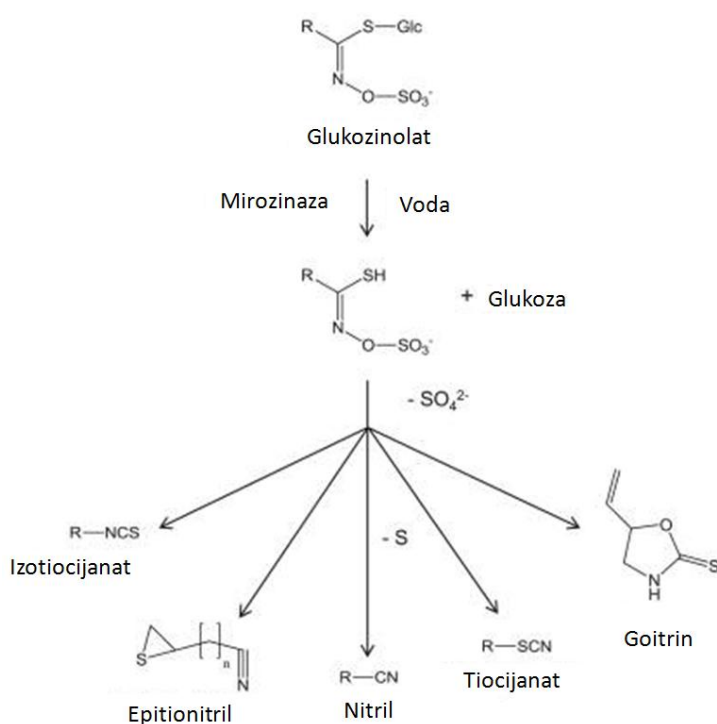
## 1.7 KUPUSNJAČE

Kupusnjače, odnosno, krstašice (*Brassicaceae*, prethodno *Cruciferae*), porodica su cvjetnica (red *Brassicales*), a sadrže 338 rodova i približno 3700 vrsta. Porodica uključuje mnoge vrste koje imaju veliki ekonomski, agronomski i znanstveni značaj. Ekonomski važne biljke, prilično izmijenjene i udomaćene od strane ljudi, osobito su one iz roda *Brassica*, koji uključuje kupus, brokulu, prokulice, kelj, korabu te repu [65, 66]. Ostali važni poljoprivredni usjevi porodice su hren, rotkvica i bijeli senf. Određeni broj vrsta, kao što su jednogodišnja mjesečnica, Arduinova gromotulja te ognjica, uzgajaju se kao ukrasne biljke, a neke se smatraju invazivnim vrstama u područjima nespecifičnim za njihov rast. Kupusnjače su uglavnom zeljaste i mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili trajnice. Listovi su im jednostavni i naizmjenično raspoređeni, a mogu imati i papreni okus. Cvjetovi su im križni s četiri latice i četiri lapa, uglavnom bijeli, žuti ili boje lavande. Karakteristična su četiri duga i dva kratka prašnika te dvodijelni tučak smješten iznad ostalih biljnih dijelova. Sjemenke se proizvode u suhim plodovima, često s pregradom između polovica. Kratki, zaobljeni plodovi poznati su kao komuščice, a dugi, tanki kao komuške [65].

## 1.8 GLUKOZINOLATI

Biljke porodice *Brassicaceae* bogat su izvor glukozinolata, bioloških spojeva koji sadrže sumpor. Glukozinolati (S-glukopiranozil tihidroksimati) su spojevi kod kojih su glukoza i sulfatna skupina vezane na aglukon, koji se sintetizira iz aminokiselina i njihovih analoga. Struktura bočnog lanca glukozinolata određena je aminokiselinom. Temeljem različitih aminokiselinskih prekursora mogu se podijeliti na alifatske, aromatske i indolne [67-69]. Glukozinolati, sekundarni metaboliti, kemijski su stabilni i biološki neaktivni. Oštećenjem biljnog tkiva prouzrokovanim npr. žetvom, žvakanjem ili štetočinama, glukozinolati se brzo enzimatski hidroliziraju mirozinazom (tioglukozid-glukohidrolaza) pri čemu se oslobađaju sulfat, glukoza i biološki aktivni produkti razgradnje kao što su izotiocijanati, nitrili, tiocijanati i oksazolidintioni (*Slika 8*) [67-70]. Koji će produkti razgradnje nastati uvelike ovisi o uvjetima hidrolize (pH vrijednosti) i strukturi bočnog lanca [70, 71]. Kiseli uvjeti pogoduju nastanku nitrila, dok viši pH pogoduje nastanku izotiocijanata [72].

Nedavne studije pokazale su korisne učinke glukozinolata, uključujući ulogu u upali i odgovoru na stres, kao i antioksidativna te antimikrobna svojstva [70]. Uloga glukozinolata u biljkama ostaje nejasna, ali izotiocijanati koji imaju oštar ili iritantan okus i miris mogu biti povezani s obranom biljaka od mikroorganizama. Izotiocijanati su opsežno proučavani u eksperimentalnim *in vitro* i *in vivo* modelima karcinogeneze zbog njihova citotoksičnog učinka na stanice raka [68]. Otkriveno je da imaju učinak na enzime uključene u metabolizam karcinogena, inhibicijom enzima faze I (enzimi iz obitelji citokroma P450) ili indukcijom enzima faze II biotransformacije [73-76]. Enzimi faze II, uključujući GST i UGT, imaju važnu ulogu u zaštiti stanica od oštećenja DNA [77]. Uočena je i uloga u očuvanju normalne regulacije staničnog ciklusa, kao i inhibicija proliferacije te indukcija apoptoze u brojim staničnim linijama karcinoma [73, 75, 77]. Također, izotiocijanati mogu inhibirati aktivnost histon deacetilaze u kulturi stanica karcinoma što potencijalno može spriječiti razvoj karcinoma inducirajući transkripciju tumorsupresorskih gena koji potiču diferencijaciju i apoptozu transformiranih (prekancerogenih) stanica [77, 78]. Pokazalo se da izotiocijanati imaju učinak na inhibiciju angiogeneze [75, 79].



Slika 8. Opća shema enzimske hidrolize glukozinolata.

Preuzeto i modificirano s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4031110/>

## 1.9 LUNARIA ANNUA

Srebrenka ili jednogodišnja mjesečnica (*Lunaria annua L.*) je biljka iz porodice kupusnjača [80].

### 1.9.1 ETIMOLOGIJA

Latinsko ime roda *Lunaria* potječe od riječi luna (mjesec), zbog srebrne pregrade ljustaka ploda, ali i zbog sjemenki koje su oblika mjeseca, od čega potječu hrvatski nazivi srebrenka te mjesečnica. Ime vrste *annua* znači jednogodišnji. Na engleskom jeziku poznata je i kao *honesty* [80].

### 1.9.2 KARAKTERISTIKE

Stabljika je uspravna, prekrivena dlačicama, jednostavna ili u gornjem dijelu razgranata te može narasti od 30 do 100 centimetara. Listovi su jednostavni, plitko srcoliki, nepravilno nazubljeni, na obje strane hrapavi. Donji listovi su širi i s peteljka, a prema vrhu biljke su manji i sjedeći. Cvjetovi su skupljeni u cvatove na vrhu stabljike, a sastavljeni su od četiri latice. Cvjetovi mogu biti grimizno crvene, ljubičaste ili bijele boje što privlači pčele i leptire. Plodovi su široko eliptične, na obje strane zaobljene komuščice [80-82].

### 1.9.3 KLIMA I STANIŠTE

Poznat je kultivirani oblik koji se može pronaći u vrtovima te samonikla biljka. Može se pronaći na livadama, šumama te neobrađenim poljima. Rasprostranjena je na području jugoistočne Europe, jugozapadne Azije i Sjeverne Amerike. Uzgaja se kao ukrasna biljka kojoj odgovaraju sjenovita i vlažna mjesta, plodno te vlažno tlo [80, 81].

### 1.9.4 UPOTREBA

Srebrenka se posebno cijeni u suhim aranžiranjima. Prokuhani korijen biljke je jestiv, a vadi se u proljeće prije nego što se razviju cvjetovi. Nezreli plodovi se mogu usitniti te koristiti kao začin, a sjemenke sadrže 1% alkaloida [80].

## 1.9.5 SPOJEVI

### 1.9.5.1 NERVONSKA KISELINA

Nervonska kiselina (24:1 $\Delta$ 15 cis-tetrakos-15-enoinska kiselina) dugolančana je mononezasićena omega-9 masna kiselina (*Slika 9*) [83]. Pronađena je u uljima sjemena nekoliko poznatih biljaka, prvenstveno porodice *Brassicaceae*, uključujući biljku *Lunaria annua*. Sjeme sadrži 30–35% ulja, koje se sastoji od 67% masnih kiselina dugog lanca (44% eručne kiseline, C22: 1 i 23% nervonske kiseline, C24: 1) [84]. Nervonska kiselina je široko rasprostranjena u živčanom tkivu kralježnjaka gdje je amidnom vezom vezana za sfingozin [85]. Nervonil sfingolipidi su najzastupljeniji u bijeloj tvari mozga i u mijelinskoj ovojnici mijelinskih živčanih vlakana sisavaca [86]. Ulja bogata nervonskom kiselinom postala su zanimljiva farmaceutskoj industriji zbog primjene povezane s liječenjem mnogih neuroloških poremećaja, uključujući multiplu sklerozu, kod kojih dolazi do smanjenja razine nervonske kiseline u sfingolipidima zbog procesa demijelinizacije [87]. Postoje izolirana izvješća o promijenjenoj razini nervonske kiseline u krvi ili tkivu kod ljudi s različitim mentalnim bolestima, uključujući izvještaje o shizofreniji i poremećaju nedostatka pažnje [88, 89]. Također, može imati preventivne učinke na čimbenike koronarnog rizika koji su vezani za metaboličke poremećaje povezane s pretilošću [90, 91]. Provedena su istraživanja koja su proučavala o dozi ovisnu inhibiciju reverzne transkriptaze virusa humane imunodeficijencije-1 nervonskom kiselinom [92]. Pokazano je kako dojena djeca imaju veću razinu nervonske kiseline u eritrocitima u odnosu na djecu koja nisu dojena pa određeni znanstvenici zagovaraju da se, u formulama za hranjenje djece, količina nervonske kiseline treba povećati [93]. Mljekarska industrija iskazuje zanimanje za ulja koja imaju visoku koncentraciju nervonske kiseline, točnije, postoje prijave kako bi se dobili patentni za upotrebu ulja koje sadrži nervonsku kiselinu prilikom hranidbe stoke u svrhu poboljšanja prehrane i zdravstvene koristi mlijeka za prehranu ljudi [94].



