

# Citotoksično djelovanje eteričnog ulja Lavandula x intermedia Emeric ex Loisel. na dvije stanične linije karcinoma dojke

---

Ivić Zoko, Antea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:171:900801>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-20**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČLIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**I**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**Antea Ivić Zoko**

**CITOTOKSIČNO DJELOVANJE ETERIČNOG ULJA *LAVANDULA X*  
*INTERMEDIA EMERIC EX LOISEL*. NA DVIJE STANIČNE LINIJE KARCINOMA  
DOJKE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2022./2023.**

**Mentor:**

**izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić**

**Split, listopad 2023. 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

**Tema rada:** prihvaćena je na 79. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 35. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i na 24. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

### **CITOTOKSIČNO DJELOVANJE ETERIČNOG ULJA *LAVANANDULA X INTERMEDIA* EMERIC EX LOISEL. NA DVIJE STANIČNE LINIJE KARCINOMA DOJKE**

Antea Ivić Zoko, broj indeksa 201808

#### **Sažetak:**

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja bio je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* na dvije stanične linije karcinoma dojke: MDA-MB-231 i MCF-7. Pretpostavka je bila da će se nakon izlaganja stanica eteričnom ulju broj metabolički aktivnih stanica smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Materijali i metode:** Citotoksično djelovanje ispitano je pomoću MTT testa koji služi za procjenu stanične vijabilnosti. Obje stanične linije inkubirane su eteričnim uljem lavande u koncentracijama 1, 5, 20, 50, 100 i 200 µg/mL i promatrani su učinci nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Usporedbom apsorbancije nastalog produkta formazana kod stanica izloženih eteričnim uljem i kontrole skupine određen je postotak živih, metabolički aktivnih stanica.

**Rezultati:** Rezultati istraživanja citotoksičnog učinka eteričnog ulja lavande na stanicama karcinoma dojke prikazani su grafički kao ovisnost stanične vijabilnosti i koncentracije eteričnog ulja. Najbolji učinak na staničnoj liniji MDA-MB-231 opažen je nakon 48 sati inkubacije eteričnim uljem koncentracije 200 µg/mL, gdje je stanična vijabilnost iznosila 33,54%. Najveći učinak na staničnoj liniji MCF-7 također je primijećen pri koncentraciji od 200 µg/mL, ali nakon 72 sata inkubacije kada se stanična vijabilnost smanjila na 47,73%.

**Zaključak:** Eterično ulje *Lavandula x intermedia* pokazuje citotoksično djelovanje na stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 i MCF-7. Postoji povezanost citotoksične aktivnosti s vremenom inkubacije stanica i koncentracijom eteričnog ulja. Veća citotoksična aktivnost eteričnog ulja opaža se na staničnoj liniji MDA-MB-231. Postignute su IC<sub>50</sub> vrijednosti na obje stanične linije: nakon 48 i 72 sata na staničnoj liniji MDA-MB-231 te nakon 72 sata na staničnoj liniji MCF-7.

**Ključne riječi:** *Lavandula x intermedia*, karcinom dojke, MDA-MB-231, MCF-7, citotoksičnost, MTT test

**Rad sadrži:** 60 stranica, 13 tablica, 19 slika i 60 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva:**

1. doc. dr. sc. Dario Leskur - predsjednik povjerenstva
2. doc. dr. sc. Benjamin Benzon - član
3. izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić - član - mentor

**Datum obrane:** 26. listopada 2023.

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

**Scientific field:** Pharmacy

**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 79 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 35 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 24

**Mentor:** Assoc. prof. Nikolina Režić Mužinić

### **CYTOTOXIC EFFECT OF *LAVANDULA X INTERMEDIA* EMERIC EX LOISEL. ESSENTIAL OIL ON TWO BREAST CANCER CELL LINES**

Antea Ivić Zoko, index number 201808

#### **Summary:**

**Objective:** The aim of the research was to examine the potential cytotoxic effect of *Lavandula x intermedia* essential oil on two breast cancer cell lines: MDA-MB-231 and MCF-7. The assumption was that after exposure of cells to essential oil, the number of metabolically active cells will decrease compared to the control group.

**Materials and methods:** Cytotoxic activity was tested using the MTT test, which serves to assess cell viability. Both cell lines were incubated with lavender essential oil in concentrations of 1, 5, 20, 50, 100 and 200 µg/mL and the effects were observed after 4, 24, 48 and 72 hours. By comparing the absorbance of the resulting formazan product in cells exposed to essential oil and the control group, the percentage of living, metabolically active cells was determined.

**Results:** The results of the investigation of the cytotoxic effect of lavender essential oil on breast cancer cells are shown graphically as a dependence of cell viability and the concentration of essential oil. The best effect on the MDA-MB-231 cell line was observed after 48 hours of incubation with essential oil at a concentration of 200 µg/mL, where cell viability was 33.54%. The greatest effect on the MCF-7 cell line was also observed at a concentration of 200 µg/mL, but after 72 hours of incubation when the cell viability decreased to 47.73%.

**Conclusion:** The essential oil of *Lavandula x intermedia* shows a cytotoxic effect on breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. There is a correlation between cytotoxic activity and both incubation time of the cells and the concentration of the essential oil. Greater cytotoxic activity of the essential oil is observed on the cell line MDA-MB-231. IC<sub>50</sub> values were achieved on both cell lines: after 48 and 72 hours on the MDA-MB-231 cell line and after 72 hours on the MCF-7 cell line.

**Keywords:** *Lavandula x intermedia*, breast cancer, MDA-MB-231, MCF-7, cytotoxicity, MTT assay

**Thesis contains:** 60 pages, 13 tables, 19 figures and 60 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

1. Asst. prof. Dario Leskur PhD - chair person
2. Asst. prof. Benjamin Benzon PhD - member
3. Assoc. prof. Nikolina Režić Mužinić PhD - member - supervisor

**Defence date:** October 26<sup>th</sup>, 2023.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Rudera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. TUMOR</b> .....	2
<b>1.2. KARCINOM</b> .....	4
<b>1.3. OBILJEŽJA STANICA RAKA</b> .....	6
<b>1.4. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI</b> .....	9
1.4.1. ONKOGENI .....	9
1.4.2. TUMORSUPRESORSKI GENI .....	10
<b>1.5. KARCINOM DOJKE</b> .....	10
1.5.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA .....	10
1.5.2. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA .....	12
1.5.3. PATOHISTOLOGIJA .....	13
1.5.4. KLASIFIKACIJA I ODREĐIVANJE STADIJA BOLESTI.....	14
1.5.4. LIJEČENJE.....	15
<b>1.6. LAVANDA</b> .....	17
1.6.1. LAVANDA.....	17
1.6.2. KEMIJSKI SPOJEVI U ETERIČNOM ULJU LAVANDE.....	20
1.6.3. DJELOVANJA ETERIČNOG ULJA LAVANDE.....	21
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	23
<b>2.1. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	24
<b>2.2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA</b> .....	24
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	25
<b>3.1. STANIČNE LINIJE</b> .....	26
<b>3.2. POSTUPAK</b> .....	28
<b>3.3. TEST CITOTOKSIČNOSTI</b> .....	29
<b>3.4. KEMIJSKI SPOJEVI</b> .....	30
<b>4. REZULTATI</b> .....	32
<b>4.1. KARCINOM DOJKE - STANIČNA LINIJA MDA-MB-231</b> .....	33
<b>4.2. KARCINOM DOJKE - STANIČNA LINIJA MCF-7</b> .....	36
<b>5. RASPRAVA</b> .....	41
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	46
<b>7. LITERATURA</b> .....	48
<b>8. SAŽETAK</b> .....	55
<b>9. SUMMARY</b> .....	57
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	59

## **Zahvala**

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nikolini Režić Mužinić na uloženom vremenu i trudu te pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem i mentoru Vedranu Piršiću, mag. pharm. na prenesenom znanju, savjetima za samostalni rad u ljekarni te životnim savjetima.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na pruženoj ljubavi i podršci te razumijevanju tijekom cijelog obrazovanja.*

## POPIS KRATICA

BRCA1 - gen za rak dojke 1 (engl. *breast cancer gene 1*)

BRCA2 - gen za rak dojke 2 (engl. *breast cancer gene 2*)

CDK - o ciklinu ovisna kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase*)

COX – ciklooksigenaza (engl. *cyclooxygenase*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DMSO - dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

EGFR - receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

FGF1/2 -. faktor rasta fibroblasta 1/2 (engl. *fibroblast growth factor 1/2*)

HER2 - ljudski receptor za epidermalni faktor rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

HPV - humani papilomavirus (engl. *human papillomavirus*)

IC50 - 50% maksimalne inhibitorne koncentracije (engl. *half-maximal inhibitory concentration*)

IGF-1/2 - inzulinu sličan faktor rasta 1/2 (engl. *insulin-like growth factor 1/2*)

IL-3 - interleukin 3 (engl. *interleukin 3*)

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

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (engl. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

NAD(P)H - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

PDGFR - receptor trombocitnog faktora rasta (engl. *platelet-derived growth factor receptor*)

RAF - engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*

RAS - engl. *rat sarcoma virus*

RB - retinoblastom (engl. *retinoblastoma*)

TNF $\alpha$  - tumorski faktor nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)

TNM - tumor, čvorovi i metastaze (engl. *tumor, nodes and metastases*)

TP53 - tumorski protein 53 (engl. *tumor protein 53*)

UV - ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

VEGF - faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*)



## **1. UVOD**

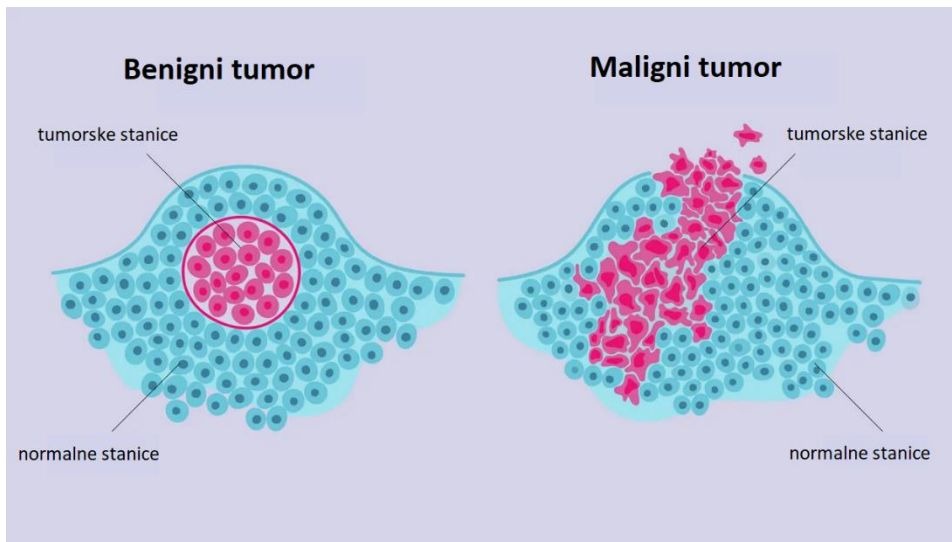
## 1.1. TUMOR

Tumori (lat. *tumor* – otekline) su patološke nakupine tkiva nastale kao posljedica pretjerane proliferacije abnormalnih stanica. Nazivaju se još novotvorinama ili neoplazmama (grč. *neos* – nov, *plasia* – rast). Rast tumora nema biološku svrhu, nego čak i šteti organizmu jer se, između ostalog, tumor ponaša kao parazit jer koristi kisik i hranjive tvari iz krvi domaćina. Tumorske stanice rastu autonomno (što znači da ne podliježu normalnim fiziološkim mehanizmima) i neorganizirano zbog čega ne tvore organe (1). Prema vrsti stanica iz kojih nastaju tumori se mogu podijeliti na karcinome, sarkome te leukemije i limfome. Karcinomi su najčešći (oko 90% slučajeva raka), a nastaju iz epitelnih stanica. Sarkomi su solidni tumori vezivnih tkiva (mišića, kosti i hrskavice i vezivnih tkiva u užem smislu) i rijetki su. Leukemije i limfomi čine oko 8% zloćudnih bolesti, a nastaju iz krvotvornih stanica te stanica imunološkog sustava (2).

Razlikuju se dobroćudni i zloćudni tumori (Slika 1.). Dobroćudni (benigni) tumori uglavnom ne ugrožavaju čovjekovo zdravlje. Iznimka su benigni tumori unutar lubanje koji dovode do edema mozga. Zloćudni (maligni) tumori mogu uzrokovati smrt ako se ne liječe (1).

Benigni tumori rastu polagano, unutar organa u kojem su nastali i ne šire se u druge organe, odnosno ne metastaziraju. Potiskuju okolno tkivo i najčešće stvaraju vezivnu čahuru koja predstavlja oštru granicu između tumora i okolnog, zdravog tkiva. Uglavnom su dobro prokrvljeni pa su nekroze ili površinske ulceracije rijetke. Benigni su tumori izgrađeni od dobro diferenciranih stanica koje slične normalnim stanicama tkiva, a omjer jezgre i citoplazme u njima je normalan (1).

Maligni tumori rastu brže od benignih, nemaju oštre rubove, rastu infiltrativno šireći se u okolna tkiva. Omjer jezgre i citoplazme u stanicama je veći nego kod normalnih stanica ili stanica benignog tumora. Maligni se tumori mogu širiti u druge dijelove tijela preko krvnih i limfnih žila, a taj se proces naziva metastaziranje (grč. *metastasis* – promjena mjesta). Sposobnost metastaziranja je glavna karakteristika kojom se razlikuju stanice zloćudnog tumora od stanica benignog tumora koje nemaju tu sposobnost, ali to ne znači da svi zloćudni tumori metastaziraju (1, 3).

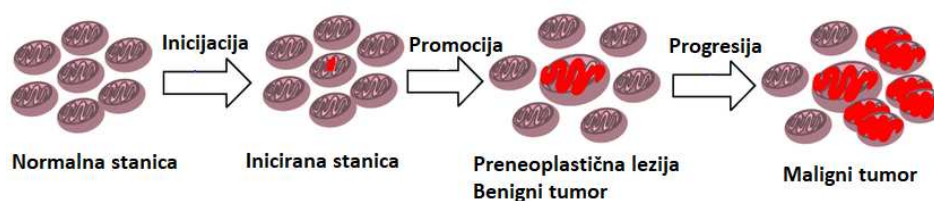


**Slika 1.** Razlika između stanica benignog i malignog tumora

Preuzeto s: <https://www.technologynetworks.com/cancer-research/articles/benign-vs-malignant-tumors-364765>

Datum pristupa: 18.09.2023.

Razvoj tumora postupan je proces što nam dokazuje i činjenica da se većina slučajeva raka javlja u starijoj životnoj dobi. Prvo se javlja genetska mutacija u jednoj stanici, a zatim ta stanica počinje nenormalno proliferirati. Nakupljaju se dodatne mutacije kao što su npr. brža sposobnost rasta, veća sposobnost preživljenja itd., a stanice s boljim karakteristikama opstaju (klonska selekcija) i tako tumor progredira (Slika 2.) (4).



