

Citotoksično djelovanje "Ononis spinosa", "Geranium macrorrhizum", "Calendula officinalis" i "Achillea millefolium" na različite stanične linije humanih karcinoma

Modrić, Mirko

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:071800>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



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

Mirko Modrić

**Citotoksično djelovanje „*Ononis spinosa*“, „*Geranium macrorrhizum*“,
„*Calendula officinalis*“ i „*Achillea millefolium*“
na različite stanične linije humanih karcinoma.**

Diplomski rad

Akademska godina 2015./2016.

Mentor: doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, rujan, 2016. godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska kemija i biokemija
Tema rada je prihvaćena na . sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na . sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i . sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, doc. dr. sc. Mila Radan

Citotoksično djelovanje „*Ononis spinosa*“, „*Geranium macrorrhizum*“, „*Calendula officinalis*“ i „*Achillea millefolium*“ na različite stanične linije humanih karcinoma.

Mirko Modrić, broj indeksa 41

Sažetak:

Cilj istraživanja bilo je ispitati citotoksično djelovanje biljaka: zečji trn (*Ononis spinosa*), zdravac (*Geranium macrorrhizum*), stolisnik (*Achillea millefolium*) te neven (*Calendula officinalis*) na karcinomske stanice pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4. Pretpostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih staničnih linija biljnom ekstratu smanjiti preživljenje karcinomskih stanica, to jest broj karcinomskih stanica će biti manji u odnosu na kontrolnu skupinu stanica koje nisu izložene ekstraktima. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata MTT testom. Ovo istraživanje pokazalo je da *in vitro* izlaganje stanica karcinoma pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4, ekstraktima biljaka zečji trn, zdravac, stolisnik te neven dovodi do smanjenog preživljenja tih stanica. Smanjeno preživljenje nije jednako kod svih biljnih ekstrakata, kod jednakih koncentracija i vremenskih intervala izloženosti djelovanja. Smanjenje preživljenja nije uvijek bilo u razmjeru s povećanjem koncentracije ekstrakta.

Ključne riječi: biljke, karcinom, citotoksičnost, MTT

Rad sadrži: 69 stranica, 21 slika, 12 tablica, 27 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Janoš Terzić - predsjednik
2. doc.dr. sc. Mila Radan - član
3. doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić - član-mentor

Datum obrane: 30. rujna. 2016.

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

Cytotoxic activity “*Ononis spinosa*”, “*Geranium macrorrhizum*”, “*Calendula officinalis*”, and “*Achillea millefolium*” in various human cancer cell lines.

Mirko Modrić, index number 41

Summary:

Our goal was to examine cytotoxic effect of plants: Restharrow (*Ononis Spinosa*), Bevan's Variety (*Geranium macrorrhizum*), Yarrow (*Achillea millefolium*) and Marigold (*Calendula officinalis*) on lung cancer cells A-549, breast cancer cells MDA-MB-231 and urinary bladder cancer cells T24 and RT4. According to the hypothesis, the survival rate of cancer cells will be reduced after exposure of cancer cell lines to herbal extract, meaning that the number of cancer cells will be lesser in relation to control group of cells which are not exposed to herbal extract. The cytotoxicity was determined after 4, 24, 48 and 72 hours by MTT test. This research shows that *in vitro* exposure of lung cancer cells A-549, breast cancer cells MDA-MB-231 and urinary bladder cancer cells T24 and RT4 to the plant extracts of Restharrow, Bevan's Variety, Yarrow and Marigold leads to reduced survival rate of those cells. The reduced survival rate is not equal to every plant extract, to equal concentrations and time intervals of the exposure. The reduced survival rate was not always in proportion to the increase of the concentration of the extract.

Keywords: plants, cancer, cytotoxicity, MTT

Thesis contains: 69 pages, 21 figures, 12 tables, 27 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|-------------|
| 1. Full prof. Janoš Terzić, PhD | chairperson |
| 2. Assist. prof. Mila Radan, PhD | member |
| 3. Assist. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD | supervisor |

Defence date: September 30, 2016.