*Slika 9.* Nervonska kiselina.

Preuzeto s: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nervonic-acid#section=Structures>

### 1.9.5.2 GLUKOZINOLATI

*Lunaria annua* sadrži 12 glukozinolata, među kojima su: glucoalizin, glukohesperin, glukoputranjivin, glukobrassicinapin (Slika 10) i heks-5-enil glukozinolati [95].

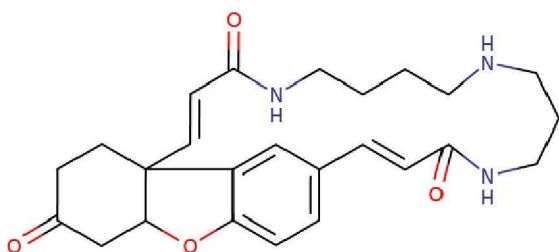


Slika 10. Kemijska struktura glukobrassicinapina.

Preuzeto s: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glucobrassicinapin#section=2D-Structure>

### 1.9.5.3 ALKALOIDI

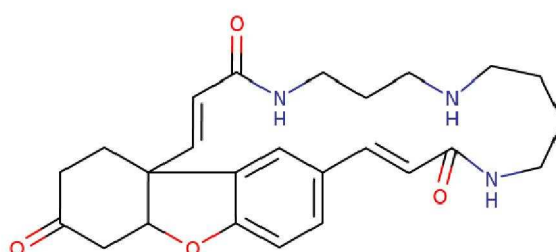
Lunarin i lunaridin su makrociklički alkaloidi pronađeni kod biljne vrste *Lunaria annua*. Lunarin je sastavljen od lanca spermidina, a krajnji atomi dušika formiraju amidne veze s dvije  $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasićene karboksilne kiseline povezane tricikličkim prstenom (Slika 11) [96, 97]. Lunarin je kompetitivni inhibitor tripanotionske reduktaze, enzima koji je postao obećavajući cilj prilikom dizajna lijekova protiv tropskih parazitskih bolesti [96, 98, 99]. Za lunaridin se smatra da sudjeluje u obrani biljke od insekata (Slika 12) [100].



Slika 11. Lunarin.

Preuzeto s:

<https://toxnet.nlm.nih.gov/>



Slika 12. Lunaridin.

Preuzeto s:

<https://toxnet.nlm.nih.gov/>

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## 2.1 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je ispitati imaju li hlapljivi spojevi izolirani iz sjemena biljne vrste *Lunaria annua* (uzorci Clevenger destilat, ekstrakt i mikrovalni ekstrakt) citotoksično djelovanje na različite humane karcinomske stanice. Potencijalni citotoksični učinak na stanične linije humanih karcinoma ispitivat će se na staničnim linijama karcinoma dojke MDA-MB-231 te karcinoma pluća A549.



## **2.2 HIPOTEZA**

Hlapljivi spojevi izolirani iz sjemena *Lunaria annua* (uzorci Clevenger destilat, ekstrakt i mikrovalni ekstrakt) imaju citotoksično djelovanje na ispitivane stanične linije humanih karcinoma: MDA-MB-231 te A549.

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

### 3.1 STANIČNE LINIJE

*In vitro* istraživanje ispitivanja djelovanja hlapljivih spojeva izoliranih iz sjemena biljne vrste *Lunaria annua* (uzorci Clevenger destilat, ekstrakt i mikrovalni ekstrakt) provodilo se na staničnim linijama humanih karcinoma MDA-MB-231 te A549. Obilježja tih staničnih linija prikazana su u tablicama.

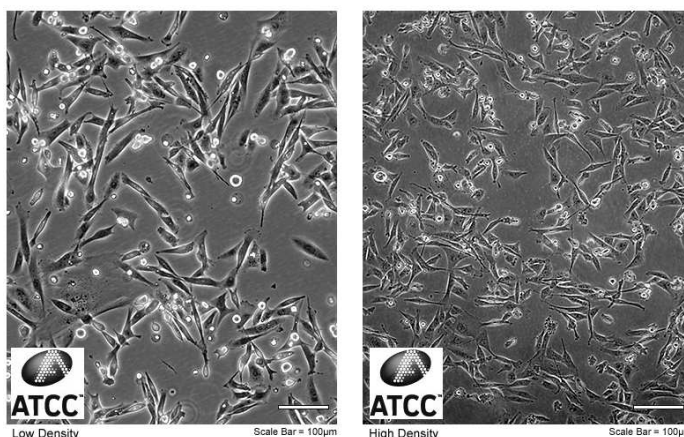
#### 3.1.1 MDA-MB-231

Tablica 2. Obilježja MDA-MB-231 stanične linije.

Podaci preuzeti s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/>

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Tkivo</b>	Dojka
<b>Stanični tip</b>	Epitelna
<b>Forma proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Obilježje kulture</b>	Adherentna
<b>Bolest</b>	Adenokarcinom
<b>Dob</b>	51 godina
<b>Spol</b>	Ženski
<b>Etnitet</b>	Bijeli
<b>Uvjeti pohrane</b>	Tekući dušik

ATCC Number: **HTB-26**™  
Designation: **MDA-MB-231**



Slika 13. Stanice karcinomske linije MDA-MB-231.

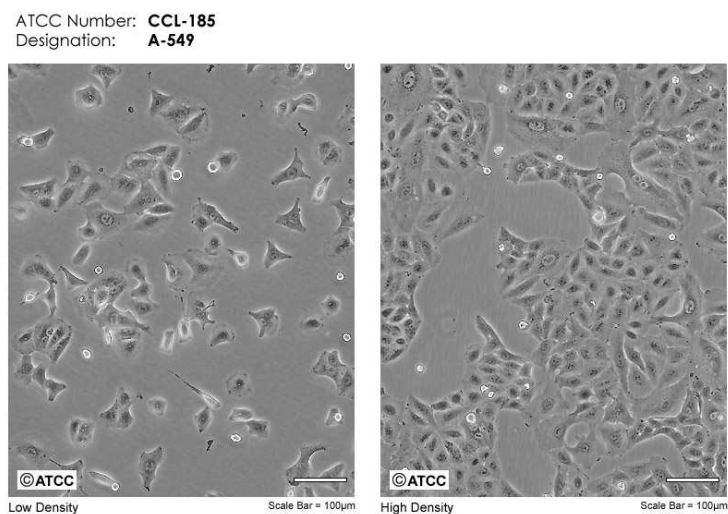
Slika preuzeta s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/>

3.1.2 A549

Tablica 3. Obilježja A549 stanične linije.

Podaci preuzeti s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/>

<b>Organizam</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>Tkivo</b>	Pluća
<b>Stanični tip</b>	Epitelna
<b>Forma proizvoda</b>	Smrznuto
<b>Morfologija</b>	Epitelna
<b>Obilježje kulture</b>	Adherentna
<b>Bolest</b>	Karcinom
<b>Dob</b>	58 godina
<b>Spol</b>	Muški
<b>Etnitet</b>	Bijeli
<b>Uvjeti pohrane</b>	Tekući dušik



Slika 14. Stanice karcinomske linije A549.

Slika preuzeta s: <https://www.lgcstandards-atcc.org/>

## 3.2 POSTUPAK

### 3.2.1 STANIČNA KULTURA

Kako bismo spriječili kontaminaciju staničnih kultura, postupak uzgoja stanica provodili smo u laboratoriju koji ima osigurane kabinete za sterilan rad uz laminarni protok zraka. Sav pribor, posuđe te korišteni reagensi moraju biti sterilni kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka, a što može utjecati na same rezultate pokusa.

Adherentne stanične linije su, nakon odmrzavanja, uzgojene u DMEM mediju, u inkubatoru, pri temperaturi od 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub> te visoku vlažnost zraka. Za održavanje adherentnih staničnih linija MDA-MB-231 i A549 koristio se DMEM medij uz dodatak 10% temperaturno inaktiviranog FBS-a koji sadrži čimbenike rasta te 1% penicilina/streptomicina kao antibiotika [101]. DMEM medij sadrži svu potrebnu hranu za stanice, kao što su ugljikohidrati, minerali, vitamini te aminokiseline. Sadrži i indikator, fenolno crvenilo, koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti. Nakon što je dodan DMEM medij, pločice sa stanicama ostavljene su preko noći za prihvatanje na podlogu.