**Slika 2.** Razvoj tumora kroz procese inicijacije, promocije i progresije

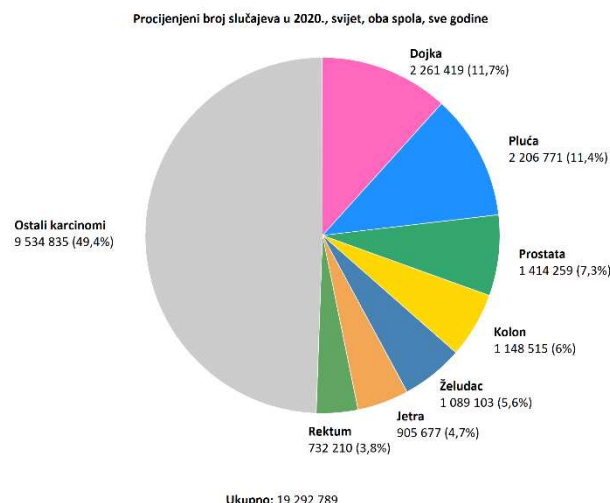
Preuzeto s: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29570697/>

Datum pristupa: 18.09.2023.

## 1.2. KARCINOM

Rak ili karcinom je zloćudni tumor, a smatra se da je naziv izmislio Hipokrat jer je oblik tumora sličio raku. Rak je tek u zadnjem stoljeću postao značajan uzrok smrti jer su prije ljudi uglavnom umirali od zaraznih bolesti (npr. tuberkuloza), a i očekivani životni vijek bio je kraći (2).

Rak je drugi najvažniji uzrok smrti iza kardiovaskularnih bolesti, kako u Republici Hrvatskoj tako i u drugim razvijenim državama svijeta. U svijetu je u 2020. godini otkriveno oko 19,3 milijuna slučajeva raka (10,1 milijun muškaraca i 9,2 milijuna žena) od čega su 50% činili rak dojke, pluća, prostate, kolona, želudca, jetre i rektuma zajedno (Slika 3.) (5). Od raka je umrlo skoro 10 milijuna ljudi (6).

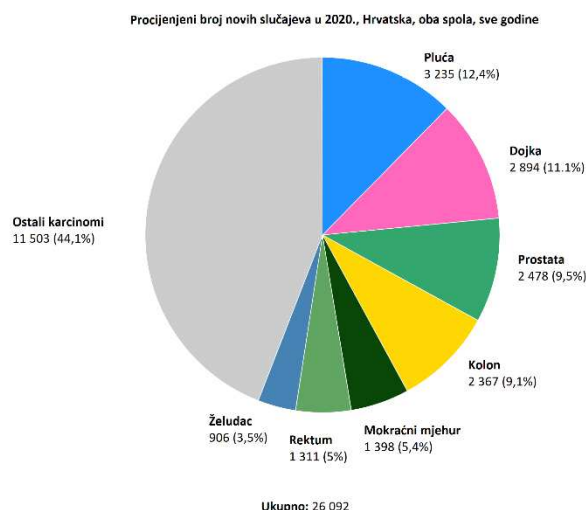


**Slika 3.** Incidencija svih vrsta raka u svijetu u 2020. godini kod oba spola

Preuzeto s: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=0&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0)

Datum pristupa: 18.09.2023.

Broj novodijagnosticiranih zloćudnih bolesti za 2020. godinu u Republici Hrvatskoj iznosi 26092 slučajeva (Slika 4.), od čega se 14 070 odnosi na muškarce, a 12 022 na žene (7, 8, 9). Broj umrlih od raka u istoj godini je 14 326, a najveću smrtnost imali su rak pluća te rak kolona (10). Pet najčešćih sijela raka u muškaraca su: prostata, pluća, kolon, mokraćni mjehur i rektum (8). Pet najčešćih sijela raka u žena su: dojka, kolon, pluća, tijelo maternice i štitnjača (9).



**Slika 4.** Incidencija svih vrsta raka u Hrvatskoj u 2020. godini kod oba spola

Preuzeto s: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=0&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4)

Datum pristupa: 18.09.2023.

Incidencija se nekih karcinoma promijenila u zadnjih 50 godina. Incidencija karcinoma želuca smanjila se zbog promjena u prehrani, a karcinoma vrata maternice zbog poboljšane dijagnostike premalignih lezija (Papa-test). Incidencija raka dojke i prostate povećala se zbog poboljšane dijagnostike. Zbog pušenja cigareta povećala se incidencija raka pluća i mokraćnog mjehura, a zbog sunčanja raka kože (11).

Pojavnost različitih vrsta raka varira među pojedinim državama zbog genskih razlika, različite prosječne dobi stanovnika, rase, prehrambenih i higijenskih navika i socijalno-ekonomskih čimbenika. Većina malignih bolesti (više od 80%) javlja se kod starijih bolesnika zbog kumulativnog djelovanja različitih karcinogena, nakupljanja mutacija i slabljenja kontrolnih mehanizama. Incidencija i mortalitet karcinoma veća je kod muškaraca nego kod žena. Za pojavu nekih tumora (npr. neurofibromatoze) bitna je genetička predispozicija, odnosno prisutnost određenih genetskih mutacija. Pušenje (ponajprije aktivno, ali utjecaja ima i pasivno) usko je povezano s rakom pluća i mokraćnog mjehura jer duhanski dim u sebi sadrži oko 40 karcinogena. Alkohol se smatra povezanim s rakom ne zbog sadržaja karcinogena, već zbog prehrambenog deficita koji prati alkoholizam. Karcinogeni su prisutni i u hrani – to su aditivi, pesticidi, kafeična kiselina koja se nalazi u voću, aflatoksini nastali djelovanjem gljive *Aspergillus* na kikiriki, soju ili kukuruz, heterociklički aromatski amini nastali pečenjem na roštilju te nitrozamini iz konzerviranih proizvoda. Na određenim radnim mjestima također se mogu naći karcinogeni, a primjer je azbest koji je povezan s karcinomom pluća, pleure i potrbušnice. Incidencija raka kože raste zbog povećanog izlaganja ljudi ultraljubičastom zračenju (najopasnije su UVB i UVC zrake) radi sunčanja, ali i oštećenja ozonskog omotača pri čemu su puno osjetljivije svjetlopute osobe od tamnopusih. Također, i ionizirajuće zračenje ima utjecaj na razvoj raka što je dokazano promatranjem ljudi koji su preživjeli nuklearnu katastrofu i onih koji su zračeni terapijski. Za neke je mikroorganizme utvrđeno da su povezani s razvojem raka. Tako se bakterija *Helicobacter pylori* povezuje s karcinomom želuca, a od virusa: virus hepatitisa B i C s hepatocelularnim rakom, Epstein-Barr virus s Burkittovim limfomom te HPV s rakom vrata maternice (11, 12).

### 1.3. OBILJEŽJA STANICA RAKA

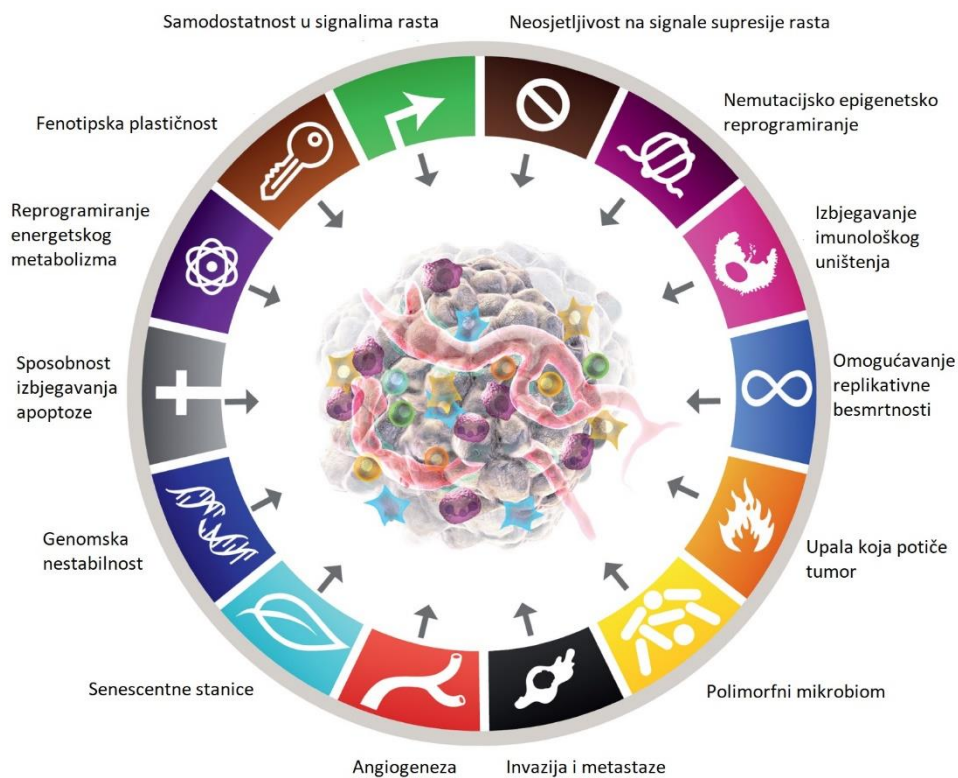
2000. godine Robert A. Weinberg i Douglas Hanahan objavili su članak *The hallmarks of cancer* (Obilježja raka) u kojem su opisali šest svojstava koje dijele većina, ako ne i svi ljudski karcinomi, a to su: samodostatnost u signalima rasta, neosjetljivost na signale supresije rasta, sposobnost izbjegavanja programirane stanične smrti (apoptoze), omogućavanje replikativne besmrtnosti, angiogeneza te invazija tkiva i metastaze (13). Samodostatnost u signalima rasta znači da stanice raka mogu same generirati signale rasta bez ovisnosti o vanjskim podražajima (koji su nužni za proliferaciju normalnih stanica) i tako stanice imaju stalan poticaj na staničnu proliferaciju (autokrini stimulacija rasta). Ta razlika između normalnih i tumorskih stanica se vidi kada se stanice uzgajaju *in vitro*. Kod

normalnih stanica dolazi do inhibicije proliferacije ovisne o gustoći, odnosno one proliferiraju dok ne dostignu kritičnu gustoću koja je proporcionalna količini faktora rasta koji se nalaze u mediju. Tumorske stanice nastavljaju rasti i dalje postizujući visoku gustoću (14, 15). Antiproliferativni signali održavaju homeostazu u normalnim tkivima slanjem stanica u privremeno stanje mirovanja ili terminalno postmitotičko stanje nakon diferencijacije, dok transformirane stanice izbjegavaju te antiproliferativne signale prekidanjem pRb puta, prekomjernom ekspresijom faktora koji stimuliraju rast kao što je c-myc ili drugim mehanizmima. Zato uglavnom, za razliku od normalnih stanica, ostaju nediferencirane (14, 15). Tumorske stanice izbjegavaju apoptozu pomakom ravnoteže između proapoptotskih i antiapoptotskih mehanizama. Signale preživljavanja prenose IGF-1/IGF-2 i IL-3, a signale smrti FAS i TNF $\alpha$  vežući se na odgovarajuće receptore. Citokrom c, koji se otpušta iz kromosoma, važni je katalizator apoptoze (16). Normalne stanice posjeduju ograničeni proliferativni potencijal i prestaju se dijeliti u nekom trenutku kada se uzgajaju *in vitro*. To se događa kada se skrate telomere kromosoma ispod kritičnog praga. Maligne stanice postaju besmrtno tako što potiču aktivnost telomeraze, telomere se ne skraćuju i tako se omogućuje neograničena replikacija kromosoma (15). Rastuće tumorsko tkivo ima povećane potrebe za kisikom i hranjivim tvarima i, da bi se nastavilo širiti, stanice luče faktore koji potiču stvaranje novih krvnih žila. Taj se proces zove angiogeneza. Signali koji pokreću angiogenezu su VEGF (faktor rasta vaskularnog endotela) i FGF1/2 (faktori rasta kiselih i bazičnih fibroblasta), a vežu se na receptore izražene na endotelnim stanicama. Inhibitor angiogeneze je trombospondin-1 koji se također veže na receptor eksprimiran na endotelnim stanicama (14, 15, 16). Jedna od glavnih i najopasnijih značajki stanica raka je sposobnost invazije i metastaziranja u udaljena tkiva (uzrok čak 90% smrti od raka kod ljudi). Ta sposobnost omogućuje stanicama raka da koloniziraju nova područja u tijelu gdje, barem u početku, hranjive tvari i prostor nisu ograničeni. Inače se susjedne stanice spajaju mostovima E-kadherina što rezultira prijenosom antiproliferativnih signala. Zato je za metastaziranje tumora najvažnije funkcionalno inhibirati E-kadherine i ostale proteine bitne za komunikaciju među stanicama (14).

2011. godine u novom izdanju *Hallmarks of cancer: the next generation* (Obilježja raka: sljedeća generacija) Robert A. Weinberg i Douglas Hanahan raspravili su o već utvrđenim obilježjima te o novim saznanjima u području raka. Dodali su još dva svojstva stanica raka: reprogramiranje energetskog metabolizma i izbjegavanje imunološkog odgovora. Također, utvrdili su dvije karakteristike koje omogućuju stjecanje ostalih

svojstava. Prva je nestabilnost genoma koja omogućuje mutacije gena i dobivanje novih svojstava, a druga je upalno stanje koje pokreću stanice imunološkog sustava. Upala pogoduje stanicama raka osiguravajući rast, preživljavanje i proangiogene čimbenike, te otpuštajući kemikalije, kao što su reaktivne vrste kisika, koje mogu uzrokovati dodatne mutacije (13, 17).

Hanahan 2022. godine objavljuje novo izdanje *Hallmarks of cancer: new dimensions* (Obilježja raka: nove dimenzije) u kojem potvrđuje prethodno predložena svojstva raka te dodaje još 4 nova obilježja tako da ih je ukupno 14 (Slika 5.). Nova predložena obilježja koja je još potrebno istražiti su: fenotipska plastičnost, nemutacijsko epigenetsko reprogramiranje, polimorfni mikrobiom i senescentne stanice (13).



**Slika 5.** Obilježja raka

Preuzeto s: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022204/>

Datum pristupa: 18.09.2023.



## 1.4. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI

### 1.4.1. ONKOGENI

Protoonkogeni su normalni stanični geni uključeni u prijenos signala u stanici, a njihovom mutacijom nastaju onkogeni. Taj se proces zove aktivacija onkogeni, a posljedično dolazi do autonomnog rasta stanica raka bez poticaja vanjskim čimbenicima i bez odgovora na kontrolne mehanizme. Onkoproteini su proteinski produkti onkogeni. Mogu se podijeliti prema funkcijama u regulaciji rasta stanica koje obavljaju na:

- čimbenike rasta: epidermalni čimbenik rasta (EGF), čimbenik rasta fibroblasta (FGF), vaskularno-endotelni čimbenik rasta (VEGF)
- receptore za čimbenike rasta: EGFR (ERBB1), ERBB2 (HER2/neu), PDGFR, c-KIT
- signalne molekule (prijenosnici signala u stanici) : RAS, RAF, MOS, SRC
- molekule koje se vežu za DNA (transkripcijski čimbenici): FOS-JUN, MYB, MYC
- regulatore mitotičkog ciklusa: ciklin D ili E, o ciklinu ovisne kinaze (CDK) (18, 19).