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. KARCINOM PLUĆA	2
1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA	3
1.3. KARCINOM DOJKE.....	4
1.4. ZEČJI TRN.....	6
1.6. NEVEN	14
1.7. IGLICA	16
1.7.1. Zdravac (Geranium macrorrhizum L.)	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. STANIČNE LINIJE:	21
3.2. POSTUPAK	24
3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI	25
4. REZULTATI.....	27
4.1. KARCINOM PLUĆA - A-549.....	28
4.1.1. Rezultati ukupno:	28
4.1.2. Rezultati prema biljkama:.....	30
4.2. KARCINOM DOJKE – MDA- MB - 231	31
4.2.1. Rezultati ukupno:	31
4.2.2. Rezultati prema biljkama:.....	35
4.3 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA - RT4.....	37
4.3.1. Rezultati ukupno:	37
4.3.2. Rezultati prema biljkama:.....	40
4.4. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA - T24	42
4.4.1. Rezultati ukupno:	42
4.4.2. Rezultati prema biljkama:.....	46
5. RASPRAVA.....	48
6. ZAKLJUČAK	56
7. LITERATURA.....	58
8. SAŽETAK.....	62
9. SUMMARY	65
10. ŽIVOTOPIS	68

Zahvale

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić na povjerenju, savjetima te pomoći u izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Mili Radan na savjetima i pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Striboru Markoviću, mag. pharm. te prof. dr. sc. Marijani Zovko-Končić na preporučenoj literaturi korištenoj tijekom izrade diplomskog rada.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj potpori tijekom studija.

1. UVOD

1.1. KARCINOM PLUĆA

Prema Šamija i sur. primarni maligni tumori pluća daleko najčešće potječu iz transformiranih epitelnih stanica sluznice bronha, odnosno čine ih karcinomi bronha. Znatno rjeđe primarni maligni tumori pluća mogu biti podrijetlom i iz drugih stanica, primjerice karcinoidi, sarkomi itd. Stoga se uobičajilo da se naziv "rak pluća" upotrebljava u značenju karcinoma bronha (2).

Karcinom pluća najčešći je malignom u muškaraca, a u posljednjih nekoliko godina sve je češći i u žena. Histološki se primarni karcinomi pluća razvrstavaju u četiri osnovne skupine: karcinome pločastih stanica (epidermoidni, planocelularni), adenokarcinome, karcinome velikih stanica i karcinome malih stanica (mikrocelularni). Mogu se naći i miješani tumori, primjerice adenokarcinomi i planocelularni, malih i velikih stanica, planocelularni i malih stanica. Primarni karcinom pluća najčešće se otkriva u stupnju područne ili udaljene proširenosti, a što uvjetuje zapravo i općenito lošu prognozu bolesnika (petogodišnje preživljavanje manje od 10 do 15%) (2).

Uzrok karcinoma pluća je nepoznat. Obično se govori o multikazulnosti s jedne strane i o gomilanju mutiranih gena u epitelnim stanicama s druge strane. Centralni tipovi karcinoma pluća, među kojima su najčešći mikrocelularni i planocelularni, povezuju se s navikom pušenja. Postoji međuzavisnost stope smrtnosti i ukupne količine popušanih cigareta.

Nadalje Šamija i sur. navode da su klinički znakovi raznoliki i redovito nisu specifični za karcinom jer se opažaju i u drugim bolestima pluća. Sumnju na tumorsku bolest pobuđuje pojava smetnji dišnog sustava koje traju dulje vrijeme, posebice u starijih ljudi s anamnezom dugogodišnjeg pušenja većeg broja cigareta. Najčešći znakovi su kašalj u trajanju duljem od tri tjedna, bol u prsima, sukrvav ispljuvak, hemoptiza i dispneja. Intratorakalno širenje tumora može uzrokovati pojavu Pancoastova, Horneova sindroma i sindroma gornje šuplje vene, kompresije jednjaka, zahvaćenosti nervus rekurensa i/ili nervus frenikusa, pleuralnih izljeva, limfangioze pluća, infiltracije perikarda i srca itd. Prva simptomatologija može biti uvjetovana i pojavom izvantorakalnih metastaza, primjerice moždanih, jetrenih i koštanih. Uz to se mogu pojaviti i hormonalne smetnje, neuromuskularne i koagulacijske neravnoteže te poremećaji vezivnog i koštanog tkiva (paraneoplastički sindrom) (2).