Kako bismo uklonili zaostali DMEM medij, stanične linije ispiru se s PBS-om. Zatim se stanice koje su adherirale na podlogu tretiraju s 0,25% tripsinom. Tripsin je enzim iz obitelji serinskih proteaza, koji može specifično hidrolizirati karboksiterminalne peptidne veze argininskih ili lizinskih ostataka [102]. Tripsin proteaznom aktivnošću omogućava cijepanje peptidnih veza te odvajanje stanica od stanica, kao i odvajanje stanica od podloge na kojoj rastu. Nakon što smo tripsin ostavili da djeluje par minuta, inaktiviramo ga dodatkom svježeg medija, u kojemu se stanice resuspendiraju.

### 3.2.2 ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH (VIJABILNIH) STANICA U KULTURI

Za određivanje broja stanica koristi se Bürker - Türkova komorica (*Slika 15*). Kako bismo mogli izbrojati stanice, u jažice se prenese 10 µL resuspendiranih stanica. Potom se dodaje 90 µL tripan plavila (Trypan Blue). Utvrđeno je da je integritet stanične membrane osnovni kriterij za razlikovanje mrtvih od živih stanica [103]. Žive stanice, kojima je stanična membrana neoštećena, vrlo su selektivne i ne dopuštaju ulazak boje kroz membranu u stanicu pa ostaju neobojene. Mrtve stanice zbog oštećene membrane poprimaju plavo obojenje koje se vidi pod mikroskopom [104]. Stoga su mrtve stanice plavo obojene, što nam omogućava

brojanje živih stanica koje, pak, nisu obojene. Staničnu suspenziju s bojom nanosimo na Bürker-Türkovu komoricu i pod mikroskopom brojimo žive stanice. Žive stanice prebrojavaju se unutar pet kvadratića te se ukupan broj vijabilnih stanica zatim određuje prema formuli:

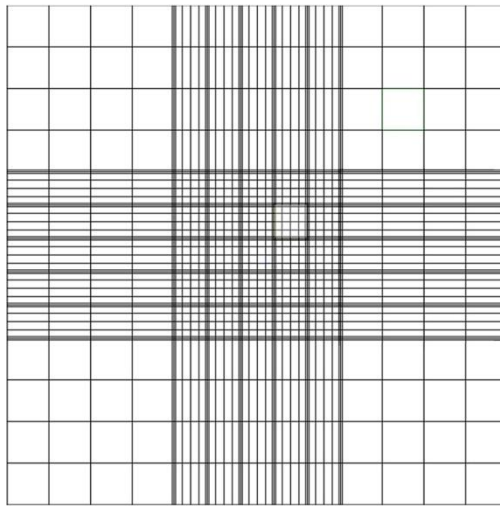
$$R = N \times 10 \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

gdje je:

R - ukupan broj vijabilnih stanica

N - broj živih stanica određen u Bürker - Türkovoj komorici

10 - faktor razrjeđenja



*Slika 15.* Bürker - Türkova komorica

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

### 3.2.3. TRETIRANJE STANICA KARCINOMA OTOPINAMA SJEMENA *LUNARIA ANNUA*

Jednak broj stanica presađuje se u kalup od 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 uzoraka sjemena *Lunaria annua* (Clevenger destilat, ekstrakt i mikrovalni ekstrakt) u koncentracijama 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice koje predstavljaju kontrolu su ostavljene u samom mediju te u njih nisu dodane otopine uzoraka sjemena *Lunaria annua*.

### 3.3 TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Različiti tetrazolijski spojevi koriste se za opažanje živih stanica. Najčešće korišteni spojevi su: MTT, MTS, WST-1 i XTT. Spadaju u dvije osnovne kategorije:

- MTT koji je pozitivno nabijen i lako prodire u žive eukariotske stanice
- MTS, XTT i WST-1 koji su negativno nabijeni i ne prolaze lako u stanice [105].

MTT kolorimetrijska metoda za procjenu citotoksičnosti i proliferacije temelji se na promatranju stanične metaboličke aktivnosti kao mjere stanične živosti [106, 107]. MTT test izvodi se dodavanjem otopine MTT soli u jažice sa stanicama. Žuta tetrazolijeva sol, MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) se reducira u formazan, koji se u stanicama nakuplja u obliku kristala [107, 108]. Redukcija se odvija u mitohondrijima živih stanica pomoću mitohondrijske dehidrogenaze [109]. Mehanizam redukcije MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH koji prenosi elektrone do MTT-a [105]. Rezultirajući intracelularni formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski, za svaku jažicu posebno, uključujući i jažice s kontrolnom skupinom u kojima očekujemo najviši stupanj obojenja, kao i najveću apsorbanciju [110]. Da bi se mogla očitati apsorbancija novonastalih kristala formazana na 570 nm, potrebno ih je otopiti. Dodatkom DMSO-a kao otapala, kristali se otapaju dajući ljubičasto obojenu otopinu [106]. Pločice su inkubirane 10 min na 37°C uz treskanje. Intenzitet obojenja, odnosno, količina formazana, proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica u uzorku [105].

Dakle, MTT testom određuje se postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja jednom od uzoraka biljke jer žive, metabolički aktivne stanice mogu pretvoriti MTT u formazan. Suprotno tome, mrtve, metabolički neaktivne stanice, gube sposobnost pretvorbe MTT.

Omjer apsorbancije stanica tretiranih otopinama Clevenger destilata, ekstrakta i mikrovalnog ekstrakta biljne vrste *Lunaria annua*, te apsorbancije onih koje nisu tretirane, pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih uzoraka sjemena *Lunaria annua*.

### **3.4 STATISTIČKA ANALIZA**

Izmjerene su apsorbancije kontrolnih (stanice humanih karcinoma u mediju) te ispitivanih skupina (Clevenger destilat, mikrovalni ekstrakt te ekstrakt srebrenke sa staničnim linijama humanih karcinoma). Potom su izračunate srednje vrijednosti apsorbancija kontrolnih i ispitivanih skupina nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Također, izračunate su vrijednosti omjera između srednjih vrijednosti ispitivanih i kontrolnih skupina za svaku koncentraciju Clevenger destilata, mikrovalnog ekstrakta te ekstrakta nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Rezultati su prikazani grafički, a izračunati su u programu GraphPad Prism 7.



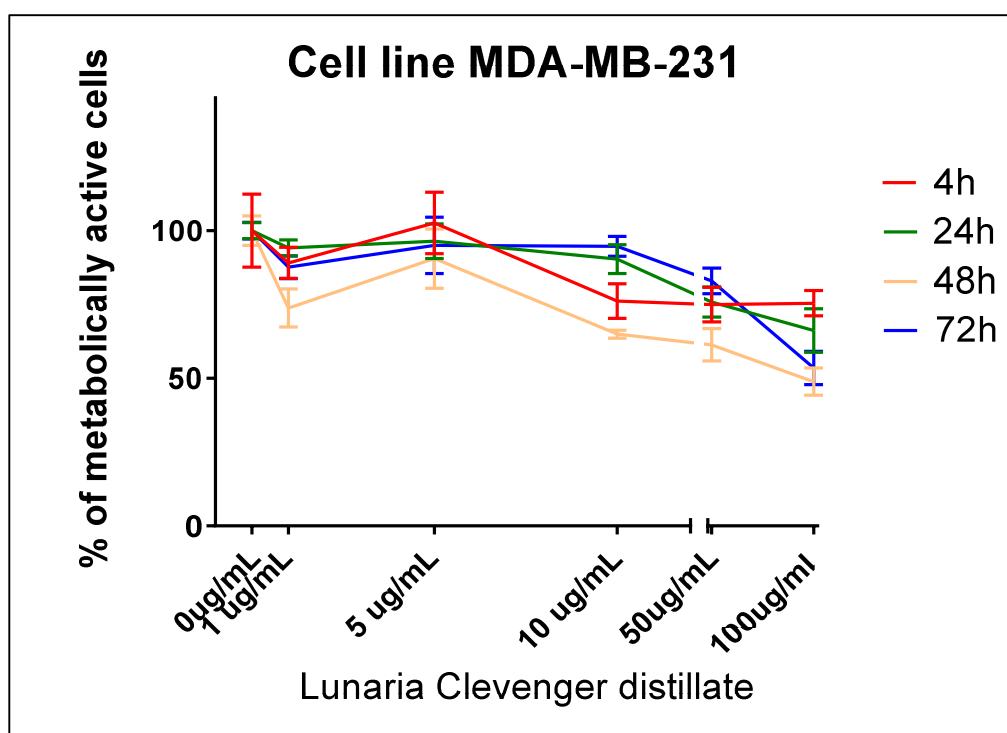
## **4. REZULTATI**

## Empirijska obrada:

Kao ograničenje istraživanja uzima se premala serija podataka.