Protoonkogeni se mogu pretvoriti u onkogene na 4 različita načina: točkastom mutacijom, prekomjernim izražavanjem, translokacijom ili insercijom virusnog genoma. Točkasta mutacija je proces oštećenja DNA u kojem se jedna baza zamijeni drugom pa se posljedično sintetizira abnormalni protein. Najčešće mutirani protoonkogen je gen *RAS* (u oko 30% tumora), a rezultira sintezom abnormalnog proteina RAS. Prekomjerno izražavanje (ekspresija) može biti posljedica amplifikacije (umnoženja) protoonkogeni pri čemu se sintetizira puno više proteina. Primjeri amplificiranih gena su *N-MYC* u neuroblastomu i *HER2/neu* u raku dojke. Translokacija je premještanje protoonkogeni s jednog kromosomskog lokusa na drugi na kojem on postaje previše stimuliran. To se naprimjer događa u stanicama Burkittova limfoma (*C-MYC* se translocira s kromosoma 8 na 14 i tu se nalazi uz gen za kodiranje teškog lanca imunoglobulina koji je stalno aktivan pa aktivira i *C-MYC*) ili u stanicama kronične mijeloične leukemije (protoonkogen *ABL* premješta se s kromosoma 9 na 22 gdje dolazi u blizinu *BCR* gena stvarajući hibridni mutirani gen *BCR/ABL*). Četvrti način za aktivaciju onkogeni je insercija virusnog genoma između normalnih baza u DNA domaćina pri čemu se stvaraju virusni proteini. To se događa kod infekcije HPV-om visokog rizika (18, 19).

Dokaz ovisnosti raka o mutacijama onkogeni je uspješna primjena monoklonskih protutijela i inhibitora protein-kinaza na ciljane onkogene kod nekih vrsta karcinoma. Primjer

je uspješno liječenje pacijenata s kroničnom mijelocitnom leukemijom inhibitorom kinaze imatinibom koji cilja na *BCR-ABL* mutirani onkogen (20).

#### 1.4.2. TUMORSUPRESORSKI GENI

Tumorsupresorski geni su geni koji sami po sebi zaustavljaju rast tumora, a čiji gubitak ili inaktivacija dovode do nastanka raka. Za razliku od onkogeni gdje je dovoljna mutacija na samo jednom alelu za njihovu aktivaciju, kod tumorsupresorskih gena trebaju se dogoditi mutacije na oba alela da bi se oni inaktivirali (21, 22).

Gen *RB-1* prvi je otkriveni tumorsupresorski gen, a njegova delecija na oba alela na kromosomu 13 dovodi do nastanka retinoblastoma (raka mrežnice) (21, 22).

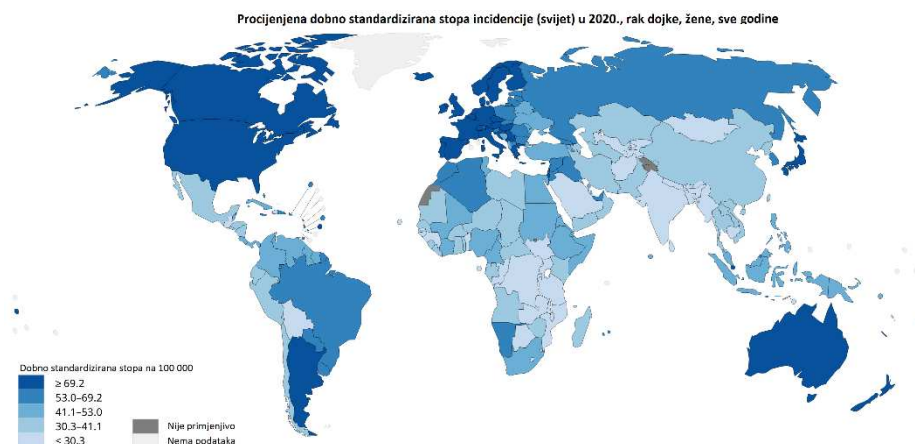
Najvažniji tumorsupresorski gen je *TP53* i često je mutiran kod različitih vrsta karcinoma u ljudi. Aktivirani protein TP53 regulira prelazak stanica iz G1 u S-fazu mitotičkog ciklusa. Stanicama s normalnom DNA TP53 dopušta prelazak u S-fazu, a stanice s oštećenom DNA zaustavlja i omogućuje popravak oštećenja prije replikacije. Ako se oštećenje DNA ne uspije popraviti, protein TP53 šalje stanicu u apoptozu i one na kraju umiru. Ako se gen *TP53* deletira ili inaktivira, u mitozu ulaze i stanice s oštećenom DNA, što povećava mogućnost nastanka karcinoma (21, 22).

### 1.5. KARCINOM DOJKE

#### 1.5.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom dojke predstavlja značajan globalni zdravstveni problem jer je najčešće dijagnosticiran karcinom u svijetu s procijenjenih 2,26 milijuna slučajeva zabilježenih u 2020. i vodeći je uzrok smrtnosti od karcinoma u žena (oko 685 000 smrtnih slučajeva u 2020. godini). Razvijene zemlje imaju najveću učestalost raka dojke (Slika 6.), ali je 2020. godine zabilježeno da se više od polovice dijagnoza i dvije trećine smrtnih slučajeva dogodilo u manje razvijenim regijama. Očekuje se sve veća incidencija raka dojke u regijama koje prolaze kroz socio-ekonomsku tranziciju jer se produžava životni vijek, mijenjaju se reproduktivni obrasci kod žena i rastu stope pretilosti. U razvijenijim zemljama petogodišnje preživljenje od raka dojke je više od 80%, u Indiji je manje od 70%, a u Južnoj Africi manje od 50%. Uočena veća stopa preživljenja u razvijenijim regijama može se pripisati provedbi

programa za rano otkrivanje asimptomatske bolesti, ranijoj dijagnozi i boljem pristupu učinkovitom liječenju (23).



**Slika 6:** Procijenjena dobno standardizirana stopa incidencije raka dojke kod žena u svijetu 2020. godine

Preuzeto s: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=0&include\\_nmssc\\_other=0&projection=natural-earth&color\\_palette=default&map\\_scale=quantile&map\\_nb\\_colors=5&continent=0&show\\_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D)

Datum pristupa: 22.09.2023.

Najvažniji čimbenik rizika za razvoj raka dojke je starija životna dob. Nakon 40. godine života njegova incidencija kontinuirano raste s dobi. Žene koje imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu (npr. majka, teta ili sestra oboljele od raka dojke) imaju povećan rizik za razvoj raka dojke. Genetska predispozicija se uglavnom odnosi na mutacije u tumorsupresorskim genima *BRCA1* i *BRCA2* koje su prisutne u 5-10% slučajeva raka dojke. Reproductivni faktori koji povećavaju rizik od nastanka raka dojke su: starija životna dob pri prvom porođaju (30-35 godina), manji broj trudnoća ili nerađanje, rana menarha i kasna menopauza. Svi se ti čimbenici zapravo mogu povezati s duljom izloženosti estrogenu. Lijekovi utječu na razine estrogena u tijelu i tako povećavaju rizik od razvoja raka dojke su oralni kontraceptivi ako se uzimaju prije ženine 25. godine i uzimaju se dulje od 4 godine te

hormonska nadomjesna terapija. Debljina je još jedan rizični čimbenik, a prije svega se odnosi na žene u postmenopauzi jer tada estrogen nastaje perifernom konverzijom u masnom tkivu pomoću aromataze. Vezano uz stil života, pokazala se veća incidencija raka dojke još kod slabe fizičke aktivnosti, nevegetarijanske prehrane u odnosu na vegetarijansku, pušenja i konzumacije alkohola. Utjecaj na nastanak raka dojke imaju i ionizirajuće zračenje (osobito kod mlađih žena) i dijagnoza dobroćudnih bolesti dojke (24, 25).

### 1.5.2. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA

Glavni simptom raka dojke koji žene zapaze i zbog kojeg se odlučuju na pregled je bezbolna kvržica u dojci, a ostali simptomi su: smečkasto-krvavi iscjedak, uvlačenje bradavica, otekline, navlačenje kože i upala. Ako su zahvaćeni regionalni limfni čvorovi, mogu se vidjeti ili palpirati u aksili i supraklavikularnoj regiji. Ako se radi o uznapredovalom, upalnom raku dojke, tumor zahvaća dio ili cijelu dojku, širi se u regionalne limfne čvorove, dojka je crvena i otečena, a koža slični kori naranče. Ako postoje udaljene presadnice, njihova klinička slika ovisi o tome u kojem se organu nalaze (24).

Dijagnoza raka dojke započinje anamnezom, ispitivanjem rizičnih čimbenika i fizikalnim pregledom. Pacijentice uglavnom dolaze na pregled jer su samopregledom dojke napipale kvržicu (koja je u većini slučajeva dobroćudna). Jedina metoda probira koja smanjuje smrtnost od raka dojke (za oko 25%) je mamografija. Mamografija je dijagnostička metoda izbora kod postmenopauzalnih žena i preporučuje se napraviti mamogram svim ženama koje su u menopauzi te ga ponoviti svake 2-3 godine. Nedostaci ove metode su 1% lažno pozitivnih rezultata i to što je većina žena smatra neugodnom. Najviše korištena dijagnostička metoda (pogotovo kod premenopauzalnih žena) je ultrazvuk dojke. Manje je osjetljiv i specifičan od mamografije, pogotovo kod postmenopauzalnih žena. Razlog tomu je činjenica da se nakon menopauze žljezdano tkivo dojke pretvara u masno kroz koje ultrazvuk ne prodire dobro. U premenopauzalnih žena se koristi i magnetna rezonancija kao dijagnostička metoda. Nakon što se nekom dijagnostičkom metodom nađe tvorba za koju se sumnja da je maligni tumor, ona se potvrđuje patohistološki ili citološki. Nakon dokazanog tumora isključuje se (ili potvrđuje) postojanje udaljenih presadnica (26, 27).

### 1.5.3. PATOHISTOLOGIJA

Rak dojke nastaje iz žljezdanog parenhima dojke, iz izvodnih kanalića (duktusa) ili iz žljezdanih lobula. Gotovo svi karcinomi dojke su adenokarcinomi, a dijele se na neinvazivne (*in situ*) koji imaju održanu bazalnu membranu i na invazivne koji probijaju bazalnu membranu. U neinvazivne karcinome ubrajaju se duktalni karcinom *in situ*, lobularni karcinom *in situ* i Pagetova bolest bradavice. Histološki se invazivni karcinomi uglavnom dijele na invazivni karcinom nespecificiranog tipa (70-80% svih tumora) i invazivni lobularni karcinom (10-15%), a rjeđi su tubularni, mucinozni, metaplastični, papilarni, mikropapilarni i medularni (26, 28).

Molekularna klasifikacija definira način liječenja raka dojke. Na temelju imunohistokemijskih rezultata izraženosti estrogenskih i progesteronskih receptora, HER2 receptora i Ki-67 indeksa karcinomi dojke se dijele na:

- luminalne A: estrogen i progesteron +, HER2 -, Ki-67<20%
- luminalne B HER2 negativne: estrogen +, HER2 – i progesteron – i/ili Ki-67>20%
- luminalne B HER2 pozitivne: estrogen +, HER2 +
- HER2 pozitivne: estrogen i progesteron -, HER2 +
- trostruko negativne: estrogen i progesteron -, HER2 -.

Luminalni tumori imaju najbolju prognozu i dobro odgovaraju na hormonsku terapiju. Primjenom ciljanih anti-HER2 lijekova (npr. trastuzumab) prognoza bolesnica s HER2 pozitivnim karcinomom se izuzetno poboljšala, a najlošiju prognozu imaju bolesnice s trostruko negativnim karcinomom (26, 28).

U patohistološkom opisu karcinoma dojke navode se: veličina tumora u 2 dimenzije, stupanj zloćudnosti (niski, srednji ili visoki), Ki-67 indeks (udio stanica u mitozima), status hormonskih (estrogenskih i progesteronskih) receptora, status HER2 receptora, broj pozitivnih čvorova aksile, odnos tumora prema reznim rubovima te prema krvnim i limfnim žilama (26).

#### 1.5.4. KLASIFIKACIJA I ODREĐIVANJE STADIJA BOLESTI

TNM klasifikacija raka dojke opisuje njegove tri karakteristike: tumor (najčešće veličinu, ali i odnos prema okolnim strukturama), limfne čvorove (broj i/ili lokaciju zahvaćenih limfnih čvorova) i postojanje ili odsutnost udaljenih metastaza (Tablica 1.) (29).

**Tablica 1.** TNM klasifikacija raka dojke (30)

<b>T - tumor</b>	
T1	Tumor < 2 cm
T2	Tumor 2-5 cm
T3	Tumor >5 cm
T4	Tumor bilo koje veličine s direktnom ekstenzijom na prsni koš ili kožu
<b>N - limfni čvor</b>	
N0	Bez metastaza u regionalnom čvoru
N1	Regionalne pomične metastaze
N2	Regionalne nepomične metastaze
N3	Metastaze u internim mamarnim limfnim čvorovima
<b>M - metastaze</b>	
M0	Bez udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze

Nakon određivanja tumora prema TNM klasifikaciji, može se definirati kojem stadiju pripada: 0 (*in situ*), I i II (rani invazivni), III (lokalno uzapredovali) te IV (metastatski) pri čemu metastatski ima najlošiju prognozu (Tablica 2.) (31).

**Tablica 2.** Stadiji raka dojke s obzirom na TNM klasifikaciju (30)

<b>0</b>	Tis (tumor <i>in situ</i> )	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
	T0	N1	M0
<b>IIA</b>	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2/N3	M0
<b>IIIB</b>	T4	bilo koji N	M0
<b>IIIC</b>	bilo koji T	N3	M0
<b>IV</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1

#### 1.5.4. LIJEČENJE

Lokalni karcinom dojke primarno se liječi kirurškim zahvatom čija je svrha uklanjanje malignog tumora i eventualno metastaza u limfnim čvorovima aksile. Mastektomija je postupak uklanjanja cijele dojke, a može se raditi i kako bi se smanjio rizik od razvoja raka dojke. Njezin nedostatak je što dovodi do osjećaja aseksualnosti i posljedično depresije. Kirurzi i pacijentice zato preferiraju ili poštudne operacije ili rekonstrukciju dojke. Lumpektomija je postupak uklanjanja dijela dojke koji sadrži maligni tumor zajedno sa što manje okolnog zdravog tkiva. Nedostatak ove metode je što zahtijeva i drugu vrstu liječenja (npr. radioterapija) zbog smanjenja mogućnosti recidiva. Nakon mastektomije može se napraviti rekonstrukcija dojke tkivom pacijentice ili silikonskim implantatom, međutim, tumor se ipak može pojaviti u rekonstruiranoj dojci (32). Disekcija aksilarnih limfnih čvorova uz mastektomiju bila je standardni postupak, ali je često rezultirala edemom, boli, utrulošću i smanjenom pokretljivošću ruke. Danas se provodi biopsija prvog drenirajućeg limfnog čvora i na temelju rezultata procjenjuje se potreba za disekcijom (31).