1.2. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA

Epidemiologija:

Šamija i sur. tvrde da su maligni tumori mokraćnog mjehura rijetki, te da čine samo 2% svih malignih tumora u ljudi, te da su tri puta češći u muškaraca nego u žena. Otprilike bude otkriveno 15 novih karcinoma mokraćnog mjehura na 100.000 stanovnika na godinu. Iznimno se otkrivaju prije 40. godine života, vršna incidencija je u dobi od 50 do 70 godina. Sve to vjerojatno odražava profesionalnu izloženost industrijskim karcinogenima (anilinu, naftilaminu) i pušenju. Latencija od izloženosti do razvitka tumora je od 15 do 50 godina. Rak mokraćnog mjehura je bolest razvijenih, urbanih i industrijaliziranih zemalja. Genetičkim istraživanjima razjašnjeni su mnogi mehanizmi kojima karcinogeni inaktiviraju supresorski gen, induciraju onkogen i reguliraju čimbenike rasta stanica. Češća pojava tumora mokraćnog mjehura opažena je nakon liječenja ciklofosfamidom i uz infestaciju sa *Schistosoma haematium*. U tumora prouzročenih infestacijom parazitom nije otkriven točan uzrok nastanka, vjerojatno se radi o dugogodišnjoj upalnoj iritaciji (2).

Klinička slika:

Istraživanje je pokazalo da je najčešći znak tumora mokraćnog mjehura bezbolna hematurija (u 80% bolesnika). Disuričke smetnje (učestalo, bolno mokrenje, tenezmi) obično su izraz površne zahvaćenosti sluznice mjehura (papilarni karcinom ili karcinom *in situ*). Uznapredovala bolest direktnim urastanjem uzrokuje opstrukciju mokrenja (hidronefrozu) ili stolice (opstipaciju), limfedem noge (u), bolne, otopljive mase u maloj zdjelici, ili metastazira u udaljene organe (kosti, pluća, jetra) (2).

Šamija i sur. su otkrili da se histološki, karcinomi mokraćnog mjehura razvijaju u nizu predinvazivnih oblika: od hiperplazije epitela, preko atipične hiperplazije do displazije. Većina razvijenih tumora su karcinomi prijelaznog epitela (90 do 95%). Ostalo su karcinomi pločastih (7 do 8%) ili žljezdanih (1 do 2%) stanica. Oko 30% karcinoma mokraćnog mjehura inicijalno je multicentrično. Prema naravi bolesti, njezinu tijeku i načinu liječenja razlikujemo površinski karcinom (ca. *in situ* - CIS i papilarni) i mišićno-invazivni oblik. CIS je obično agresivan, slabo diferenciran, ekstenzivan i nalazi se na više mjesta u mokraćnom sustavu. Infiltrativni karcinom razvija se u 50 do 80% bolesnika s iritativnim simptomima i ekstenzivnim CIS-om. Karcinom mokraćnog mjehura širi se lokalnim širenjem, limfnim i hematogenim rasapom. Najčešća mjesta udaljene diseminacije su jetra, pluća i skelet.

Običajno prihvaćen način označavanja proširenosti bolesti je TNM sustav prema *International Union Against Cancer* (2).

1.3. KARCINOM DOJKE

Studije rađene u raznim zemljama pokazale su da je rak dojke najučestalija zloćudna bolest u žena i da je jedan od najvećih zdravstvenih problema u razvijenim zemljama svijeta. U Hrvatskoj na 100 žena umrlih od raka 12 do 15% otpada na rak dojke. Godišnje se u našoj zemlji otkrije 1.800 novih slučajeva raka dojke, a prema podacima Registra za rak, incidencija raka dojke u posljednja je dva desetljeća u porastu oko 4%. Smatra se da razlog tomu djelomično leži u boljoj dijagnostici i prosvjećivanju populacije, no čini se da incidencija raka dojke zaista u porastu. U Sjevernoj Americi 27% svih malignih bolesti u žena otpada na rak dojke, dok od ukupnoga broja umrlih od raka u SAD-u 18% otpada na žene umrle od raka dojke. Američka studija pokazala je da je kumulativni rizik od obolijevanja od raka dojke 10,2%, dok je kumulativni rizik za umiranje od te bolesti 3-6%. Incidencija raka dojke posebno se povećava u žena u postmenopauzi. Brojni istraživači i kliničari pokušavaju protumačiti ovu pojavu i otkriti njen uzrok. U isto vrijeme rak dojke jedan je od malobrojnih tumora u kojeg postoji valjan dokaz da se pomno razrađenim planom primarne prevencije može znatno smanjiti mortalitet. Pod primarnom prevencijom ovdje se misli na redovite mamografije žena u rizičnim skupinama i na edukaciju žena o samopregledu dojki. Zbog činjenice da je rak dojke vrlo čest, a u isto vrijeme i rak s relativno dobrom prognozom, on je vrlo česta tema rasprava u svjetskoj znanstvenoj javnosti (2).