### 4.1 MDA-MB-231

#### 4.1.1 LUNARIA ANNUA CLEVINGER DESTILAT

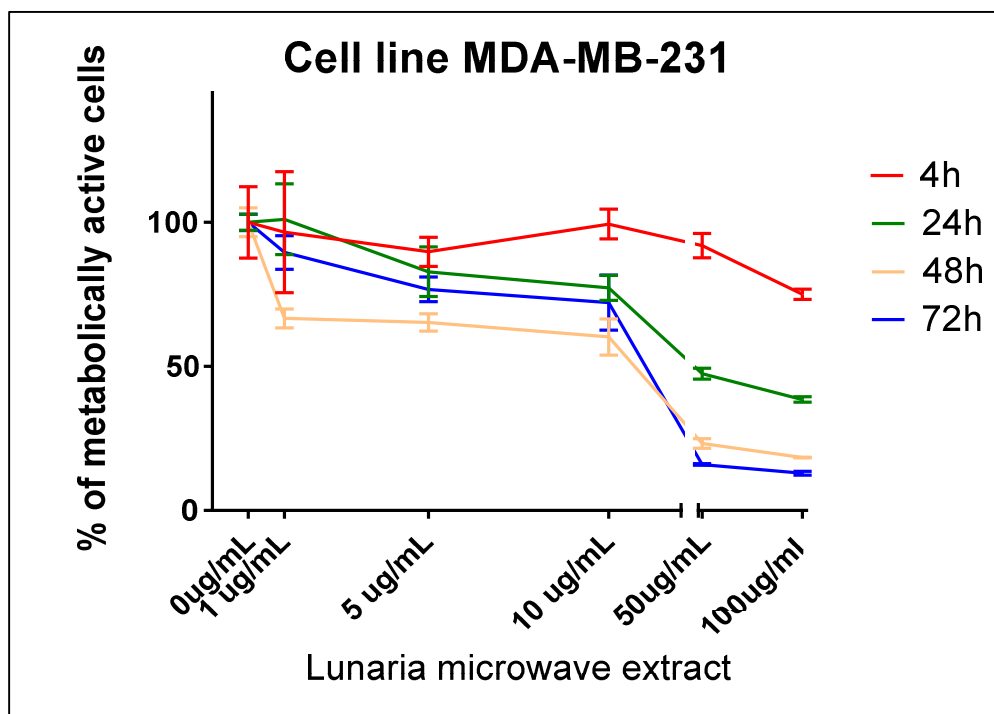


MDA-MB-231	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	67.44	Not determined

Slika 16. Clevenger destilat *Lunaria annua*.

Pri svakoj od koncentracija vidi se pozitivan učinak Clevenger destilata *Lunaria annuae* u promatranom vremenu. Iz dobivenog skupa podataka može se pretpostaviti obrnuto proporcionalna ovisnost koncentracije i postotka aktivnih stanica gdje je, pri što većoj koncentraciji, broj aktivnih stanica sve manji. Najbolji učinak očitavamo pri koncentraciji od 100 ug/mL, nakon 48 sati inkubacije, gdje se broj aktivnih stanica skoro prepolovi. Ni jedna od ispitanih koncentracija ne zadržava učinak kroz vrijeme, to jest pri svakoj od koncentracija nailazimo na minimum nakon kojega se broj aktivnih stanica ponovno povećava.

#### 4.1.2 LUNARIA ANNUA MIKROVALNI EKSTRAKT

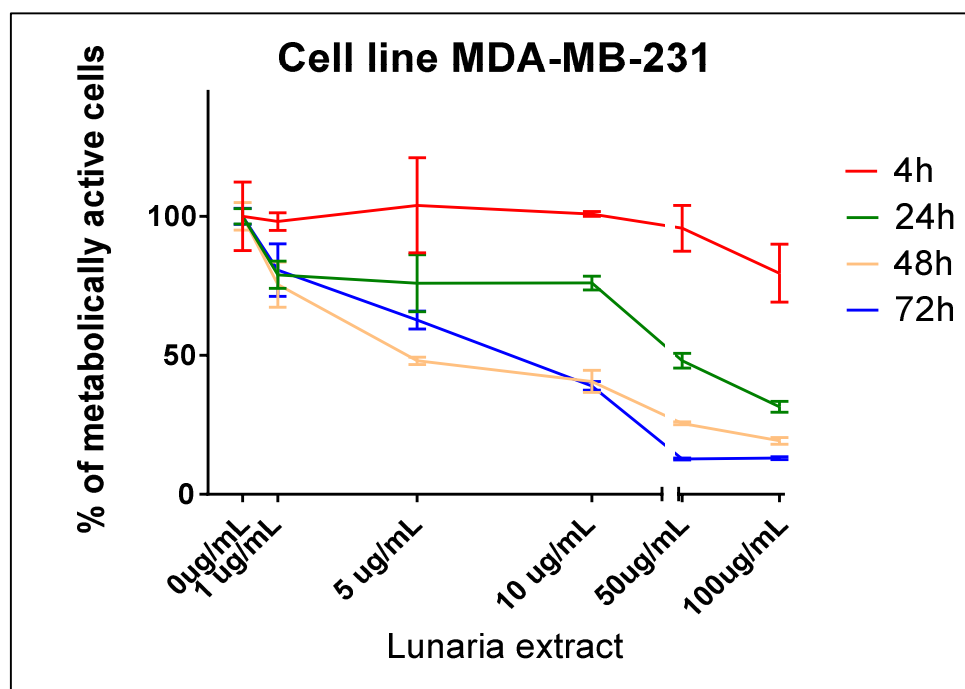


MDA-MB-231	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	46.35	11.8	16.76

Slika 17. Mikrovalni ekstrakt *Lunaria annua*.

Mikrovalni ekstrakt *Lunaria annuae* postiže odlične rezultate pri većim koncentracijama gdje je nakon 3 dana broj aktivnih stanica pao na otprilike 20% početnog broja. Pri manjim koncentracijama (<10 ug/mL) vidi se manje izražen kratkoročni pozitivan učinak (nakon 48 sati broj aktivnih stanica ponovno počinje rasti).

#### 4.1.3 LUNARIA ANNUA EKSTRAKT



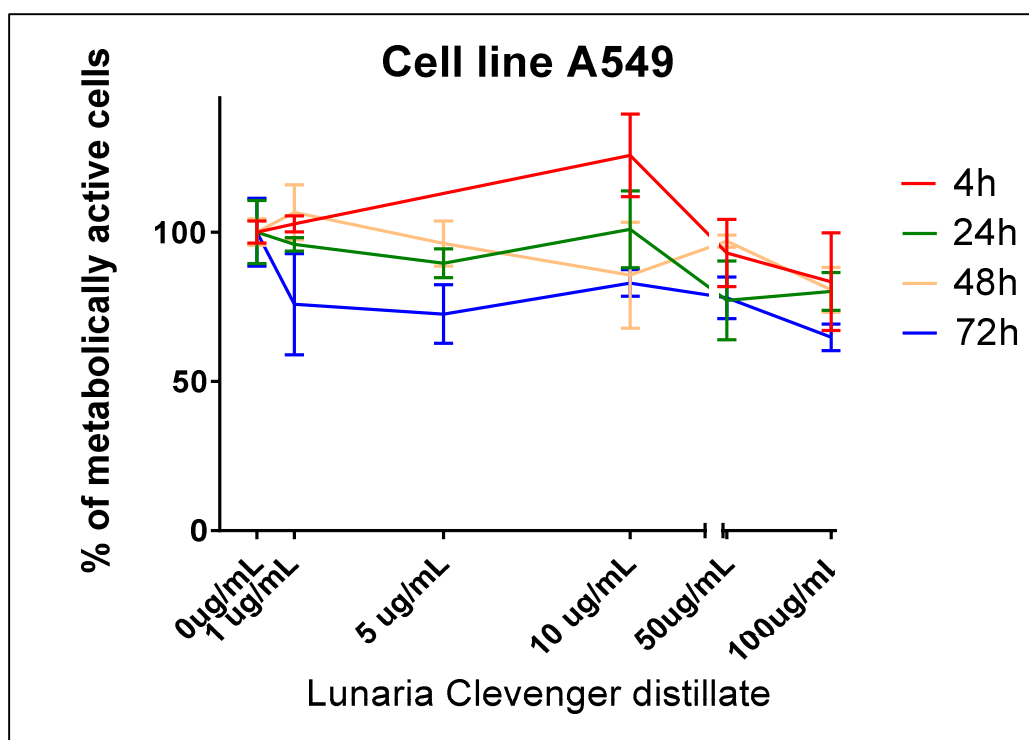
MDA-MB-231	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	37.1	6	7.104

Slika 18. Ekstrakt *Lunaria annua*

Slično kao i kod mikrovalnog ekstrakta, ali s puno snažnijim učinkom, ekstrakt *Lunaria annuae* postiže bolje rezultate pri većim koncentracijama. Nakon 4 sata ni jedna od koncentracija ne daje neki zapaženi rezultat (iznimka 100 ug/mL) što indicira da je potrebno neko vrijeme dok ekstrakt ne počne pozitivno djelovati.