Liječenje lokalno uznapredovalog raka dojke (stadij III), ali i raka stadija II, upalnog, HER2 pozitivnog ili trostruko negativnog raka, provodi se neoadjuvantnom terapijom i onda lokalnim kirurškim uklanjanjem tumora. Cilj preoperabilnog sistemskog (neoadjuvantnog) liječenja je smanjenje veličine tumora, pri čemu je najuspješnija kemoterapija (31, 33).

Kemoterapija je proces ubijanja stanica raka upotrebom lijekova. Može se davati preoperativno ili kao adjuvantna terapija nakon kirurškog odstranjivanja tumora, a ordinira se prva u nizu adjuvantnog liječenja. Preporučuje se kod bolesnica s većim tumorom, pozitivnim limfnim čvorovima, trostruko negativnim i HER2 pozitivnim ili negativnim tumorom. Lijekovi koji se mogu koristiti su: docetaksel, paklitaksel, cisplatin, karboplatin, vinorelbin, kapecitabin, doksorubicin, ciklofosfamid. Oni se trebaju koristiti pažljivo zbog izraženih nuspojava. Najčešće se koriste antraciklini (epirubicin ili doksorubicin) i ciklofosfamid u kombinaciji s taksanima (docetaksel ili paklitaksel) (32, 34, 35).

Radioterapija je indicirana nakon poštudnih operacija te uklanjanja aksilarnih limfnih čvorova zbog smanjenja rizika recidiva i povećanja vjerojatnosti za izlječenje. Ordinira se nakon cijeljenja rane (oko mjesec dana nakon operacije) ili, ako je planirana i kemoterapija, mjesec dana nakon kemoterapije (35).

Hormonska terapija indicirana je kod svih žena s estrogen ili progesteron pozitivnim tumorom. Uključuje tri skupine lijekova: selektivne modulatore estrogenih receptora (tamoksifen i raloksifen), inhibitore aromataze (anastrozol, letrozol i eksemestan) i agonist gonadotropin-otpuštajućeg hormona (goserelin). Selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM) u nekim tkivima djeluju kao estrogen, a u nekima, kao što je dojka, blokiraju vezanje estrogena za receptore. Mogu se koristiti za liječenje, ali i prevenciju raka dojke. Nuspojave tamoksifena su venska tromboza, katarakta, rak endometrija i valovi vrućine, a kod raloksifena su te nuspojave rjeđe. Oba su pogodna za liječenje žena s osteoporozom jer djeluju protektivno na kosti. Uzimaju se 5-10 godina sami ili u kombinaciji s inhibitorima aromataze. Inhibitori aromataze blokiraju pretvorbu androgena u estrogen i lijek su izbora u postmenopauzalnih žena zbog visoke učinkovitosti i boljeg podnošenja od tamoksifena, ali nisu indicirani u premenopauzalnih žena. Također se koriste 5-10 godina (32, 33).

U 20-30% slučajeva raka dojke gen HER2 (receptor za humani epidermalni faktor rasta 2) je prekomjerno eksprimiran i prije je bio znak loše prognoze. Razvojem HER2 ciljane imunoterapije povećalo se preživljenje i smanjio nastanak recidiva. Lijekovi usmjereni na HER2 mogu se koristiti kao adjuvantna, neoadjuvantna i terapija u metastatskoj fazi HER2 pozitivnog raka dojke te mogu se kombinirati međusobno i s drugim načinom liječenja. Najčešće korišten je trastuzumab - humanizirano monoklonsko protutijelo koje cilja na izvanstaničnu domenu HER2 receptora. Nije poznat točan mehanizam djelovanja trastuzumaba, ali je utvrđeno da inhibira fosforilaciju AKT. U terapiji se koristi godinu dana, ne duže zbog kardiotoksičnosti. Ostali lijekovi koji se mogu koristiti su: pertuzumab (sprječava dimerizaciju HER2 i HER3), lapatinib (inhibitor tirozin kinaze), adotrastuzumab emtanzin (anti HER2 monoklonsko protutijelo i inhibitor mikrotubula), bevacizumab (anti-VEGF monoklonsko protutijelo), a zbog stvaranja rezistencije na trastuzumab sintetiziraju se i novi lijekovi kao što su neratinib i afatinib (36, 37).



## 1.6. LAVANDA

### 1.6.1. LAVANDA

Lavanda (lat. *lavandula*) je biljka iz porodice usnače (lat. *Lamiaceae*) za koju je opisana 41 vrsta. Najvažnije su:

- *Lavandula angustifolia* Mill.
- *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.
- *Lavandula dentata* L.
- *Lavandula latifolia* Medik.
- *Lavandula stoechas* L.

Lavanda je rasprostranjena uglavnom na Mediteranu (južna Europa, sjeverna Afrika, jugozapadna Azija), Kanarskim otocima i u Indiji. Uzgoj lavande nije zahtjevan. Mjesto uzgoja treba biti sunčano s dobro dreniranim tlom. Biljka preferira tlo neutralne ili alkalne reakcije, iako lavandin podnosi i blago kisela tla. Lavandu treba zalijevati samo tijekom dugotrajnih sušnih razdoblja (38, 39).

Lavanda je višegodišnji zeljasti patuljasti grm koji može narasti od 50 do 150 cm u vis. Cvjetni klasovi rastu iznad lišća i mogu se razlikovati u boji od plave do ljubičaste. Čaška i vjenčić su cjevasti, obično završavaju s pet režnjeva. Iako je opći izgled svih vrsta sličan, neke morfološke značajke mogu se koristiti za njihovo razlikovanje (Tablica 3.). Lavandin se od prave lavande razlikuje po većoj veličini, širim listovima i razgranatoj stabljici (39).

**Tablica 3.** Razlike između morfoloških karakteristike 3 vrste lavande (39)

<b>Morfološke karakteristike</b>	<i>Lavandula angustifolia</i> , Mill.	<i>Lavandula latifolia</i> . Medik.	<i>Lavndula x intermedia</i> , Emeric ex Loisel.	
<b>Biljka</b>	grm visok do 50 cm	grm visok do 50–70 (100) cm	grm visok do 60-150 cm	
<b>Lišće</b>	Oblik	uski, linearno-lancetasti	linearno-lancetast do lopatičast	
	Boja	kod mlađih biljaka su sivo tomentozne; kod starijih biljaka su zelene	siva, sa srebrnastosivim indumentom	često sivo ljuskasta
<b>Cvatovi</b>	Stabljika	nerazgranata, duljina cca. 10–25 cm	razgranata, duljina do cca. 25 cm	Razgranata
	Šiljak	kompaktnog obrisa, duljine cca. 4–5(8) cm, ponekad ispod glavnog klasa ima malih cvjetova	trozub u obrisu, duljina cca. 5–8 cm, često isprekidana	mlitavih obrisa, ponekad isprekidan
	Brakteje	široke, jajoliko-rombične do obrnuto jajolike u obrisu	uske, linearno-lancetaste u obrisu	jajasto-rombičnog obrisa, ali različitog oblika i veličine
	Brakteole	prisutne ali male	prisutne ali male, duljine do cca. 4 mm	prisutne ali male, duljine do cca. 1-4 mm
<b>Cvjetovi</b>	Čaška	trinaest živaca, ima mali kružni dodatak	trinaest živaca, ima kružni dodatak	trinaest živaca, ima okrugli do eliptični dodatak
	Vjenčić	obostrano simetričan, dva puta duži od čaške, istaknuti režnjevi s bojama plave/ljubičaste, bijele, rijetko ljubičaste do ružičaste	obostrano simetričan, režnjevi obojeni plavom do ljubičastom bojom	obostrano simetričan, režnjevi su nijanse lila-ljubičaste do bijele
	Vrijeme cvatnje	sredina lipnja do srpnja	od sredine srpnja	od kraja lipnja do srpnja

Najpoznatija vrsta lavande je *Lavandula angustifolia* (Slika 7.). Još se naziva pravom, običnom ili engleskom lavandom. Opsežno je istražena, opisana u Europskoj farmakopeji, službeno je priznata kao ljekovita biljka i koristi se u suvremenoj fitoterapiji (40).



**Slika 7.** *Lavandula angustifolia*, Mill.

Preuzeto s:

<https://identify.plantnet.org/hr/useful/species/Lavandula%20angustifolia%20Mill./dat>

Datum pristupa: 26.09.2023.

*Lavandula x intermedia* (lavandin) (Slika 8.) je hibrid *L. angustifolia* i *L. latifolia*. Autohtona hrvatska sorta lavandina je budrovka koja se može pronaći na otoku Hvaru. *L. x intermedia* najviše je uzgajana vrsta jer je otpornija i veća biljka od *L. angustifolia*, daje više prinosa biljnog materijala po hektaru uzgoja i sadrži više eteričnog ulja po kilogramu biljnog materijala. Posljedično, dobiveno eterično ulje lavandina puno je jeftinije od ulja prave lavande i čini većinu eteričnog ulja lavande na tržištu (38, 40).



**Slika 8.** *Lavandula x intermedia*, Emeric ex Loisel.

Preuzeto s:

<https://identify.plantnet.org/hr/useful/species/Lavandula%20x%20intermedia%20Emeric%20ex%20Loisel./data>

Datum pristupa: 26.09.2023.

#### 1.6.2. KEMIJSKI SPOJEVI U ETERIČNOM ULJU LAVANDE

Eterično ulje može se dobiti od različitih dijelova biljke: suhих (s najvećim udjelom ulja) ili svježih cvjetova ili pak osušenih listova (s najmanjim prinosom ulja). Sastav eteričnog ulja biljaka iste vrste varira zbog različitih čimbenika kao što su mjesto uzgoja, vremenski uvjeti, vrijeme berbe itd. Lavanda sadrži brojne polarne terpenoide: 1,8-cineol, linalol, kamfor, borneol, terpinen-4-ol, linalil-acetat, lavandulol i lavandulil acetat. U manjoj količini prisutni su mono- i seskviterpenski ugljikovodici:  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen, mircen, sabinen, 3-karen,  $\alpha$ -terpinen,  $\alpha$ -santalen, germakren D, (E)- $\beta$ -kariofilen, i trans- $\alpha$ -bergamoten (38).

Ulje lavandina je blijedožuta do gotovo bezbojna tekućina i ima jak biljni miris. Najzastupljenije komponente su:

- linalol i linalil-acetat (obično preko 20%) - njihova visoka razina je poželjna jer rezultira ugodnijom cvjetnom aromom i željenom farmaceutskom kvalitetom
- kamfor (najčešće 5-10%)
- borneol (obično nekoliko postotaka)
- 1,8-cineol (obično nekoliko postotaka)
- terpinen-4-ol (0,4-16%)
- $\alpha$ -terpineol (2-10%)
- lavandulol i njegov ester lavandulil acetat (od djelića postotka do 3%) - njihova prisutnost je poželjna jer daje ulju miris (38, 41).

Kemijski sastav eteričnog ulja *L. × intermedia* po prirodi je sličan onome *L. angustifolia*. Međutim, uočene su neke kvantitativne razlike u koncentracijama ključnih komponenti. Eterično ulje lavandina sadrži niži udio linalola i linalil-acetata od prave lavande, ali značajno višu razinu 1,8-cineola, kamfora i borneola. Ovi monoterpenoidi su kamforni, što rezultira oštrijim notama u aromi i smanjenom vrijednošću u industriji parfema u usporedbi s uljem prave lavande. S druge strane, ulje lavandina bogatije kamforom može biti korisno u aromaterapiji (38).

### 1.6.3. DJELOVANJA ETERIČNOG ULJA LAVANDE

Lavanda se koristila kao ljekovita i aromatična biljka još u doba Starog Rima i Grčke. Upotrebljava se u prehrambenoj (kao začim), parfemskoj i kozmetičkoj industriji te aromaterapiji i tradicionalnoj medicini (38).

Osim dobro poznatog anksiolitičkog učinka lavande, pokazano je da ima i značajan antidepresivni učinak kod pacijenata s dijagnosticiranom depresijom i to pogotovo oralnom primjenom, ali i aromaterapijom (42, 43). S tim povezano, lavanda utječe na poremećaje spavanja produljenjem trajanja sna i smanjenjem buđenja (44). Kao i mnoge druge biljke, i lavanda ima antioksidativno djelovanje. Također, pokazano je i protuupalno i analgetsko djelovanje, a pretpostavlja se da ono nije posredovano inhibicijom COX enzima (45). Lavanda ima antimikrobno djelovanje uglavnom na bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *E. coli*), ali i na viruse (*Herpes simplex*) i gljivice (*Aspergillus* sp.) (46).

Opisani učinci uglavnom se odnose na vrstu *L. angustifolia* jer je ona dobro istražena, ali *L. x intermedia* pokazuje sličan terapijski potencijal. Medicinska primjena eteričnih ulja općenito je ograničena nedostatkom njihove topljivosti u vodi. Međutim, eterično ulje lavandina posebno formulirano kao nanoemulzija pokazuje izražene citotoksične učinke na stanice humanog neuroblastoma, stanice ljudske limfoblastične leukemije i stanice ljudskog kolorektalnog adenokarcinoma (41).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje eteričnog ulja lavande (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.) na dvije stanične linije karcinoma dojke: MDA-MB-231 i MCF-7.

## **2.2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

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

1. Eterično ulje lavande (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.) smanjit će broj stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 stanične linije.
2. Eterično ulje lavande (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.) smanjit će broj stanica karcinoma dojke MCF-7 stanične linije.

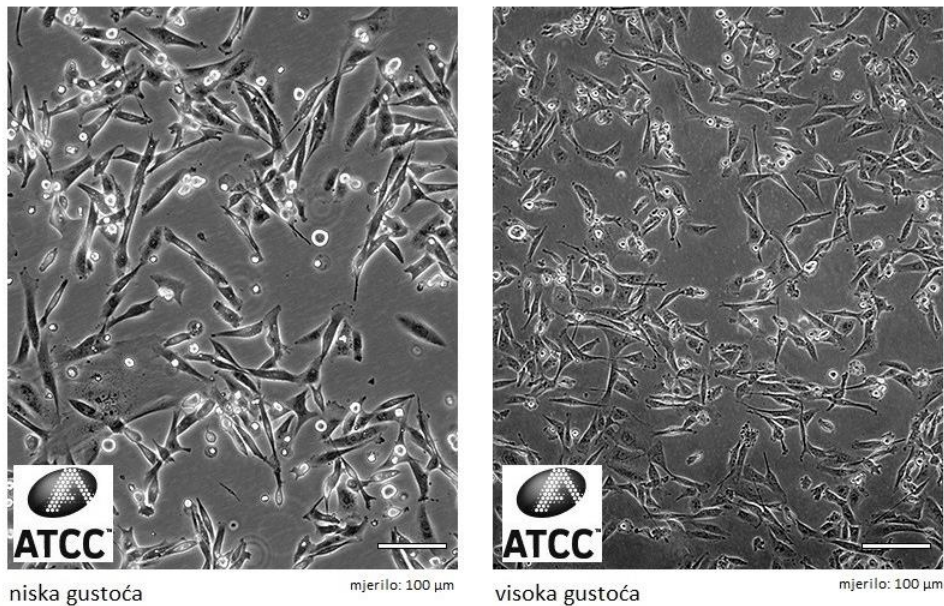


### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. STANIČNE LINIJE

*In vitro* ispitivanje citotoksičnog djelovanja eteričnog ulja lavande provedeno je na humanim staničnim linijama karcinoma dojke MDA-MB-231 i MCF-7.