Rizični čimbenici:

- *Genetički čimbenici:* Obolijevanje od raka dojke u prvoj rodbinskoj liniji (majka, sestra, kći) povećava rizik od pojave bolesti 2 do 3 puta u odnosu na žene bez takve obiteljske anamneze.
- *Menstrualni i reproduktivni rizični čimbenici:* Rana prva mjesečnica, kasna menopauza i kasna prva trudnoća smatraju se rizičnim čimbenicima. Žene koje nisu rađale također imaju povišen rizik od razvoja raka dojke. Studije su pokazale da žene koje su prvo dijete rodile nakon 30. godine imaju veći rizik za razvoj raka dojke od žena koje uopće nisu rađale. Rana prva trudnoća smanjuje rizik od nastanka karcinoma

dojke. Ovi podaci upućuju na zaključak da događaji između prve mjesečnice i prve trudnoće utječu na razvoj karcinoma dojke u kasnijem životu. Pokazalo se da žene u kojih je učinjena artificijelna menopauza prije 40. godine imaju nešto manji rizik.

- *Endokrini rizični čimbenici:* Utjecaj hormonske terapije (hormonska kontracepcija, hormonska nadomjesna terapija u postmenopauzi) još je predmet rasprava. Objavljene su mnoge kontradiktorne studije o povezanosti dugotrajne hormonske terapije s povećanim rizikom od obolijevanja od raka dojke, no konačnog zaključka još nema. Opširna studija provedena u SAD-u ustanovila je da konjugirani estrogeni koji se rabe u hormonskoj nadomjesnoj terapiji ne povećavaju rizik od obolijevanja od karcinoma dojke. S druge strane Švedska je studija pokazala da dugotrajno uzimanje estradiola može povećati rizik od razvoja raka dojke. Terapija estrogenima u kombinaciji s progesteronima pokazala je čak i veće povećanje rizika nego ona koja je rabila samo estrogene u bilo kojem obliku.
- *Prehrana kao rizični čimbenik:* Ne postoje studije koje sa sigurnošću definiraju vrstu prehrane koja nosi veći rizik od razvoja raka dojke, no očito je da pretila žene u postmenopauzi imaju povećan rizik od razvoja te bolesti.
- *Zračenje:* Pokazalo se da su žene koje su do 30. godine bile izložene većim dozama zračenja (tijekom radioloških dijagnostičkih i terapijskih postupaka, ili kod izloženosti nuklearnoj eksploziji) imaju povećan rizik. Najnovije su studije pokazale da žene u djetinjstvu osjetljivije su na zračenje nego u adolescentnoj dobi (2).

Kliničke značajke raka dojke:

Rak dojke je bolest koja se dugo razvija prije nego što postane klinički manifestna. Prosječno trajanje života u bolesnica koje odbiju bilo koje liječenje iznosi 2,5 do 3 godine, no nisu rijetki slučajevi gdje su bolesnice živjele bez terapije i 20 godina. Rak dojke je tumor sporijeg rasta i pokazalo se da se u prosjeku poveća tri puta u godinu dana. Smatra se da prosječnom tumoru treba 10 godina da od jedne stanice naraste do veličine od 1 cm. U posljednje 3 do 4 godine toga, pretkliničkog razdoblja, kada se broj tumorskih stanica procjenjuje na oko 10%, počinju se širiti mikrometastaze (2).

1.4. ZEČJI TRN

Ononidis radix- korijen zečjeg trna

Vrsta: *Ononis spinosa* L.- zečji trn, gladiš

Porodica: Fabaceae- lepirnjače

Izgled biljke:

Zečji je trn višegodišnja, zeljasta biljka, grmolikog rasta i s trnovitim izdancima, visoka oko 50 cm. Donji listovi su trodijelni, dok su listovi u vršnim izdancima obično jednostavni. Cvjetovi se razvijaju u pazušcima listova, a boje su crvenkasto grimizne ili ljubičaste. Biljka cvate od lipnja do rujna. Plod je mahuna jajolika oblika.