## 4.2 A549

### 4.2.1 LUNARIA ANNUA CLEVINGER DESTILAT

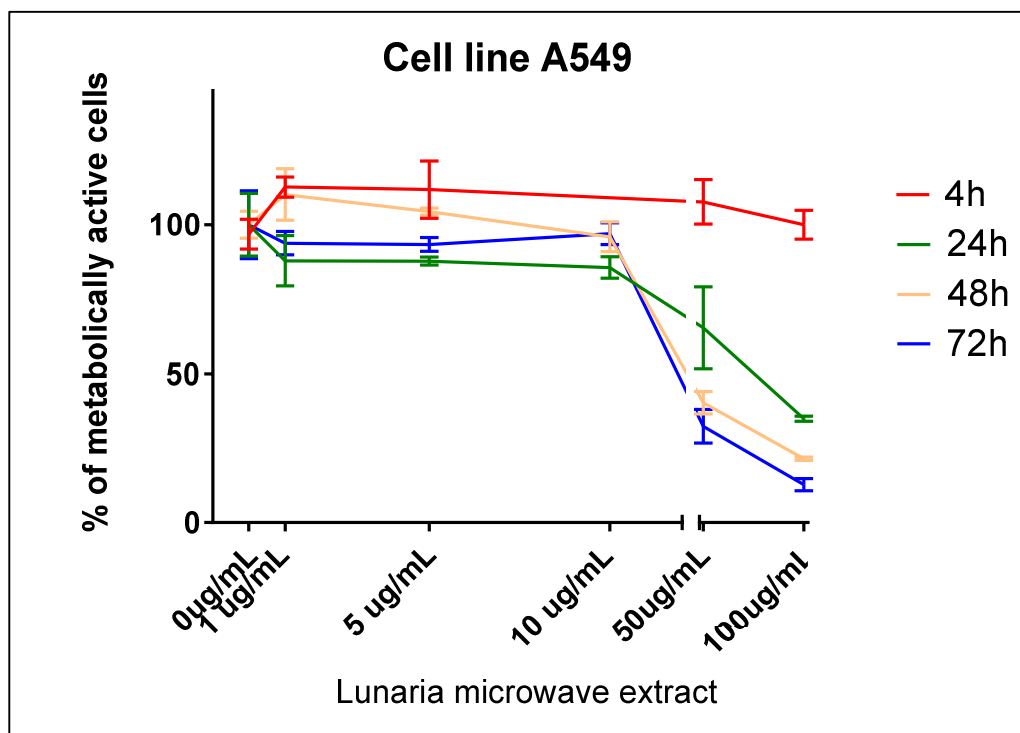


A549	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	Not determined	Not determined	Not determined

Slika 19. Clevenger destilat *Lunaria annua*.

Dugoročno gledano, svaka od koncentracija daje otprilike jednak učinak (broj aktivnih stanica se u 72 sata smanji na oko 75% početne vrijednosti). Nema značajne povezanosti citotoksičnosti s koncentracijom spoja i vremenom inkubacije.

#### 4.2.2 LUNARIA ANNUA MIKROVALNI EKSTRAKT

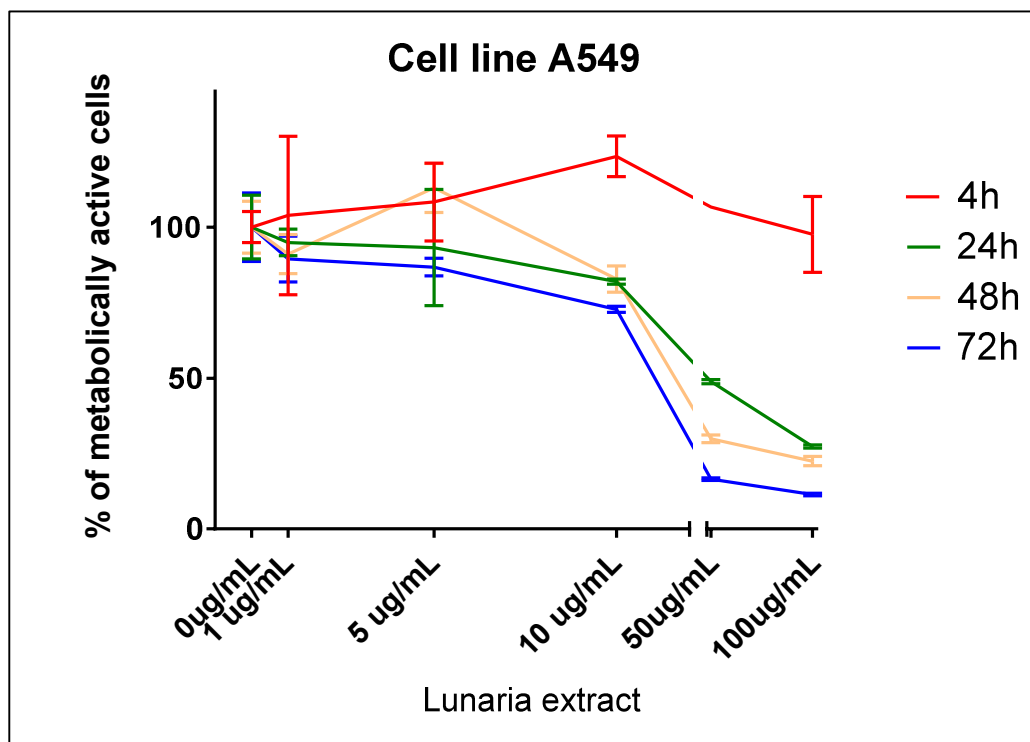


A549	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	67.54	44.59	33.46

Slika 20. Mikrovalni ekstrakt *Lunaria annua*.

Primjenom mikrovalnog ekstrakta *Lunaria annuae*, uočavamo da najbolji citotoksični učinak imaju najveće koncentracije od 50 i 100 ug/mL i to nakon 24, 48 i 72h, uz korelaciju učinka s koncentracijom i vremenom inkubacije.

#### 4.2.3 LUNARIA ANNUA EKSTRAKT



A549	4h	24h	48h	72h
IC50 (ug/mL)	Not determined	44.53	33.2	18.79

Slika 21. Ekstrakt *Lunaria annua*.

Slično kao i kod mikrovalnog ekstrakta, ekstrakt *Lunaria annuae* pri svakoj od ispitanih koncentracija u prva 4 sata nema pozitivnog učinka na broj metabolički aktivnih stanica. Najbolji citotoksični učinak imaju najveće koncentracije od 50 i 100 ug/mL i to nakon 24, 48 i 72h, uz korelaciju učinka s koncentracijom i vremenom inkubacije.

## **5. RASPRAVA**



Rak može nastati zbog poremećaja proliferacije bilo koje vrste stanica u tijelu. Umjesto da na odgovarajući način reagiraju na signale koji kontroliraju ponašanje normalnih stanica, stanice raka nekontrolirano rastu i dijele se, šireći se u normalna tkiva i organe i naposljetku po čitavom tijelu. Karcinomi, na koje otpada otprilike 90% slučajeva raka u ljudi, zloćudne su bolesti epitelnih stanica [2]. Učestalost i smrtnost raka u svijetu brzo rastu, čemu doprinose starenje i rast populacije, kao i čimbenici rizika povezani sa socioekonomskim razvojem [7]. Procijenjeno je da je diljem svijeta u 2018. godini dijagnosticirano 18,1 milijuna novih slučajeva raka, a da je 9,6 milijuna ljudi umrlo zbog raka [111, 112]. Muški spol je u većini slučajeva povezan s povećanim rizikom za razvoj raka te lošijom statistikom preživljenja [113]. Jedan od 5 muškaraca i jedna od 6 žena će razviti rak tijekom svog života, a jedan od 8 muškaraca te jedna od 11 žena će umrijeti od te bolesti [112]. Ključnu ulogu u nastanku raka, osim genetičkih čimbenika, imaju i čimbenici rizika povezani s načinom života. Stoga, veliku važnost ima izbjegavanje ključnih rizičnih čimbenika, uključujući izbjegavanje pušenja cigareta, održavanje normalne tjelesne težine, unos zdravih namirnica, smanjenu konzumaciju alkohola, redovitu tjelovježbu te izbjegavanje izravnog izlaganja suncu [114].

Rak dojke je najčešće dijagnosticiran rak kod žena širom svijeta, a učestalost mu se uglavnom povećava [115]. U 2018. godini bio je drugi najčešći rak na svijetu, s 2,08 milijuna novodijagnosticiranih slučajeva [7]. Smatra se da će jedna od devet žena razviti rak dojke tijekom svog života [116]. U svjetskim razmjerima, rak dojke kod muškaraca je rijedak te čini manje od 1% svih dijagnoza raka dojke. Međutim, kod muškaraca se češće dijagnosticira u naprednijim stadijima (3 ili 4), za razliku od žena. Mala pojavnost među muškarcima, kao i opći nedostatak svijesti, dovode do otkrivanja raka dojke u kasnijim fazama [117]. U Hrvatskoj je od raka dojke u 2016. godini oboljelo 2735 žena, što čini incidenciju od 126,6/100 000 [118]. Rizik od nastanka raka dojke je povezan s dobi, spolom, pozitivnom obiteljskom anamnezom, pretilošću, uzimanjem hormonske nadomjesne terapije ili oralnih kontraceptiva, ranom menarhom, kasnom menopauzom te prvom trudnoćom u dobi nakon 35. godine [119]. U novije vrijeme, razvijeni su različiti pristupi prilikom liječenja raka dojke, kojima se teži individualizaciji terapije. Odabir terapije je u skladu s rezultatima kliničkih i dostupnih molekularnih testova, što povećava mogućnost odgovora na odabranu strategiju liječenja [120].

Rak pluća je u 2018. godini bio je najčešći rak na svijetu, s 2,09 milijuna novodijagnosticiranih slučajeva [7]. U Hrvatskoj je u razdoblju 2001. - 2013. godine došlo do povećanja incidencije raka pluća kod žena te smanjenja incidencije kod muškaraca. Također, u 2016. godini, u Hrvatskoj je od raka traheja, bronha i pluća oboljelo 904 žene, što čini incidenciju od 41,9 /100 000 te 2164 muškarca, što čini incidenciju od 107,4/100 000, a 2012. godine je bila među 20 država s najvećom incidencijom raka pluća na svijetu [118, 121]. Poznati čimbenici rizika za rak pluća uključuju bihevioralne, okolišne i genetske čimbenike rizika, koji imaju ulogu u razvoju tumora i utječu na terapijski odgovor pojedinih pacijenata [44]. Dokazan čimbenik rizika za razvoj raka pluća je izloženost duhanskom dimu, iz okoliša ili pušenjem cigareta, a upravo se pušenje cigareta smatra uzrokom raka pluća u 50% slučajeva kod žena te 80% slučajeva kod muškaraca [121]. Unatoč poboljšanjima u dijagnostici i terapiji u posljednjim desetljećima, prognoza za pacijente s karcinomom pluća još uvijek nije zadovoljavajuća, a petogodišnje preživljenje je i dalje nisko. Odgovor na trenutne terapijske protokole je slab, osim za većinu lokaliziranih karcinoma. Međutim, bolje razumijevanje mehanizama nastanka raka moglo bi dovesti do razvoja učinkovitijih i specifičnijih lijekova [122].