MDA-MB-231 (Slika 9.) je vrlo agresivna, invazivna i slabo diferencirana stanična linija karcinoma dojke bez izraženih estrogenskih, progesteronskih ni HER2 receptora (trostruko negativna) (47). Njezine glavne karakteristike prikazane su u tablici 4.



**Slika 9.** Stanična linija karcinoma dojke MDA-MB-231

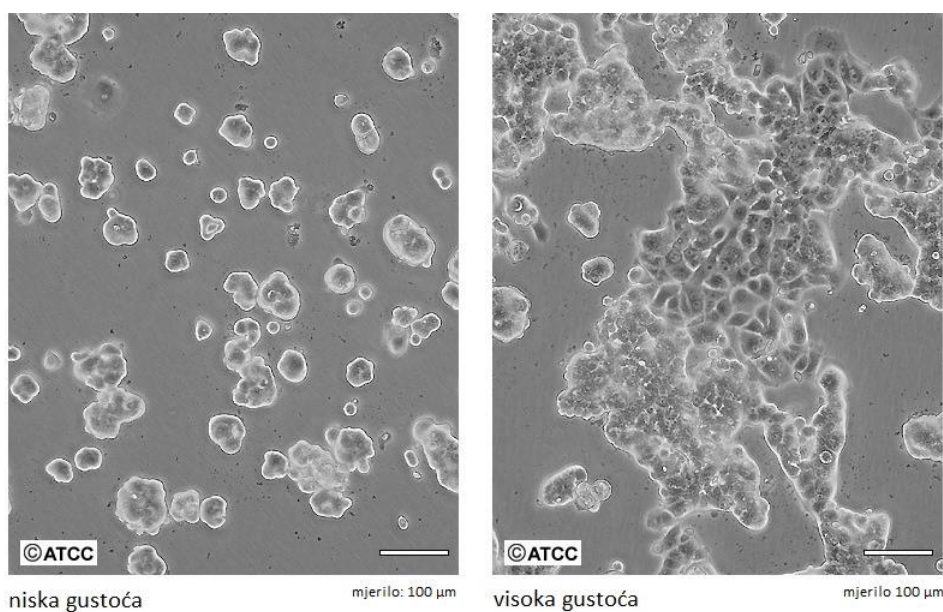
Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-26>

Datum pristupa: 30.09.2023.

**Tablica 4.** Karakteristike stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 (48)

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
tip stanica	epitelne stanice
morfologija	epitelna
tkivo	dojka, mliječna žlijezda
bolest	adenokarcinom
primjena	3D stanična kultura
format proizvoda	smrznuti
uvjeti pohrane	parna faza tekućeg dušika
svojstva rasta	adherentno
dob	51 godina
spol	ženski
etnicitet	bijelkinja
ekspimirani markeri	EGF, TGF- $\alpha$

MCF-7 (Slika 10.) je najproučavanija stanična linija karcinoma dojke u svijetu, a prvenstveno se koristi kao *in vitro* model za proučavanje biologije raka dojke. Ima izražene estrogenske, progesteronske i glukokortikoidne receptore (49). Njezine glavne karakteristike prikazane su u tablici 5.



**Slika 10.** Stanična linija karcinoma dojke MCF-7

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-22>

Datum pristupa: 30.09.2023.

**Tablica 5.** Karakteristike stanične linije karcinoma dojke MCF-7 (50)

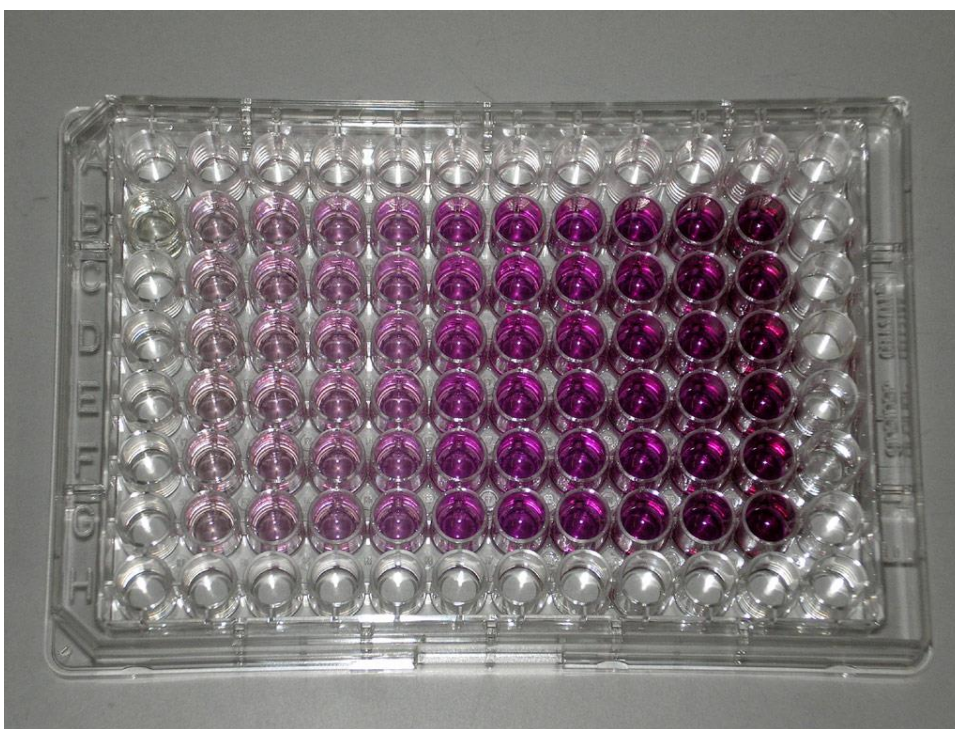
<b>Organizam</b>	<b><i>Homo sapiens</i>, čovjek</b>
tip stanica	epitelne stanice
morfologija	epitelna
tkivo	dojka, mliječna žlijezda
bolest	adenokarcinom
primjena	3D stanična kultura
format proizvoda	smrznuti
uvjeti pohrane	parna faza tekućeg dušika
svojstva rasta	adherentno i/ili suspenzija
dob	69 godina
spol	ženski
etnicitet	bijelkinja
eksprimirani markeri	estrogenski receptor

### 3.2. POSTUPAK

Kako bi se odredila citotoksična aktivnost eteričnog ulja lavande *L. x intermedia*, proveden je MTT test (test vijabilnosti stanica) na staničnim linijama adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 i metastatskog adenokarcinoma dojke MCF-7. Obje stanične linije inkubirane su preko noći u pločicama s 96 jažica. Gustoća stanične linije MDA-MB-231 bila je 8000, a MCF-7 6000 stanica po jažici. Nakon toga stanice su inkubirane samo s medijem (kontrolna skupina) ili s razrijeđenim ekstraktima u koncentracijama od 1 do 200 µg/mL u triplikatu tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Zatim je u svaku jažicu dodano 100 µL MTT reagensa u koncentraciji 0,5 g/L i inkubirano 2 sata na 37°C. Medij je uklonjen, a dodan je dimetilsulfoksid (DMSO) i slijedila je inkubacija još 10 minuta na 37°C. Kao produkt nastao je indikator metabolički aktivnih stanica – formazan. Izmjerena je njegova apsorbancija na 570 nm na čitaču mikropločica (BioSan, Riga, Latvija). IC<sub>50</sub> (50% maksimalne inhibitorne koncentracije) vrijednost izračunata je pomoću IC<sub>50</sub> kalkulatora (AAT Bioquest). Kako bi se odredile razlike među testiranim koncentracijama, provedena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *one-way ANOVA*) korištenjem verzije 3.14 programa Past 3.X (Sveučilište u Oslu, Norveška) s razinom značajnosti  $p < 0,05$ .

### 3.3. TEST CITOTOKSIČNOSTI

MTT test je kolorimetrijski test kojim se mjeri metabolička aktivnost stanica. Ona je pokazatelj stanične vijabilnosti i proliferacije. MTT testom može se procijeniti citotoksično djelovanje pojedinih tvari. MTT test temelji se na redukciji MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u formazan pri čemu je vidljiva promjena boje iz žute koja potječe od MTT-a u ljubičastu koju daju kristali formazana. Za redukciju potreban je enzim NAD(P)H ovisna stanična oksidoreduktaza koju imaju samo žive, metabolički aktivne stanice. Nastali netopljivi kristali formazana otapaju se pomoću dimetilsulfoksida (DMSO), a onda se mjeri apsorbancija formazana pomoću spektrofotometra pri 500-600 nm. Budući da se samo u živim stanicama događa reakcija redukcije MTT-a u formazan, intenzitet ljubičaste boje korelira s brojem metabolički aktivnih stanica (Slika 11.) (51).



**Slika 11.** Mikrotitarska pločica nakon MTT testa

Preuzeto s: [https://en.wikipedia.org/wiki/MTT\\_assay#](https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay#)

Datum pristupa: 30.09.2023.

### 3.4. KEMIJSKI SPOJEVI

Lavanda, čije je eterično ulje upotrijebljeno u ovom istraživanju, ubrana je u Hrvatskoj na području otoka Hvara. Institut za jadranske kulture i melioraciju tla odredio je točan kemijski sastav eteričnog ulja metodama plinske kromatografije i masene spektrometrije. Najzastupljeniji spojevi bili su linalol (52,50%), 1,8-cineol (17,93%) i linalil-acetat (11,96%) (52).

Linalol je nezasićeni monoterpenski alkohol specifičnog mirisa. Može se pronaći u eteričnim uljima mnogih biljnih vrsta iz porodica *Lamiaceae* (lavanda, metvica), *Lauraceae* (lovor, cimet, ruža) i *Rutaceae* (citrusi). Za razliku od drugih komponenti eteričnih ulja, linalol ima značajnu topljivost u vodi. Dobiva se sintezom ili ekstrakcijom iz prirodnih biljnih izvora i koristi kao miris u parfemima i kozmetici. Topikalnom primjenom brzo se apsorbira kroz kožu u krvotok, ali se brzo i eliminira. Linalol je blagi iritans za kožu i potencijalni alergen. Utvrđeno je da posjeduje antibakterijske, antioksidativne, protuupalne, analgetičke, sedativne i repelentne učinke (53).

Linalil-acetat (bergamol) je monoterpenoid, acetatni ester linalola. Jedna je od glavnih komponenti eteričnih ulja bergamota i lavande. S obzirom da se pri niskom pH u želudcu hidrolizira pri čemu nastaju linalol i octena kiselina, funkcionalno je sličan linalolu. Glavna razlika među njima je što je linalil-acetat slabo topljiv u vodi. Nakon topikalne primjene brzo se apsorbira, ali i eliminira, baš kao i linalol. Također se koristi u parfemima, sapunima, kozmetici i kao aroma. Uzrokuje somnolenciju i opušta glatke mišiće krvnih žila, a može izazvati kontaktni alergijski dermatitis (54).

1,8-cineol (eukaliptol) je monoterpen koji se nalazi u eteričnim uljima eukaliptusa, kadulje, majčine dušice i origana. Slabo je topljiv u vodi, ali se brzo apsorbira iz udahnutog zraka i distribuira po svim organima. Ima mukolitička, antimikrobna i protuupalna svojstva pa se koristi u liječenju akutnih i kroničnih bolesti dišnog sustava, primjerice sinusitisa, bronhitisa i kronične opstruktivne plućne bolesti. Mukolitičko djelovanje iskazuje smanjenjem broja vrčastih stanica koje sadrže mucin (55).

Od nepoželjnih tvari koje se mogu pronaći u lavandi prisutan je kamfor - bezbojna ili bijela kruta tvar s jakim aromatičnim mirisom. Sublimira na sobnoj temperaturi i slabo je topljiv u vodi. Prisutan je u prirodi kao komponenta eteričnih ulja mnogih biljnih vrsta poput kamforova drva, kadulje i bosiljka. Zbog antimikrobnog, antitusivnog, analgetskog i insekticidnog učinka bio je široko korišten. Danas se manje upotrebljava, uglavnom kao

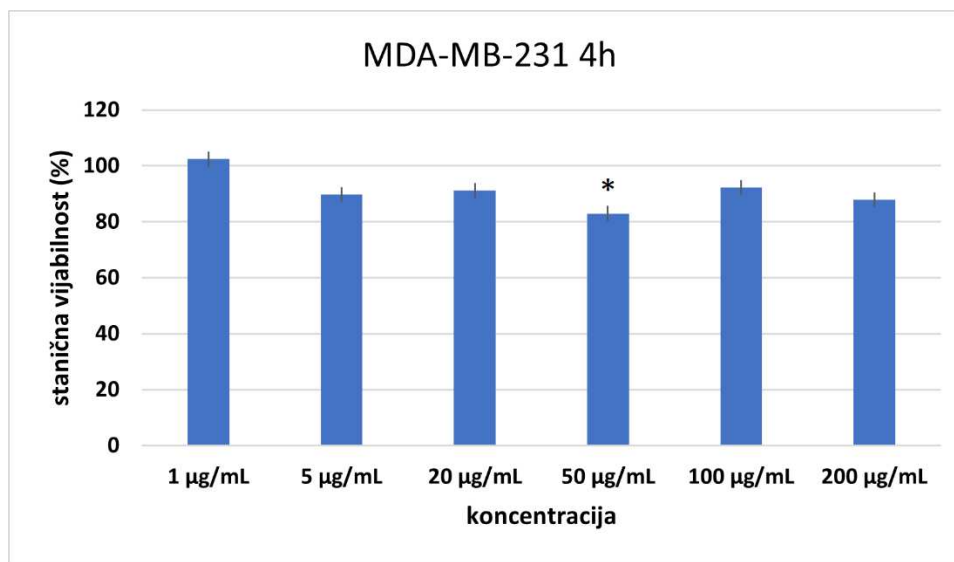
sastojak masti za inhaliranje kod prehlade i masti s analgetskim djelovanjem jer učinkovito smanjuje osjećaj boli djelujući na nociceptore i hladi kožu. Negativna strana kamfora je otrovnost. Gutanje 3,5 g kamfora može rezultirati smrću, a 2 g izaziva toksične učinke. Simptomi trovanja su mučnina, povraćanje, glavobolja, vrtoglavica, trzanje mišića i konvulzije. Kod djece je potrebno obratiti pažnju da mast s kamforom ne dospije u nosnice jer se brzo apsorbira i može izazvati toksične učinke (56).

## **4. REZULTATI**



#### 4.1. KARCINOM DOJKE - STANIČNA LINIJA MDA-MB-231

Eterično ulje lavande nema statistički značajno citotoksično djelovanje na stanice karcinoma dojke stanične linije MDA-MB-231 nakon 4 sata inkubacije, osim pri koncentraciji od 50  $\mu\text{g/mL}$  gdje je pokazano statistički značajno djelovanje ( $p = 0,0289$ ), a vijabilnost stanica se smanjila na 82,97%.  $\text{IC}_{50}$  vrijednost nije postignuta.