Slika 1. Zečji trn - *Ononis spinosa*

Stanište:

Zečji trn raste na oskudnom i suhom tlu livada i pašnjaka, najčešće u području vapnenca. Raste uz rubove šuma, živice, njiva i putova.

Rasprostranjenost:

Rasprostranjen je gotovo u cijeloj Europi, Aziji i sjevernoj Africi. Prema veličini i obliku cvijeta, i drugih dijelova biljke, kao i prema tome jesu li izdanci stabljike trnoviti ili ne, razlikuje se nekoliko podvrsta zečjeg trna. Za nas su najvažnije:

- *Ononis spinosa* subsp. *antiquorum* (L.) Briquet
- *Ononis spinosa* subsp. *legitima* (Delarbre) Briquet

Obje podvrste rastu i u našim krajevima.

Ljekarnički naziv:

Ononidis radix- korijen zečjeg trna

Oficijelan je u DAC 1986, ÖAB, Ph. Eur. 4.2.

Ononidis radix se sastoji od osušenoga korijena zečjeg trna, *Ononis spinosa* L. subsp. *spinosa*, Fabaceae.

Svojstva:

Korijen zečjeg trna je slaba ali karakteristična mirisa, okusa slatkasta, malo trpka i grebe u grlu.

Makroskopija:

Mlađi korijen je valjkast, slabo razgranat, žilav i gotovo uvijek savijen, do 50 cm dug i do 2 cm debeo. Izvana je sivosmeđe, a iznutra žućkaste boje. Starije korijenje je nešto deblje, tvrđe, uzdužno grbavo i izbrazdano. Prijelom je vlaknast. Poprečan presjek je nepravilan, katkad s jakim brazdama, vrlo tankom tamnosmeđom korom i debelim drvetom s izrazitim, svijetlim nepravilnim srčikim zrakama koje dopiru do centra.

Korijen dolazi u ljekarne isječen u nepravilne, vlaknaste komadiće, na kojima se zapaža ekscentrično zrakasta struktura drveta, karakteristična za korijen zečjeg trna.

Mikroskopija:

Široka se periderma sastoji od poligonalnih stanica tankih stjenki. Većinom se na posljednji red plutastih stanica nastavlja širok endofloem sa srčiknim zrakama od 1 do 20 redova stanica; u nekim se stanicama nalaze pojedinačni kristali kalcij-oksalata. U likovnoj se zraci često nalaze keratohim i nakupine tankih likovnica s vrlo odebljalim membranama, koje prate stanice s romboedrima kalcij-oksalata. Široko i tvrdo drvo rijetko je na presjeku okruglo i centrično građeno. Pojedine drvene zrake su često savijene više na jednu stranu, pa nastanu brazde i presjek je nepravilan. Srčikine zrake drveta šire se lepezasto prema van, a njihova širina varira kao i u kori. U parenhimu drveta u radijalnim redovima su manje ili veće nakupine točkastih traheja. Nakupine drvenčica s odebljalim, ali rijetko odrvenjelim membranama okružuju stanice s romboedrima kalcij-oksalata. U parenhinskim stanicama kore i drveta, kao i u srčiknim zrakama, ima sitnih zrnaca škroba.

Ononidis radicis pulvis: Prašak je žućkasto smeđ. Ima mnogo mehaničkih elemenata, stanica pluta, parenhima kore s kristalima kalcij-oksalata, dijelova s točkastim trahejama i škrobnih zrnaca.

Identifikacija:

Mikrosublimacijom praška korijena nastaje pri temperaturi oko 220°C sublimat onokola u obliku bezbojnih ili slabo žutih zavijenih do zvjezdasto razgranatih kristala ili kapljica. Kad se sublimat ovlaži s 1 kapi koncentrirane sulfatne kiseline i 1 kapi etanolne otopine vanilina, oboji se nakon 5-10 min ljubičasto.

Identitet biljnog materijala se provjerava i metodom kromatografije na tankom sloju. Na razvijenom kromatogramu identificira se zona onokola.

Ispitivanje stupnja čistoće:

- STRANE PRIMJESE: ne više od 2% (DAC 1986).
- PRIMJESE KORIJENA SA STABLJIKOM: ne više od 5% (ÖAB).
- GUBITAK SUŠENJEM: ne više od 10% (DAC).
- PEPEO: ne više od 7,0% (DAC).
- PATVORINE: ne smije biti tankih komada okruglog presjeka s izrazitom srčikom (*Medicago sativa* L.), kao ni dijelova drugačije anatomske građe (druge vrste i podvrste *Ononis*).
- ČUVANJE: na suhome mjestu, zaštićeno od svjetlosti i kukaca.