Povrće iz porodice kupusnjača bogato je glukozinolatima, čiji produkti razgradnje, prvenstveno izotiocijanati i indoli, mogu imati kemopreventivna svojstva protiv raka [123]. Kemopreventivni mehanizmi izotiocijanata uključuju promjene na enzimima koji sudjeluju u metabolizmu karcinogena, zaustavljanje staničnog ciklusa, staničnu smrt te inhibiciju angiogeneze, invazije i metastaziranja [123, 124].

Dokazi iz *in vitro* i *in vivo* studija upućuju na to da izotiocijanati i indoli mogu spriječiti razvoj karcinoma dojke modulirajući aktivnost enzima faze I i II, inhibirajući staničnu proliferaciju, regulirajući ekspresiju receptora za estrogen, mijenjajući metabolizam estrogena ili suprimirajući djelovanje ciklooksigenaze 2 [125]. Neka istraživanja su izvjestila o recipročnoj povezanosti između unosa povrća iz porodice kupusnjača i rizika od razvoja karcinoma dojke, međutim, rezultati nisu dosljedni [126, 127].

Postoji hipoteza da povrće iz porodice kupusnjača ima antikancerogena svojstva koja mogu pridonijeti smanjenom riziku od raka pluća [128, 129]. Dokazi iz istraživanja na životinjama upućuju na to da izotiocijanati ometaju razvoj raka pluća uglavnom putem inhibicije bioaktivacije prokarcinogena koji se nalaze u duhanskom dimu, poput PAH [128,

130]. Međutim, epidemiološke studije kojima se procjenjuje povezanost između unosa povrća iz porodice krstašica i rizika od razvoja raka pluća nemaju dosljedne rezultate [130].

*Lunaria Annu*a je biljna vrsta iz porodice krstašica čiji je potencijal u liječenju i prevenciji humanih karcinoma prilično neistražen [131]. Sadrži 12 glukozinolata, među kojima se ističu glukoalizin, glukohesperin, glukoputranjivin, glukobrassicinapin i heks-5-enil glukozinolat [95]. Osim ovih spojeva, srebrenka sadrži i nervonsku kiselinu, čije je djelovanje u posljednje vrijeme predmetom interesa farmaceutske industrije, te alkaloida lunarin i lunaridin [84, 97].

Kao predmet našeg istraživanja korišteni su hlapljivi spojevi izolirani iz sjemena biljne vrste *Lunaria annua*, odnosno, promatran je njihov citotoksični učinak na dvije stanične linije humanih karcinoma: dojke (MDA-MB-231) te pluća (A549).

Utjecaj na stanice karcinoma dojke MDA-MB-231 svih korištenih uzoraka (Clevenger destilat, mikrovalni ekstrakt i ekstrakt) je značajniji pri većim koncentracijama, od 50 µg/mL i 100 µg/mL. Najveći citotoksični učinak imaju uzorci mikrovalni ekstrakt i ekstrakt pri koncentraciji od 100 µg/mL, nakon 72h inkubacije.

*In vitro* istraživanje na stanicama karcinoma pluća A549 pokazalo je da svi uzorci (Clevenger destilat, mikrovalni ekstrakt i ekstrakt) imaju određeni učinak na smanjenje postotka metabolički aktivnih stanica, također pri višim koncentracijama. Najznačajniji učinak imaju uzorci mikrovalni ekstrakt i ekstrakt pri koncentraciji od 100 µg/mL, nakon 72h inkubacije.

Na temelju dobivenih rezultata, vidljivo je da biljna vrsta *Lunaria Annu*a ima potencijal za liječenje različitih bolesti, a osobito su važna njena kemoprotektivna i antitumorska svojstva, koja smo u našem *in vitro* ispitivanju pokazali na stanicama karcinoma dojke i pluća. Postotak smanjenja metabolički aktivnih stanica, tj. citotoksični učinak ovisi o koncentraciji ispitivanih uzoraka, odnosno spojeva, 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 dojke (MDA-MB-231) i pluća (A549) hlapljivim spojevima izoliranih iz sjemena biljne vrste *Lunaria annua* 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 sjemena *Lunaria annua*, 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.

## **7. LITERATURA**

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. p. 149-150.
2. Cooper MG, Hausman RE. Rak. U: Gordan Lauc, ur. Stanica. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. p. 725-726.
3. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. p. 3-10.
4. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Epidemiologija raka. U: Raič A, ur. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. p. 20-22.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
6. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Datum pristupa: 12.6.2019.
7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
8. Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int J Cancer*. 2016;139(11):2436-46.
9. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2012 ;13(8):790-801.
10. Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Šelendić Đ, Lončar J, Čukelj P. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018.
11. Sathwara JA, Balasubramaniam G, Bobdey SC, Jain A, Saoba S. Sociodemographic Factors and Late-stage Diagnosis of Breast Cancer in India: A Hospital-based Study. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2017;38(3):277-281.

12. Jerusalem G, Lancellotti P, Kim SB. HER2+ breast cancer treatment and cardiotoxicity: monitoring and management. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;177(2):237-250.
13. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, ur. *Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. p. 203-213.
14. Hunter CP. Epidemiology, stage at diagnosis, and tumor biology of breast carcinoma in multiracial and multiethnic populations. *Cancer.* 2000;88(5 Suppl):1193-202.
15. Unlu O, Kiyak D, Caka C, Yagmur M, Yavas HG, Erdogan F et al. Risk factors and histopathological features of breast cancer among women with different menopausal status and age at diagnosis. *J BUON.* 2017;22(1):184-191.
16. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;151:1-32.
17. Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates Surg.* 2017;69(3):313-317.
18. Al-Amri AM. Clinical presentation and causes of the delayed diagnosis of breast cancer in patients with pregnancy associated breast cancer. *J Family Community Med.* 2015;22(2):96–100.
19. Irvin W, Muss HB, Mayer DK. Symptom management in metastatic breast cancer. *Oncologist.* 2011; 16(9): 1203–1214.
20. Robertson FM, Bondy M, Yang W, Yamauchi H, Wiggins S, Kamrudin S et al. Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(6):351–375.
21. Løberg M, Lousdal ML, Bretthauer M, Kalager M. Benefits and harms of mammography screening. *Breast Cancer Res.* 2015;17:63.
22. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Prevencija i rana dijagnostika zloćudnih tumora. U: Raič A, ur. *Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izd.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018. p. 27.



23. Loomans-Kropp HA, Umar A. Cancer prevention and screening: the next step in the era of precision medicine. *NPJ Precis Oncol.* 2019; 3: 3.
24. Šašková P, Pavlišta D. Breast self-examination. Yes or no? *Ceska Gynecol.* Winter 2016;81(6):463-469.
25. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti dojke: Tumori dojke. U: Raič A, ur. *Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd.* Zagreb: Medicinska naklada; 2017. p. 645-656.
26. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA.* 2019;321(3):288-300.
27. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet.* 2017;389(10074):1134-1150.
28. Kvesić A. i sur. *Plastična rekonstrukcijska i estetska kirurgija. Kirurgija.* Zagreb: Medicinska naklada, 2006. p. 844-845.
29. Bellini E, Pesce M, Santi P, Raposio E. Two-Stage Tissue-Expander Breast Reconstruction: A Focus on the Surgical Technique. *Biomed Res Int.* 2017; 1791546.
30. Jonczyk MM, Jean J, Graham R, Chatterjee A. Trending Towards Safer Breast Cancer Surgeries? Examining Acute Complication Rates from A 13-Year NSQIP Analysis. *Cancers (Basel).* 2019;11(2).
31. <https://www.uptodate.com/contents/adjuvant-chemotherapy-for-her2-negative-breast-cancer> Datum pristupa: 24.7. 2019.
32. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;366(9503):2087-106.
33. Awan A, Esfahani K. Endocrine therapy for breast cancer in the primary care setting. *Curr Oncol.* 2018;25(4):285-291.
34. Pinkerton JV, Conner EA. Beyond estrogen: advances in tissue selective estrogen complexes and selective estrogen receptor modulators. *Climacteric.* 2019;22(2):140-147.

35. Fleming CA, Heneghan HM, O'Brien D, McCartan DP, McDermott EW, Prichard RS. Meta-analysis of the cumulative risk of endometrial malignancy and systematic review of endometrial surveillance in extended tamoxifen therapy. *Br J Surg*. 2018;105(9):1098-1106.
36. <https://www.esmo.org/content/download/65113/1174049/file/ESMO-HR-Rak-Dojke-Vodic-za-Pacijente.pdf> Datum pristupa: 11.8.2019.
37. Cheng TY, Cramb SM, Baade PD, Youlten DR, Nwogu C, Reid ME. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1653-71.
38. Ridge CA, McErlean AM, Ginsberg MS. Epidemiology of Lung Cancer. *Semin Intervent Radiol*. 2013; 30(2): 93–98.
39. Didkowska J, Wojciechowska U, Mańczuk M, Łobaszewski J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med*. 2016; 4(8): 150.
40. Di X, Jin X, Ma H, Wang R, Cong S, Tian C et al. The Oncogene IARS2 Promotes Non-small Cell Lung Cancer Tumorigenesis by Activating the AKT/MTOR Pathway. *Front Oncol*. 2019; 9: 393.
41. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Tumori dišnoga sustava i sredoprsta. U: Raič A, ur. *Klinička onkologija*. 3. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. p. 124-131.
42. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*. 2016;893:1-19.
43. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health*. 2019;85(1).
44. de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2018; 7(3): 220–233.
45. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers*. 2018; 10:248.

46. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* 2011; 32(4).
47. Ryan BM. Lung cancer health disparities. *Carcinogenesis.* 2018; 39(6): 741–751.
48. Wang A, Kubo J, Luo J, Desai M, Hedlin H, Henderson M et al. Active and passive smoking in relation to lung cancer incidence in the Women's Health Initiative Observational Study prospective cohort. *Ann Oncol.* 2015; 26(1): 221–230.
49. Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016;25(3):439-45.
50. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Bolesti dišnog sustava: Tumori pluća. U: Raič A, ur. *Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd.* Zagreb: Medicinska naklada; 2017. p. 413-414.
51. Oser MG, Niederst MJ, Sequist LV, Engelman JA. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol.* 2015; 16(4): e165–e172.
52. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open biology.* 2017;7(9):170070.
53. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016; 5(3): 288–300.
54. <https://www.cochrane.org/hr/CD010383/prva-linija-lijecenja-uznapredovalog-karcinoma-pluca-ne-malih-stanica-koji-je-egfr-pozitivan> Datum pristupa: 11.8.2019.
55. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lorviqua> Datum pristupa: 11.8.2019.
56. Barnes H, See K, Barnett S, Manser R. Surgery for limited-stage small-cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;4:CD011917.
57. Alvarado-Luna G, Morales-Espinosa D. Treatment for small cell lung cancer, where are we now?—a review. *Transl Lung Cancer Res.* 2016; 5(1): 26–38.

58. Koinis F, Kotsakis A, Georgoulas V. Small cell lung cancer (SCLC): no treatment advances in recent years. *Transl Lung Cancer Res.* 2016; 5(1): 39–50. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.03.
59. Crona DJ, Faso A, Nishijima TF, McGraw KA, Galsky MD, Milowsky MI. A Systematic Review of Strategies to Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Oncologist.* 2017; 22(5):609-619.
60. Vitezić D. Lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti. U: Raič A, ur. *Temeljna i klinička farmakologija.* 11. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. p. 951.
61. Yin X, Yan D, Qiu M, Huang L, Yan SX. Prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2019;19(1):95.
62. Rossi A, Di Maio M, Chiodini P, Rudd RM, Okamoto H, Skarlos DV et al. Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: the COCIS meta-analysis of individual patient data. *J Clin Oncol.* 2012;30(14):1692-8.
63. Calles A, Aguado G, Sandoval C, Álvarez R. The role of immunotherapy in small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol.* 2019;21(8):961-976.
64. Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Matsubara H, Takabe K. Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World J Gastrointest Oncol.* 2015;7(4):17-29.
65. <https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae> Datum pristupa: 26.7.2019.
66. Sharma A, Li X, and Lim YP. Comparative genomics of Brassicaceae crops. *Breed Sci.* 2014; 64(1): 3–13.
67. Barba FJ, Nikmaram N, Roohinejad S, Khelifa A, Zhenzhou Z, Koubaa M. Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: impact of processing. *Front Nutr.* 2016; 3: 24.
68. Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed Sci.* 2014; 64(1): 48–59.
69. Cartea ME, Velasco P. Glucosinolates in Brassica foods: Bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews;* 7(2): 213-229.

70. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/glucosinolate>

Datum pristupa: 28.7.2019.

71. Kim HJ, Lee MJ, Jeong MH, Kim JE. Identification and Quantification of Glucosinolates in Kimchi by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2017; 8.

72. Vaughn SF, Berhow MA. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products*. 2005;21(2):193–202.

73. Navarro SL, Li F, Lampe JW. Mechanisms of Action of Isothiocyanates in Cancer Chemoprevention: An Update. *Food Funct*. 2011; 2(10): 579–587.

74. Dinkova-Kostova AT, Fahey JW, Wade KL, Jenkins SN, Shapiro TA, Fuchs EJ et al. Induction of the phase 2 response in mouse and human skin by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(4):847-51.

75. Arumugam A, Razis AFA. Apoptosis as a Mechanism of the Cancer Chemopreventive Activity of Glucosinolates: a Review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018; 19(6): 1439–1448.

76. Zhang Y, Munday R, Jobson HE, Munday CM, Lister C, Wilson P et al. Induction of GST and NQO1 in cultured bladder cells and in the urinary bladders of rats by an extract of broccoli (*Brassica oleracea italica*) sprouts. *J Agric Food Chem*. 2006;54(25):9370-6.

77. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates>

Datum pristupa: 28.7.2019.

78. Myzak MC, Dashwood WM, Orner GA, Ho E, Dashwood RH. Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in *Apc<sup>min</sup>* mice. *FASEB J*. 2006; 20(3): 506–508.

79. Xiao D, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate inhibits angiogenesis in vitro and ex vivo. *Cancer Res*. 2007;67(5):2239-46.

80. <https://www.plantea.com.hr/srebrenka/> Datum pristupa: 28.7.2019.

81. Mosti S, Friedman RC, Piccolin F, Di Falco P, Papini A. The unusual tegumental tissues of the *Lunaria annua* (Brassicaceae) seed: A developmental study using light and electron microscopy. *Flora*, 207 (2012), pp. 828-837.

82. <https://www.britannica.com/plant/honesty> Datum pristupa: 28.7.2019.
83. Kageyama Y, Kasahara T, Nakamura T, Hattori K, Deguchi Y, Tani M et al. Plasma nervonic acid is a potential biomarker for major depressive disorder: a pilot study. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018; 21(3): 207–215.
84. Mastebroek HD, Marvin HJP. Breeding prospects of *Lunaria annua* L. *Ind Crop Prod.* 11 (2000), pp. 139-143.
85. Taylor DC, Francis T, Guo Y, Brost JM, Katavic V, Mietkiewska E. Molecular cloning and characterization of a KCS gene from *Cardamine graeca* and its heterologous expression in *Brassica* oilseeds to engineer high nervonic acid oils for potential medical and industrial use. *Plant Biotechnol J.* 2009;7(9):925-38.
86. Martínez M, Mougán I. Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development. *J. Neurochem.* 1998;71(6):2528-33.
87. Sargent JR, Coupland K, Wilson R. Nervonic acid and demyelinating disease. *Med Hypotheses.* 1994;42(4):237-42.
88. Assies J, Lieverse R, Vreken P, Wanders RJ, Dingemans PM, Linszen DH. Significantly reduced docosahexaenoic and docosapentaenoic acid concentrations in erythrocyte membranes from schizophrenic patients compared with a carefully matched control group. *Biol. Psychiatry.* 2001;49(6):510-22.
89. Chen JR, Hsu SF, Hsu CD, Hwang LH, Yang SC. Dietary patterns and blood fatty acid composition in children with attention-deficit hyperactivity disorder in Taiwan. *J Nutr Biochem.* 2004;15(8):467-72.
90. Oda E, Hatada K, Kimura J, Aizawa Y, Thanikachalam PV, Watanabe K. Relationships between serum unsaturated fatty acids and coronary risk factors: negative relations between nervonic acid and obesity-related risk factors. *Int Heart J.* 2005;46(6):975-85.
91. Karlsson M, Mårild S, Brandberg J, Lönn L, Friberg P, Strandvik B. Serum phospholipid fatty acids, adipose tissue, and metabolic markers in obese adolescents. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(11):1931-9.

92. Kasai N, Mizushina Y, Sugawara F, Sakaguchi K. Three-dimensional structural model analysis of the binding site of an inhibitor, nervonic acid, of both DNA polymerase beta and HIV-1 reverse transcriptase. *J Biochem.* 2002;132(5):819-28.
93. Sala-Vila A, Castellote AI, Campoy C, Rivero M, Rodriguez-Palmero M, López-Sabater MC. The source of long-chain PUFA in formula supplements does not affect the fatty acid composition of plasma lipids in full-term infants. *J Nutr.* 2004;134(4):868-73.
94. Bettger WJ, DiMichelle-Ranalli E, Dillingham B, Blackadar CB. Nervonic acid is transferred from the maternal diet to milk and tissues of suckling rat pups. *J Nutr Biochem.* 2003;14(3):160-5.
95. Blažević I, Maleš T, Ruščić M. Glucosinolates of *Lunaria annua*: thermal, enzymatic, and chemical degradation. *Chemistry of Natural Compounds.* 2014. 49, 1154–1157.
96. Kumar S, Ali MR, Bawa S. Mini review on tricyclic compounds as an inhibitor of trypanothione reductase. *J Pharm Bioallied Sci.* 2014. 6(4): 222–228.
97. [https://www.researchgate.net/publication/266471005\\_Biogenesis\\_and\\_function\\_of\\_macro\\_cyclic\\_spermine\\_alkaloids](https://www.researchgate.net/publication/266471005_Biogenesis_and_function_of_macro_cyclic_spermine_alkaloids) Datum pristupa: 28.7.2019.
98. Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Poupat C, Fairlamb AH, Eggleston IM. Time-dependent inhibitors of trypanothione reductase: analogues of the spermidine alkaloid lunarine and related natural products. *Bioorg Med Chem.* 2006;14(7):2266-78.
99. Khan MOF. Trypanothione reductase: A viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. *Drug Target Insights.* 2007;2:129–146.
100. Gruber M, Alahakoon U, Taheri A, Nagubushana N, Zhou R, Aung B et al. The biochemical composition and transcriptome of cotyledons from *Brassica napus* lines expressing the AtGL3 transcription factor and exhibiting reduced flea beetle feeding. *BMC Plant Biol.* 2018; 18: 64.
101. Dessels C, Potgieter M, Pepper MS. Making the Switch: Alternatives to Fetal Bovine Serum for Adipose-Derived Stromal Cell Expansion. *Front Cell Dev Biol.* 2016. 4:115.
102. Gong JS, Li W, Zhang DD, Xie MF, Yang B, Zhang RX et al. Biochemical Characterization of An Arginine-Specific Alkaline Trypsin from *Bacillus licheniformis*. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):30061-74.

103. Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MCX, Mourao FA, Massensini AR, Martins-Filho OA et al. Trypan Blue Exclusion Assay by Flow Cytometry. *Braz J Med Biol Res.* 2014, 47 (4), 307–315.
104. Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M. Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE.* 2011; 6(9): e22876.
105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> Datum pristupa: 30.6.2019.
106. Müller AS, Janjić K, Oberoi G, Pensch M, Kurzmann C, Moritz A et al. Deferoxamine but Not Dimethyloxalyglycine, L-Mimosine, or Cobalt Dichloride Can Interfere with the MTT Assay. *Biomed Res Int.* 2018;5872865.
107. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol.* 2011;716:157-68.
108. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-45.
109. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K et al. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS One.* 2016; 11(5): e0155772.
110. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria- A review. *Acta Histochem.* 2018;120(4):303-311.
111. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144(8):1941-1953.
112. <https://www.iarc.fr/featured-news/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-18-1-million-new-cases-and-9-6-million-cancer-deaths-in-2018/> Datum pristupa: 12.8.2019.
113. Radkiewicz C, Johansson ALV, Dickman PW, Lambe M, Edgren G. Sex differences in cancer risk and survival: A Swedish cohort study. *Eur J Cancer.* 2017;84:130-140.
114. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res.* 2008; 25(9): 2097–2116.



115. Ghoncheh M, Mirzaei M, Salehiniya H. Incidence and Mortality of Breast Cancer and their Relationship with the Human Development Index (HDI) in the World in 2012. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(18):8439-43.
116. Abdulkareem IH. Aetio-pathogenesis of breast cancer. *Niger Med J.* 2013; 54(6): 371–375.
117. Yalaza M, İnan A, Bozer M. Male breast cancer. *J Breast Health.* 2016;12(1):1–8.
118. Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Čukelj P, Lončar J, Štruc K et al. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Bilten 41, Zagreb, 2019.
119. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny.* 2015; 14(3): 196–202.
120. Ades F, Tryfonidis K, Zardavas D. The past and future of breast cancer treatment-from the papyrus to individualised treatment approaches. *Ecancermedicalsecience.* 2017;11:746.
121. Siroglavić KJ, Polić Vižintin M, Tripković I, Šekerija M, Kukulj S. Trends in incidence of lung cancer in Croatia from 2001 to 2013: gender and regional differences. *Croat Med J.* 2017;58(5): 358–363.
122. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan O, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1856(2):189–210.
123. Lin T, Zirpoli GR, McCann SE, Moysich KB, Ambrosone CB, Tang L. Trends in cruciferous vegetable consumption and associations with breast cancer risk: A case-control study. *Curr Dev Nutr.* 2017;1(8):e000448.
124. Wu QJ, Yang G, Zheng W, Li HL, Gao J, Wang J, et al. Pre-diagnostic cruciferous vegetables intake and lung cancer survival among Chinese women. *Sci Rep.* 2015;5:10306.
125. Zhang Y. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res.* 2004;555(1-2):173-90.
126. Nechuta S, Caan BJ, Chen WY, Kwan ML, Lu W, Cai H et al. Post-diagnosis cruciferous vegetable consumption and breast cancer outcomes: a report from the after breast cancer pooling project. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013; 22(8): 1451–1456.

127. Thomson CA, Rock CL, Caan BJ, Flatt SW, Al-Delaimy WA, Newman VA et al. Increase in cruciferous vegetable intake in women previously treated for breast cancer participating in a dietary intervention trial. *Nutr Cancer*. 2007;57(1):11-9.
128. Lam TK, Gallicchio L, Lindsley K, Shiels M, Hammond E, Tao XG et al. Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(1):184-95.
129. Zhang Z, Bergan R, Shannon J, Slatore CG, Bobe G, Takata Y. The Role of Cruciferous Vegetables and Isothiocyanates for Lung Cancer Prevention: Current Status, Challenges, and Future Research Directions. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(18):e1700936.
130. Wu QJ, Xie L, Zheng W, Vogtmann E, Li HL, Yang G et al. Cruciferous vegetables consumption and the risk of female lung cancer: a prospective study and a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2013;24(7):1918–1924.
131. Leins P, Fligge K, Erbar C. Silique valves as sails in anemochory of *Lunaria* (Brassicaceae). *Plant Biol (Stuttg)*. 2018;20(2):238-243.

## **8. SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje hlapljivih spojeva izoliranih iz sjemena biljne vrste *Lunaria annua* na humane karcinomske stanice dojke (MDA-MB-231) te pluća (A549). Pretpostavka je da će se broj karcinomskih stanica, nakon izlaganja hlapljivim spojevima, smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **Materijali i metode:**

Citotoksičnost se ispitivala MTT metodom kojom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja Clevenger destilat, mikrovalnom ekstraktu te ekstraktu biljne vrste *Lunaria annua*. Uzorci biljke 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 ekstrakata 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 dojke, hlapljivi spojevi izolirani iz sjemena *Lunaria annua* (uzorci Clevenger destilat, mikrovalni ekstrakt i ekstrakt) ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama, pri različitim vremenima inkubacije. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju uzorci mikrovalni ekstrakt i ekstrakt pri koncentraciji od 100 µg/mL, nakon 72h inkubacije.
- Kod stanica karcinoma pluća, hlapljivi spojevi izolirani iz sjemena *Lunaria annua* (uzorci mikrovalni ekstrakt i ekstrakt) također ostvaruju bolji učinak pri višim koncentracijama, pri različitim vremenima inkubacije. Kod uzorka Clevenger destilata dugoročno gledano svaka od koncentracija daje otprilike jednak (konstantan) učinak. Najznačajniji učinak na smanjenje metabolički aktivnih stanica imaju uzorci mikrovalni ekstrakt i ekstrakt pri koncentraciji od 100 µg/mL, nakon 72h inkubacije.

**Zaključak:**

*In vitro* izlaganje stanica karcinoma dojke (MDA-MB-231) i pluća (A549) hlapljivim spojevima izoliranih iz sjemena biljne vrste *Lunaria annua* 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 spojeva izoliranih iz sjemena *Lunaria annua*, 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 compounds isolated from seeds of the plant species *Lunaria annua* on human carcinoma cells of breast (MDA-MB-231) and lungs (A549). 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 was tested by the MTT method used to determine the percentage of metabolically active cells after exposure to Clevenger distillate, microwave extract, and *Lunaria annua* plant extract. 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 breast carcinoma cells, volatile compounds isolated from *Lunaria annua* seeds (Clevenger distillate, microwave extract and extract samples) 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 microwave extract and extract samples at a concentration of 100 µg /mL after 72-hour incubation time.
- In lung cancer cells, volatile compounds isolated from *Lunaria annua* seeds (microwave extract and extract samples) also have a better effect at higher concentrations, at different incubation times. In the Clevenger distillate sample, 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 the microwave extract and extract samples at the concentration of 100 µg/mL after 72-hour incubation time.

**Conclusion:**

In vitro exposure of human carcinoma cells of breast (MDA-MB-231) and lungs (A549) to volatile compounds isolated from seeds of the plant species *Lunaria annua* 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 compounds isolated from *Lunaria annua* seeds 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**

## OSOBNI PODATCI

- **Ime i prezime:** Darija Sučević
- **Datum i mjesto rođenja:** 18. rujna 1995., Split, Republika Hrvatska
- **Državljanstvo:** hrvatsko
- **Adresa stanovanja:** Rašeljkina 4, 21 000 Split, Republika Hrvatska
- **E-adresa:** [sucevicdarija@gmail.com](mailto:sucevicdarija@gmail.com)

## OBRAZOVANJE

- **2010. – 2014.** IV. gimnazija, Split
- **2014. – 2019.** Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, studij farmacije

## STRANI JEZICI

- Engleski jezik (aktivno)
- Španjolski jezik (osnove)

## AKTIVNOSTI

- Član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA) (2014. - 2019.)
- Student Exchange Program (SEP), University of Lusofona, Lisabon, Portugal (2017.)
- FARMEBS 2018: 6. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije (Zagreb, 2018.)
- Praktična znanja za studente (Split, 2018.)
- 5. Kongres Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (Zagreb, 2018.)
- PMKS: Međunarodno natjecanje u znanju studenata farmacije i medicine (Sarajevo, 2019.)
- Hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem (Dubrovnik, 2019.)
- 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine (Split, 2019.)

## NAGRADE

- Dobitnica Dekanove nagrade za izvrstan uspjeh (2019.)