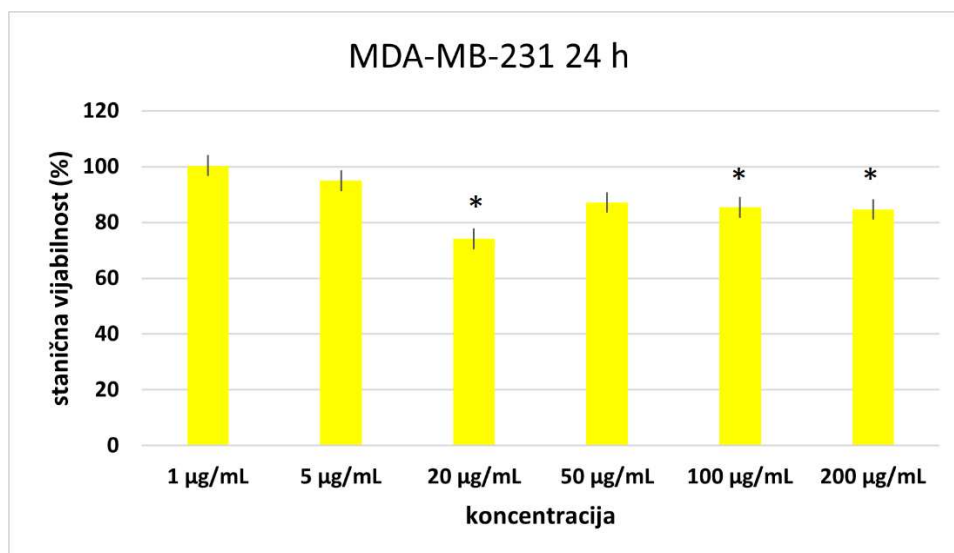


**Slika 12.** Citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnu liniju MDA-MB-231 karcinoma dojke nakon 4 h (\* -  $p < 0,05$ )

**Tablica 6.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnoj liniji MDA-MB-231 nakon 4 h

Koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ )	1	5	20	50	100	200
$p$ vrijednost	0,7938	0,1401	0,2817	0,0289	0,1807	0,073

Nakon 24 sata inkubacije stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 eteričnim uljem lavande statistički značajno smanjenje stanične vijabilnosti pokazano je pri koncentracijama od 20, 100 i 200  $\mu\text{g/mL}$ . Najveće smanjenje postignuto je pri koncentraciji od 20  $\mu\text{g/mL}$  i iznosi 74,14%.  $\text{IC}_{50}$  vrijednost nije postignuta kao ni nakon 4 sata inkubacije.

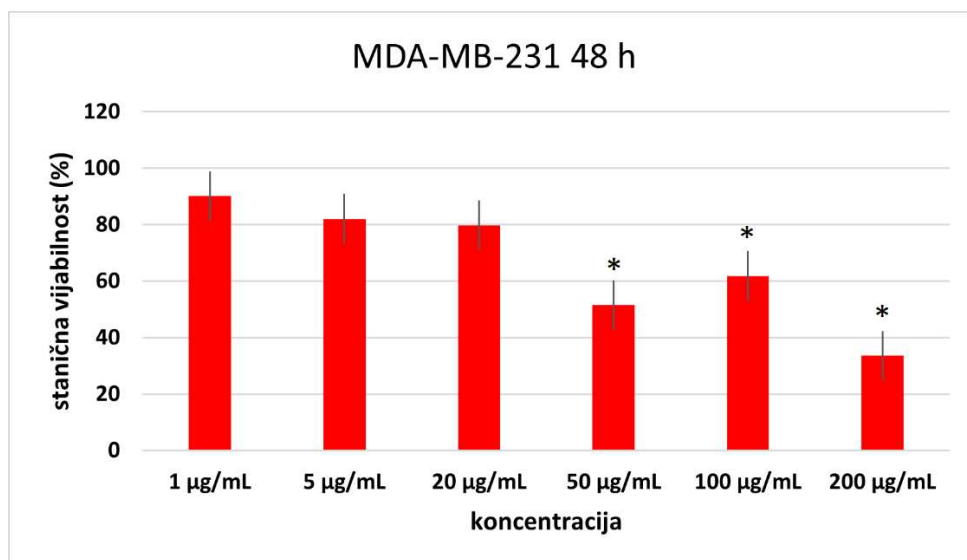


**Slika 13.** Citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnu liniju MDA-MB-231 karcinoma dojke nakon 24 h (\* -  $p < 0,05$ )

**Tablica 7.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnoj liniji MDA-MB-231 nakon 24 h

Koncentracija (µg/mL)	1	5	20	50	100	200
<i>p</i> vrijednost	0,9679	0,5767	0,0016	0,102	0,0089	0,0053

Nakon 48 sati tretiranja stanica karcinoma dojke stanične linije MDA-MB-231 eteričnim uljem lavande ostvareno je smanjenje vijabilnosti stanica pri svim koncentracijama. Statistički značajni rezultati postignuti su pri koncentracijama od 50, 100 i 200 µg/mL. Najbolji rezultat ostvaren je pri najvećoj mjerenoj koncentraciji (200 µg/mL) i iznosi 33,54%. Koncentracija pri kojoj je broj preživjelih stanica 50%, odnosno  $IC_{50}$  vrijednost, iznosi 141,42 µg/mL.

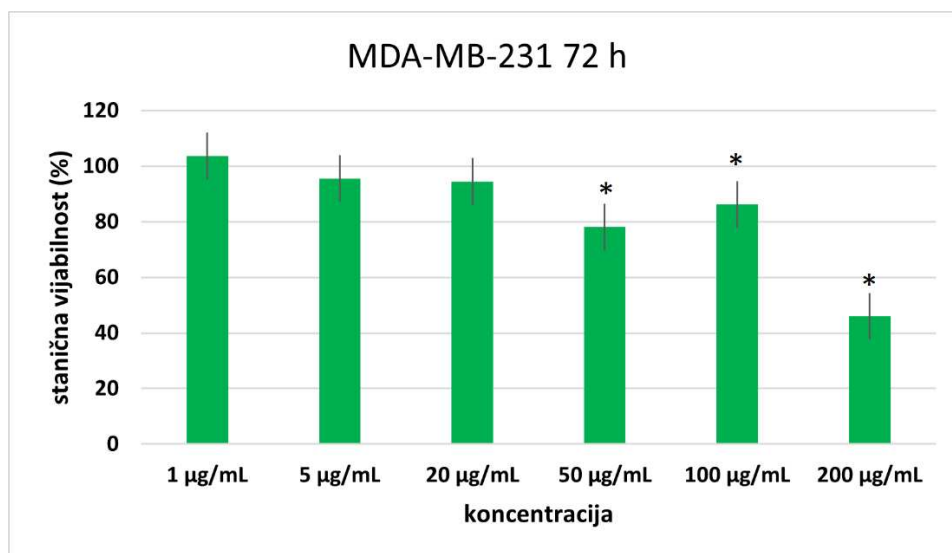


**Slika 14.** Citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnu liniju MDA-MB-231 karcinoma dojke nakon 48 h (\* -  $p < 0,05$ )

**Tablica 8.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnoj liniji MDA-MB-231 nakon 48 h

Koncentracija (µg/mL)	1	5	20	50	100	200
$p$ vrijednost	0,4341	0,157	0,094	0,0111	0,0146	0,0014

Statistički značajni rezultati, nakon 72 sata inkubacije stanica raka dojke stanične linije MDA-MB-231 eteričnim uljem lavande, dobiveni su pri koncentracijama od 50, 100 i 200 µg/mL. Najveće smanjenje broja preživjelih stanica ostvareno je pri koncentraciji od 200 µg/mL. Izračunata je  $IC_{50}$  vrijednost i iznosi 150 µg/mL.



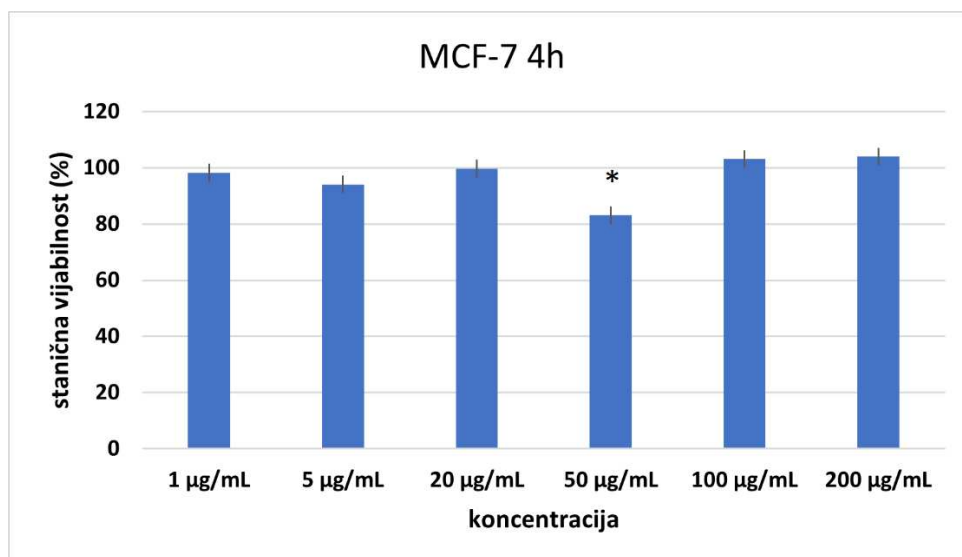
**Slika 15.** Citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnu liniju MDA-MB-231 karcinoma dojke nakon 72 h (\* -  $p < 0,05$ )

**Tablica 9.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnoj liniji MDA-MB-231 nakon 72 h

Koncentracija (µg/mL)	1	5	20	50	100	200
<i>p</i> vrijednost	0,3668	0,3468	0,2264	0,0016	0,0078	0,000088

#### 4.2. KARCINOM DOJKE - STANIČNA LINIJA MCF-7

Nakon četverosatne inkubacije stanica raka dojke stanične linije MCF-7 eteričnim uljem lavande nije primijećeno očekivano smanjenje stanične vijabilnosti. Naprotiv, pri najvišim koncentracijama (100 i 200 µg/mL) eterično ulje lavande potaknulo je proliferaciju stanica. Jedino značajnije smanjenje broja stanica vidljivo je pri koncentraciji 50 µg/mL ( $p = 0,0272$ ), gdje postotak preživjelih stanica iznosi 83,1%.  $IC_{50}$  vrijednost nije postignuta.

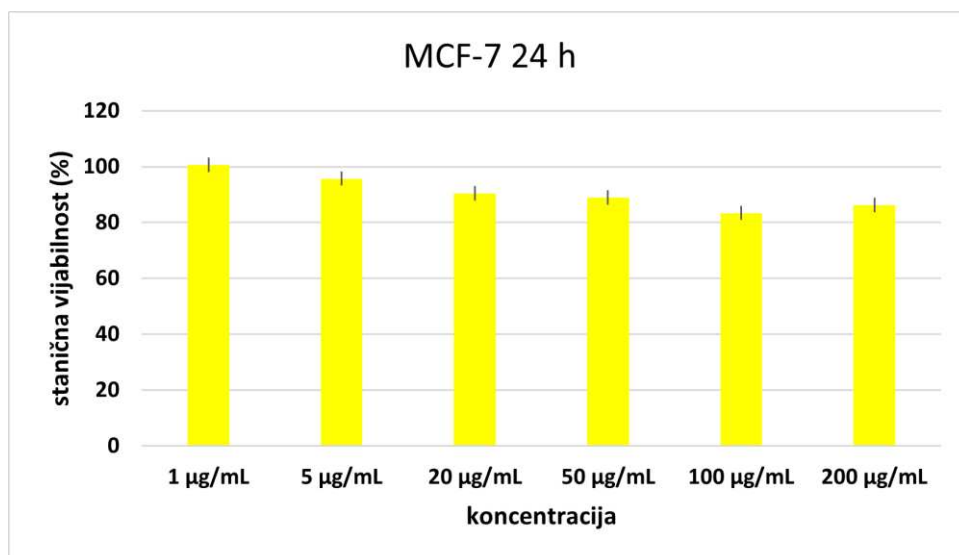


**Slika 16.** Citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnu liniju MCF-7 karcinoma dojke nakon 4 h (\* -  $p < 0,05$ )

**Tablica 10.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnoj liniji MCF-7 nakon 4 h

Koncentracija (µg/mL)	1	5	20	50	100	200
<i>p</i> vrijednost	0,8123	0,3593	0,9543	0,0272	0,7648	0,6474

Inkubacijom stanica karcinoma dojke stanične linije MCF-7 eteričnim uljem lavande u trajanju od 24 sata došlo je do smanjenja broja metabolički aktivnih stanica, ali rezultati nisu statistički značajni. Nije postignuta ni  $IC_{50}$  vrijednost.

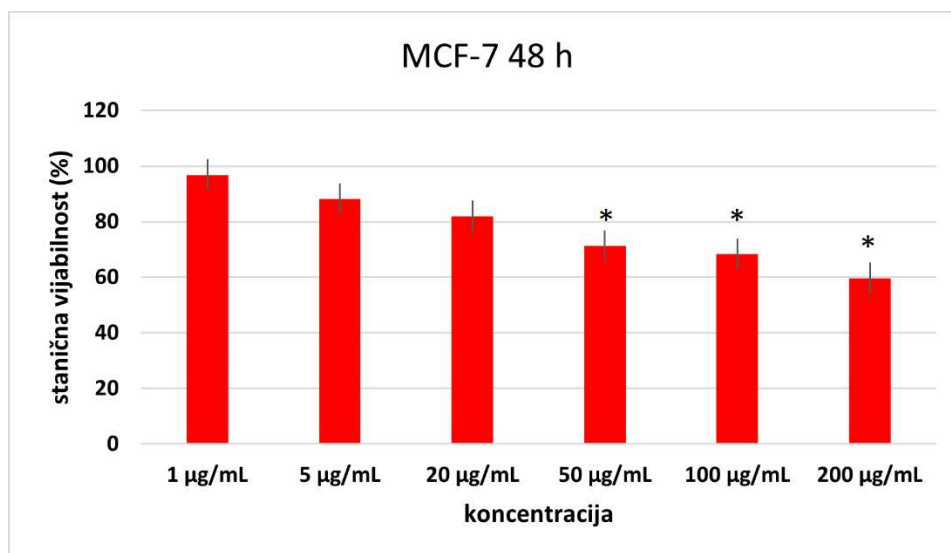


**Slika 17.** Citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnu liniju MCF-7 karcinoma dojke nakon 24 h

**Tablica 11.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnoj liniji MCF-7 nakon 24 h

Koncentracija (µg/mL)	1	5	20	50	100	200
<b>p vrijednost</b>	0,9636	0,6989	0,4124	0,28	0,1466	0,1963

Nakon 48 sati inkubacije stanične linije raka dojke MCF-7 eteričnim uljem lavande konačno se zapaža smanjenje broja živih stanica i to u ovisnosti o koncentraciji. Kao i kod 48-satne inkubacije stanične linije MDA-MB-231, rezultati su statistički značajni za koncentracije od 50, 100 i 200 µg/mL. Najbolji rezultat postignut je pri 200 µg/mL i iznosi 59,68%. Kao i ranije, IC<sub>50</sub> nije dostignut.

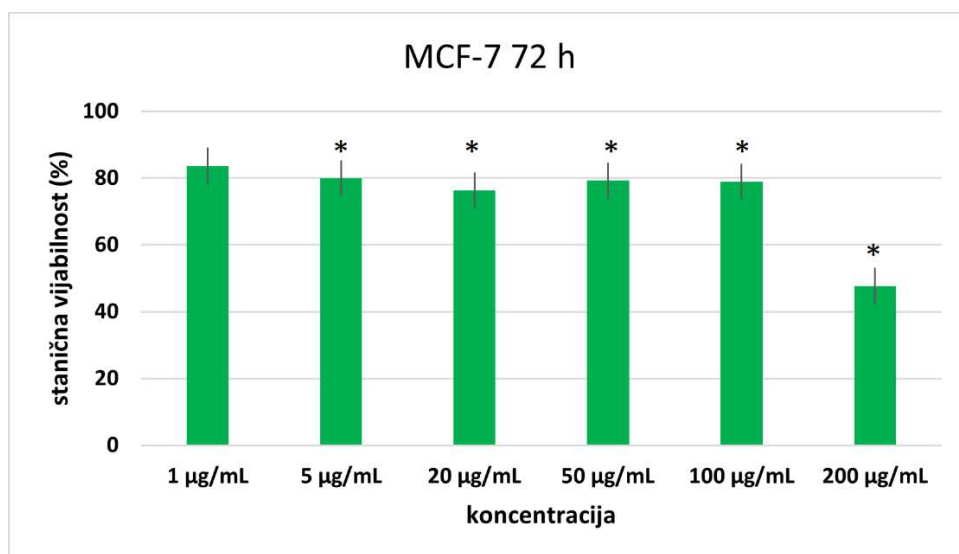


**Slika 18.** Citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnu liniju MCF-7 karcinoma dojke nakon 48 h (\* -  $p < 0,05$ )

**Tablica 12.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnoj liniji MCF-7 nakon 48 h

Koncentracija (µg/mL)	1	5	20	50	100	200
<i>p</i> vrijednost	0,782	0,3046	0,1118	0,0219	0,0164	0,0066

Tretiranje stanica stanične linije MCF-7 eteričnim uljem lavande u trajanju od 72 sata dovelo je do očekivanog smanjenja stanične vijabilnosti, i to statistički značajnog za skoro sve mjerene koncentracije. Za gotovo sve koncentracije stanična vijabilnost se smanjila na oko 80%, a najbolji rezultat ponovno je dobiven za koncentraciju od 200 µg/mL i iznosi 47,73%. IC<sub>50</sub> vrijednost je dostignuta i iznosi 190 µg/mL.



**Slika 19.** Citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnu liniju MCF-7 karcinoma dojke nakon 72 h (\* -  $p < 0,05$ )

**Tablica 13.** Statistička značajnost dobivenih rezultata za eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na staničnoj liniji MCF-7 nakon 72 h

Koncentracija (µg/mL)	1	5	20	50	100	200
<i>p</i> vrijednost	0,086	0,019	0,0116	0,0194	0,0246	0,00084



## **5. RASPRAVA**

Karcinom (rak) je drugi po redu uzrok smrti u svijetu nakon vodećih kardiovaskularnih bolesti. Prema podacima za 2020. godinu od raka umrlo približno 10 milijuna ljudi. Otkriveno je 19,3 milijuna novih slučajeva raka, od čega nešto više kod muškaraca (52%) nego kod žena (48%). Sličan je odnos i u Republici Hrvatskoj gdje su u 2020. godini dijagnosticirana 26 092 nova slučaja raka. Kod muškaraca najčešći su bili rak prostate, pluća, kolona, mokraćnog mjehura i rektuma, a kod žena rak dojke, kolona, pluća, tijela maternice i štitnjače. U istoj godini umrlo je 14 326 osoba, najviše od raka pluća i kolona (5-10).

U nastanku malignih bolesti važnu ulogu imaju i okolišni i genetski čimbenici. Glavni faktor rizika za nastanak karcinoma je dob jer se vremenom nakupljaju mutacije koje dovode to nastanka tumora. To dokazuje i činjenica da se više od 80% karcinoma javlja upravo kod starijih ljudi. Od rizičnih čimbenika vezanih uz životne navike mogu se izdvojiti pušenje (glavni uzročnik raka pluća), prisutnost karcinogena u hrani i izlaganje ultraljubičastom zračenju (važni faktor rizika za nastanak raka kože). Osim toga, i neki mikroorganizmi (bakterije i virusi) povezani su s povećanim rizikom za nastanak određenih karcinoma, a najpoznatiji je HPV kao uzročnik raka vrata maternice (11, 12).

Karcinom dojke se najčešće dijagnosticira od svih karcinoma, pogotovo u razvijenim zemljama. U 2020. godini zabilježeno je 2,26 milijuna novih slučajeva karcinoma dojke od ukupno 19,3 milijuna svih karcinoma. Također, rak dojke je glavni uzrok smrti od karcinoma kod žena. U razvijenim zemljama incidencija raka dojke se povećala zadnjih desetljeća zbog provođenja programa probira i poboljšanja dijagnostike što je doprinijelo povećanju stope preživljenja. Međutim, zbog produženja životnog vijeka, promjena u načinu života i ranijoj dijagnozi, očekuje se povećanje incidencije raka dojke i u manje razvijenim zemljama (11, 23).

Glavni rizični čimbenik za razvoj karcinoma dojke, kao i kod ostalih karcinoma, je starija životna dob. Pokazano je da dulja izloženost estrogenu utječe na pojavu raka dojke pa se kao čimbenici rizika vezani uz količinu estrogena u organizmu mogu navesti: starija životna dob pri prvom porođaju, manji broj trudnoća, rana menarha, kasna menopauza i uzimanje nekih lijekova (oralna kontracepcija i hormonska nadomjesna terapija). Nasuprot tome, dojenje djeluje protektivno i smanjuje rizik od nastanka raka dojke. Od ostalih rizičnih faktora ističu se debljina, pozitivna obiteljska anamneza i dobroćudna bolest dojke (24, 25).

Karcinom dojke najčešće se manifestira kao kvržica u dojci i može se napipati samopregledom dojke. Nakon što liječnik uzme anamnezu, ispita rizične čimbenike i fizički pregleda pacijenticu, bira metodu za dijagnosticiranje raka dojke. Dijagnostička metoda izbora kod premenopauzalnih žena je ultrazvuk, a kod žena u menopauzi mamografija. Nakon potvrde da se radi o karcinomu, određuje se veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i postojanje metastaza te radi li se o estrogen/progesteron pozitivnom, HER2 pozitivnom ili trostruko negativnom tumoru. Ti su podaci važni za odabir metode liječenja (26-29).

Osnova liječenja karcinoma dojke je kirurški zahvat kojim se uklanja cijela dojka (mastektomija) ili dio dojke (lumpektomija). Uz to, ovisno o kakvom se karcinomu dojke radi, adjuvantno se može primijeniti kemoterapija, radioterapija, hormonska terapija i imunoterapija. Kemoterapija antraciklinima i/ili taksanima ordinira se skoro svim pacijenticama. Hormonska terapija daje se ženama s estrogen ili progesteron pozitivnim rakom dojke, a najčešće se koriste tamoksifen ili anastrozol. Kod HER2 pozitivnog karcinoma dojke koristi se imunoterapija monoklonskim protutijelom trastuzumabom (32-37).

Lavanda je biljka karakterističnih plavih ili ljubičastih cvjetova korištena već u doba Antike zbog svog aromatičnog i terapijskog djelovanja. Raste samoniklo uglavnom na području Mediterana, a vrlo često se i uzgaja zbog upotrebe u industriji parfema i kozmetike te aromaterapiji. Najčešće uzgajane vrste lavande su *Lavandula angustifolia* (takozvana prava, obična ili engleska lavanda) i *Lavandula x intermedia* (lavandin). Lavandin je zapravo hibrid nastao križanjem dviju vrsta: prave lavande (*L. angustifolia*) i širokolisne lavande (*L. latifolia*) (38-40).

Eterična ulja obje vrste lavande sadrže slične kemijske spojeve (linalol, linalil-acetat, kamfor, borneol, 1,8-cineol), ali se razlikuju u udjelima pojedinih komponenti. Primjerice, eterično ulje prave lavande sadrži više linalola i linalil-acetata koji daju miris i poželjni su u parfemima, a manje kamfora, borneola i 1,8-cineola koji se smatraju nepoželjnim spojevima u industriji parfema, ali su značajni u aromaterapiji. Prema tome moglo bi se zaključiti da je *Lavandula angustifolia* vrjednija vrsta nego *Lavandula x intermedia*, ali lavandin se više uzgaja jer je otporniji, daje više prinosa i sadrži više eteričnog ulja. Zbog isplativosti eterično ulje lavandina dominira na svjetskom tržištu u usporedbi s onim prave lavande. U eteričnom ulju lavandina linalol i linalil-acetat čine preko 20% od svih komponenti, kamfor 5-10%, a

cineol nekoliko postotaka (38, 40). U eteričnom ulju *L. x intermedia* korištenom u istraživanju sadržaj linalola bio je dosta visok (52,50%), linalil-acetata malo manji (11,96%), a 1,8-cineola viši nego što je uobičajeno (17,93%) (52).

*Lavandula angustifolia* je jako istražena vrsta i zapaženo je njeno anksiolitičko, antidepresivno, antioksidativno, analgetsko, protuupalno, antimikrobno i citotoksično djelovanje. Za te učinke zaslužni su kemijski spojevi pronađeni u eteričnom ulju vrste *L. angustifolia* pa se pretpostavlja da bi i *Lavandula x intermedia* zbog sličnog kemijskog sastava mogla imati slična djelovanja (41-43, 45, 46).

Pretpostavljajući da su glavne komponente eteričnog ulja lavande odgovorne za njegove učinke, u nekim istraživanjima ispitano je citotoksično djelovanje linalola, linalil-acetata i 1,8-cineola na stanicama karcinoma. Tako je u jednom istraživanju ispitan i u konačnici potvrđen citotoksični učinak eteričnog ulja *L. angustifolia* te njegovih komponenti linalola i linalil-acetata na dvije stanične linije ljudskog karcinoma prostate. Antitumorski učinak ispitan *in vivo* i *in vitro* povezan je s inhibicijom stanične proliferacije i indukcijom apoptoze. Citotoksičnom učinku eteričnog ulja više je pridonio linalol nego linalil-acetat (57). U još jednom istraživanju pokazan je inhibitorni učinak linalola na proliferaciju stanica humanog karcinoma prostate, ali na drugoj staničnoj liniji. Linalol je spriječio prijelaz kroz G1 kontrolnu točku u staničnom ciklusu, inducirao je apoptozu *in vitro* i *in vivo*, smanjio ekspresiju Ki-67 i potaknuo imunološki odgovor stanica (58). U trećoj studiji istraživana su antitumorska svojstva linalola i 1,8-cineola na stanicama raka pluća *in vitro*. Oboje su inhibirali staničnu proliferaciju i migraciju stanica, ali nisu inducirali apoptozu kao kod drugih staničnih linija (59). Što se tiče istraživanja citotoksičnosti lavande na karcinomu dojke, provedena je studija u kojoj je eterično ulje vrste *L. angustifolia* s oko po 38% linalola i linalil-acetata te po 3% 1,8-cineola i kamfora korišteno za tretiranje stanica karcinoma dojke stanične linije MCF-7. Koncentracija eteričnog ulja rabljenog u istraživanju bila je 100 µg/mL, a nije postignut značajan citotoksični učinak (60).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati citotoksično djelovanje eteričnog ulja vrste *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na dvije stanične linije humanih karcinoma dojke: MDA-MB-231 i MCF-7. Citotoksičnost je ispitivana MTT testom, a rezultati su izraženi kao postotak broja metabolički aktivnih stanica (stanična vijabilnost).

Što se tiče stanične linije MDA-MB-231, nakon 4 sata inkubacije stanica nije zapažen značajniji citotoksični učinak. Nakon 24 sata inkubacije dobiveni su značajni rezultati za

koncentracije eteričnog ulja od 20, 100 i 200  $\mu\text{g/mL}$ , a stanična vijabilnost najviše se smanjila pri 20  $\mu\text{g/mL}$  i iznosi 74,14%. Nakon 48 i 72 sata opaženi su puno bolji rezultati. Primjećuje se opadanje broja preživjelih stanica u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja uz iznimku koncentracije od 50  $\mu\text{g/mL}$  gdje je djelovanje jače nego kod 100  $\mu\text{g/mL}$ . Najbolji rezultati ostvareni su pri koncentraciji od 200  $\mu\text{g/mL}$  i iznose 33,54% nakon 48 sati te 45,98% nakon 72 sata. Također, postignuta je i  $\text{IC}_{50}$  vrijednost: 141,42  $\mu\text{g/mL}$  nakon 48 i 150  $\mu\text{g/mL}$  nakon 72 sata.

MCF-7 stanična linija karcinoma dojke je tretirana istim koncentracijama eteričnog ulja lavande i rezultati su se mjerili nakon istog vremena. Suprotno očekivanom, nakon 4 sata inkubacije stanica eteričnim uljem koncentracija 100 i 200  $\mu\text{g/mL}$  došlo je do indukcije proliferacije stanica. Nakon 24 sata nije bio vidljiv takav utjecaj, nego su se vrijednosti stanične vijabilnosti smanjili, ali ti rezultati nisu bili statistički značajni. Tek nakon 48 sati opaža se očekivano smanjenje stanične vijabilnosti u ovisnosti o koncentraciji eteričnog ulja lavande. Najbolji rezultati opet je dobiven pri 200  $\mu\text{g/mL}$  i iznosi 59,68%. Nakon 72 sata inkubacije stanica smanjenje broja živi stanica bilo je značajno za sve koncentracije. Kao i u prethodnim slučajevima najbolji rezultat ponovno je izmjeren pri 200  $\mu\text{g/mL}$  (47,73%), a izračunata je i  $\text{IC}_{50}$  vrijednost (190  $\mu\text{g/mL}$ ).

Zaključno, može se primijetiti ovisnost citotoksičnosti o vremenu inkubacije i o koncentraciji eteričnog ulja lavande. Bolji rezultati dobiveni su nakon duže inkubacije te primjenom više koncentracije eteričnog ulja. Eterično ulje lavande pokazalo je dobre rezultate kod obje stanične linije, ali s nešto boljom citotoksičnom aktivnosti na MDA-MB-231 staničnoj liniji karcinoma dojke.  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti postignute su na obje stanične linije.

Temeljem dobivenih rezultata u *in vitro* ispitivanju, dokazano je citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. na dvije stanične linije karcinoma dojke: MDA-MB-231 i MCF-7. Time je potvrđena hipoteza i ostvaren cilj istraživanja.

## **6. ZAKLJUČCI**

- 1) Eterično ulje *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. pokazuje citotoksično djelovanje na stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 i MCF-7.
- 2) Postoji povezanost citotoksične aktivnosti s vremenom inkubacije stanica i koncentracijom eteričnog ulja.
- 3) Najbolji rezultat na staničnoj liniji MDA-MB-231 postignut je nakon 48 sati inkubacije eteričnim uljem koncentracije 200 µg/mL i iznosi 33,54% stanične vijabilnosti.
- 4) Najbolji rezultat na staničnoj liniji MCF-7 postignut je nakon 72 sata inkubacije eteričnim uljem koncentracije 200 µg/mL i iznosi 47,73% stanične vijabilnosti.
- 5) Veća citotoksična aktivnost eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* opaža se na staničnoj liniji MDA-MB-231.
- 6) Postignute su IC<sub>50</sub> vrijednosti na obje stanične linije: nakon 48 i 72 sata na staničnoj liniji MDA-MB-231 te nakon 72 sata na staničnoj liniji MCF-7.

## **7. LITERATURA**



1. Kos M, Batelja Vuletić L, Cindrić M. Novotvorine. U: Seiwerth S, Krušlin B, Kos M, Galešić Ljubanović D, urednici. Patologija. Šesto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2023. str. 151-53.
2. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica: molekularni pristup. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 725-26.
3. Kos M, Batelja Vuletić L, Cindrić M. Novotvorine. U: Seiwerth S, Krušlin B, Kos M, Galešić Ljubanović D, urednici. Patologija. Šesto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2023. str. 184.
4. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica: molekularni pristup. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 727-28.
5. Global cancer observatory [Internet]. 2020. Cancer today. [citirano 18.09.2023.]. Dostupno na: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=0&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0)
6. Global cancer observatory [Internet]. 2020. Cancer today. [citirano 18.09.2023.]. Dostupno na: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=0&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0)
7. Global cancer observatory [Internet]. 2020. Cancer today. [citirano 18.09.2023.]. Dostupno na: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=0&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4)
8. Global cancer observatory [Internet]. 2020. Cancer today. [citirano 18.09.2023.]. Dostupno na: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&gro](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&gro)

- up\_cancer=0&include\_nmsc=1&include\_nmsc\_other=1&half\_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4
9. Global cancer observatory [Internet]. 2020. Cancer today. [citirano 18.09.2023.]. Dostupno na: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=0&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4)
  10. Global cancer observatory [Internet]. 2020. Cancer today. [citirano 18.09.2023.]. Dostupno na: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=0&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=191&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0#collapse-group-0-4)
  11. Kos M, Batelja Vuletić L, Cindrić M. Novotvorine. U: Seiwert S, Krušlin B, Kos M, Galešić Ljubanović D, urednici. Patologija. Šesto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2023. str. 175-77.
  12. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Prevencija i rana dijagnostika zloćudnih tumora. U: Raić A, urednica. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 23-5.
  13. American association for cancer research [Internet]. 2022. New dimensions in cancer biology: updated hallmarks of cancer published. [citirano 18.09.2023.]. Dostupno na: <https://www.aacr.org/blog/2022/01/21/new-dimensions-in-cancer-biology-updated-hallmarks-of-cancer-published/>
  14. Cooper GM, Hausman RE. Rak. U: Lauc G, urednik. Stanica: molekularni pristup. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 730-33.
  15. Kos M, Batelja Vuletić L, Cindrić M. Novotvorine. U: Seiwert S, Krušlin B, Kos M, Galešić Ljubanović D, urednici. Patologija. Šesto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2023. str. 178.
  16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100:57-70.
  17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144:646-74.

18. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, urednica. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 4-8.
19. Kos M, Batelja Vuletić L, Cindrić M. Novotvorine. U: Seiwerth S, Krušlin B, Kos M, Galešić Ljubanović D, urednici. Patologija. Šesto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2023. str. 162-67.
20. Pagliarini R, Shao W, Sellers WR. Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. *EMBO Rep.* 2015;16:280-96.
21. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, urednica. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 8-10.
22. Kos M, Batelja Vuletić L, Cindrić M. Novotvorine. U: Seiwerth S, Krušlin B, Kos M, Galešić Ljubanović D, urednici. Patologija. Šesto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2023. str. 167-69.
23. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br J Radiol.* 2022;95:20211033.
24. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, urednica. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 203-05.
25. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D i sur. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int.* 2022;2022:9605439.
26. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, urednica. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 206-07.
27. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Prevencija i rana dijagnostika zloćudnih tumora. U: Raič A, urednica. Klinička onkologija. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 27.
28. Tomić S, Milković Periša M, Mrkličić I, Jakić Razumović J, Kuzmac S. Bolesti dojke. U: Seiwerth S, Krušlin B, Kos M, Galešić Ljubanović D, urednici. Patologija. Šesto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2023. str. 646-53.
29. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch.* 2018;472:697-703.

30. Research gate [Internet]. Breast cancer TNM classification. [citirano 23.09.2023.]. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/figure/Breast-cancer-TNM-classification\\_tbl1\\_41034402](https://www.researchgate.net/figure/Breast-cancer-TNM-classification_tbl1_41034402)
31. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*. 2010;81:1339-46.
32. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. 2017;50:33.
33. Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B, Weber WP, Poortmans P, Regan MM i sur. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol*. 2021;32:1216-1235.
34. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2016;57 Suppl 1:9S-16S.
35. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Rak dojke. U: Raič A, urednica. *Klinička onkologija*. Treće obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 210-11.
36. Figueroa-Magalhães MC, Jelovac D, Connolly R, Wolff AC. Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast*. 2014;23:128-136.
37. Maadi H, Soheilifar MH, Choi WS, Moshtaghian A, Wang Z. Trastuzumab Mechanism of Action; 20 Years of Research to Unravel a Dilemma. *Cancers (Basel)*. 2021;13:3540.
38. Plants of world online [Internet]. Lavandula. [citirano 26.09.2023.]. Dostupno na: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:20960-1>
39. Pokajewicz K, Czarniecka-Wiera M, Krajewska A, Maciejczyk E, Wieczorek PP. *Lavandula* × *intermedia*-A Bastard Lavender or a Plant of Many Values? Part I. Biology and Chemical Composition of Lavandin. *Molecules*. 2023;28:2943.
40. Blažeković B, Vladimir-Knežević S, Brantner A, Štefan MB. Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka': a comparative study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules*. 2010;15:5971-87.
41. Pokajewicz K, Czarniecka-Wiera M, Krajewska A, Maciejczyk E, Wieczorek PP. *Lavandula x intermedia*-A Bastard Lavender or a Plant of Many Values? Part II. Biological Activities and Applications of Lavandin. *Molecules*. 2023;28:2986.

42. Kim M, Nam ES, Lee Y, Kang HJ. Effects of Lavender on Anxiety, Depression, and Physiological Parameters: Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Nurs Res (Korean Soc Nurs Sci)*. 2021;15:279-290.
43. Firoozeei TS, Feizi A, Rezaeizadeh H, Zargaran A, Roohafza HR, Karimi M. The antidepressant effects of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.): A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Complement Ther Med*. 2021;59:102679.
44. Xu Y, Ma L, Liu F, Yao L, Wang W, Yang S i sur. Lavender essential oil fractions alleviate sleep disorders induced by the combination of anxiety and caffeine in mice. *J Ethnopharmacol*. 2023;302:115868.
45. Silva GL, Luft C, Lunardelli A, Amaral RH, Melo DA, Donadio MV i sur. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *An Acad Bras Cienc*. 2015;87:1397-408.
46. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents-myth or real alternative? *Molecules*. 2019;24:2130.
47. Culture collections [Internet]. MDA-MB-231 cell line profile. [citirano 30.09.2023.]. Dostupno na: <https://www.culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>
48. ATCC [Internet]. Products MDA-MB-231. [citirano 30.09.2023.]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/htb-26>
49. Culture collections [Internet]. MCF7 cell line profile. [citirano 30.09.2023.]. Dostupno na: <https://www.culturecollections.org.uk/media/130237/mcf7-cell-line-profile.pdf>
50. ATCC [Internet]. Products MCF7. [citirano 30.09.2023.]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/htb-22>
51. Merck [Internet]. MTT assay protocol for cell viability and proliferation. [citirano 30.09.2023.]. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>
52. Ninčević Runjić T, Popović M, Grdiša M, Šatović Z. Chemical diversity od essential oil from lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel) landraces in Croatia. 58th croatian & 18th international symposium on agriculture book of abstracts. Carović-Stanko K, Širić I (ur.). Zagreb: Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2023. str. 90.

53. Kamatou GPP, Viljoen AM. Linalool – a review of a biologically active compound of commercial importance. *Natural Product Communications*. 2008;3.
54. Pubchem [Internet]. Linalyl acetate. [citirano 15.10.2023.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalyl-acetate#section=EPA-Substance-Registry-Services-Tree>
55. Pries R, Jeschke S, Leichtle A, Bruchhage KL. Modes of action of 1,8-cineol in infections and inflammation. *Metabolites*. 2023;13:751.
56. Chen W, Vermaak I, Viljoen A. Camphor--a fumigant during the Black Death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon--a review. *Molecules*. 2013;18:5434-54.
57. Zhao Y, Chen R, Wang Y, Qing C, Wang W, Yang Y. In vitro and in vivo efficacy studies of lavender *angustifolia* essential oil and its active constituents on the proliferation of human prostate cancer. *Integr Cancer Ther*. 2017;16:215-226.
58. Zhao Y, Cheng X, Wang G, Liao Y, Qing C. Linalool inhibits 22Rv1 prostate cancer cell proliferation and induces apoptosis. *Oncol Lett*. 2020;20:289.
59. Rodenak-Kladniew B, Castro MA, Crespo R, Galle M, García de Bravo M. Anti-cancer mechanisms of linalool and 1,8-cineole in non-small cell lung cancer A549 cells. *Heliyon*. 2020;6:e05639.
60. Fahmy MA, Farghaly AA, Hassan EE, Hassan EM, Hassan ZM, Mahmoud K i sur. Evaluation of the anti-cancer/anti-mutagenic efficiency of *Lavandula officinalis* essential oil. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2022;23:1215-1222.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja bio je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* na dvije stanične linije karcinoma dojke: MDA-MB-231 i MCF-7. Pretpostavka je bila da će se nakon izlaganja stanica eteričnom ulju broj metabolički aktivnih stanica smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Materijali i metode:** Citotoksično djelovanje ispitano je pomoću MTT testa koji služi za procjenu stanične vijabilnosti. Obje stanične linije inkubirane su eteričnim uljem lavande u koncentracijama 1, 5, 20, 50, 100 i 200 µg/mL i promatrani su učinci nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Usporedbom apsorbancije nastalog produkta formazana kod stanica izloženih eteričnim uljem i kontrole skupine određen je postotak živih, metabolički aktivnih stanica.

**Rezultati:** Rezultati istraživanja citotoksičnog učinka eteričnog ulja lavande na stanicama karcinoma dojke prikazani su grafički kao ovisnost stanične vijabilnosti i koncentracije eteričnog ulja. Najbolji učinak na staničnoj liniji MDA-MB-231 opažen je nakon 48 sati inkubacije eteričnim uljem koncentracije 200 µg/mL, gdje je stanična vijabilnost iznosila 33,54%. Najveći učinak na staničnoj liniji MCF-7 također je primijećen pri koncentraciji od 200 µg/mL, ali nakon 72 sata inkubacije kada se stanična vijabilnost smanjila na 47,73%.

**Zaključak:** Eterično ulje *Lavandula x intermedia* pokazuje citotoksično djelovanje na stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 i MCF-7. Postoji povezanost citotoksične aktivnosti s vremenom inkubacije stanica i koncentracijom eteričnog ulja. Veća citotoksična aktivnost eteričnog ulja opaža se na staničnoj liniji MDA-MB-231. Postignute su  $IC_{50}$  vrijednosti na obje stanične linije: nakon 48 i 72 sata na staničnoj liniji MDA-MB-231 te nakon 72 sata na staničnoj liniji MCF-7.



## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Cytotoxic effect of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. essential oil on two breast cancer cell lines

**Objective:** The aim of the research was to examine the potential cytotoxic effect of *Lavandula x intermedia* essential oil on two breast cancer cell lines: MDA-MB-231 and MCF-7. The assumption was that after exposure of cells to essential oil, the number of metabolically active cells will decrease compared to the control group.

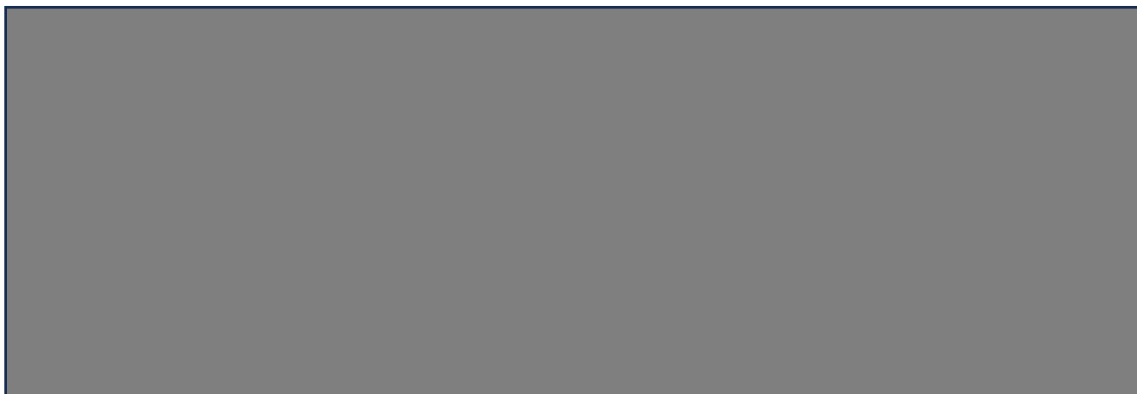
**Materials and methods:** Cytotoxic activity was tested using the MTT test, which serves to assess cell viability. Both cell lines were incubated with lavender essential oil in concentrations of 1, 5, 20, 50, 100 and 200 µg/mL and the effects were observed after 4, 24, 48 and 72 hours. By comparing the absorbance of the resulting formazan product in cells exposed to essential oil and the control group, the percentage of living, metabolically active cells was determined.

**Results:** The results of the investigation of the cytotoxic effect of lavender essential oil on breast cancer cells are shown graphically as a dependence of cell viability and the concentration of essential oil. The best effect on the MDA-MB-231 cell line was observed after 48 hours of incubation with essential oil at a concentration of 200 µg/mL, where cell viability was 33.54%. The greatest effect on the MCF-7 cell line was also observed at a concentration of 200 µg/mL, but after 72 hours of incubation when the cell viability decreased to 47.73%.

**Conclusion:** The essential oil of *Lavandula x intermedia* shows a cytotoxic effect on breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. There is a correlation between cytotoxic activity and both incubation time of the cells and the concentration of the essential oil. Greater cytotoxic activity of the essential oil is observed on the cell line MDA-MB-231. IC<sub>50</sub> values were achieved on both cell lines: after 48 and 72 hours on the MDA-MB-231 cell line and after 72 hours on the MCF-7 cell line.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNİ PODACI:**



## **OBRAZOVANJE:**

- **2006. – 2014.** Osnovna škola „Bijaći”, Kaštel Novi, Republika Hrvatska
- **2014. – 2018.** V. gimnazija „Vladimir Nazor”, Split, Republika Hrvatska
- **2018. – 2023.** Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, studij: Farmacija

## **RADNO ISKUSTVO:**

- **20.02.2023. – 25.08.2023.** Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Kaštel Sućurac te Analitičkom i Galenskom laboratoriju Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije

## **POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik (B2), talijanski jezik (B2)

**Vozačka dozvola:** B kategorija