Kemijski sastav:

Korijen zečjeg trna sadrži izoflavone s glavnom sastavnicom ononinom (formononetin-7-glukozid), pterokarpanski derivat trifolizirin, zatim oko 0,2% triterpena α -onocerina (=onokola), sitosterola. Miris korijena potječe od 0,02-0,1% eteričnog ulja u kojemu je glavna sastavnica trans-anetol uz manje količine karvona i mentola.

Djelovanje i uporaba:

Korijen zečjeg trna je poznat zbog diuretskog djelovanja koje je farmakološki potvrđeno. Ne zna se sa sigurnošću koje sastavnice izazivaju taj učinak. Jedna skupina znanstvenika misli da diuretski učinak potječe od izoflavonaanonina, a druga skupina od triterpenaonokola. Korijen zečjeg trna je sastavni dio diuretskih ljekovitih pripravaka, koji djeluju blaže od pripravaka s *Juniperi fructus* jer ne podražuju epitel bubrega.

U pučkoj medicini korijen zečjeg trna rabi se i u terapiji reumatskih bolesti.

Ljekoviti oblici:

Species diureticae - čaj za mokrenje, u biljnim miksturama, u obliku dražeja (3).

1.5. STOLISNIK

Millefolii herba (flos)- stolisnikova zelen, stolisnikov cvijet

Vrsta: *Achillea millefolium* L.- stolisnik, obični stolisnik

Porodica: Asteraceae - glavočike

Izgled biljke:

Stolisnik je višegodišnja biljka, do 80 cm visoke stabljike koja raste iz vodoravnog podzemnog dijela i ima mnogo dugih i višestruko perasto rascijepljenih listova. Sitne su glavice bijelih jezičastih cvjetova skupljene u gustom cvatu na vrhu stabljike. Cijela je biljka manje – više dlakava i mirisna.



Slika 2. Stolisnik - *Achillea millefolium*

Stanište i rasprostranjenost:

Stolisnik raste po livadama, pašnjacima, poljima i vrtovima. Rasprostranjen je u Europi i Aziji (od Irana preko Himalaje, Kavkaza sve do Sibira). Ima ga u Sjevernoj Americi kao i u Australiji.

Ljekarnički naziv:

Millefolii herba, Millefolii flos – stolisnikova zelen, stolisnikov cvijet

Stolisnikova je zelen oficinalna u DAB 10 (Schafgarbenkraut), u ÖAB (*Herba Millefolii*), a stolisnikov cvijet u Ph. Helv. VII (*Millefolii flos*). *Millefolii herba* je i u dodatku Europske farmakopeje iz 1999.

Millefolii herba se sastoji od osušenih vršaka stolisnika u cvatu *Achillea millefolium* L.

Mora sadržavati najmanje 0,2% eteričnog ulja i najmanje 0,02% proazulena računano kao kamazulen (DAB 10).

Mora sadržavati najmanje 0,3% (ÖAB) odnosno najmanje 0,20% (Ph. Helv .VII) eteričnog ulja.

Svojstva:

Mirisa je aromatična, a okusa gorko aromatična i blago slankastog.

Morfologija:

Stabljika je okrugla, zelenkaste boje, a pri vrhu se grana. Prizemni listovi imaju peteljku, a gornji obuhvaćaju stabljiku i naizmjenično su izrasli. Duguljastog su ili trakastog oblika, dužine i do 20 cm (osobito listovi iz rozete), različite su širine, dvostruko ili trostruko rascijepljeni. Rub im je nazubljen. Mlađi su listovi dlakaviji od starijih. Ovalne cvjetne glavice su promjera do 5 mm i na kratkoj su peteljci. Cvjetovi su skupljeni u dvostruki paštitač. Na izdignutom cvjetištu ima 4-5 jezičastih, ženskih cvjetova bijele boje. Cjevastih, hermafroditinih, žutih cvjetova s crvenkastim rubom vjenčića ima 3-20.

U ljekarne dolazi i koncizirana zelen, koja se prepoznaje prema karakterističnim cvjetnim glavicama, dijelovima listova i komadićima stabljike sa srži i dugim dlakama.

Mikroskopija:

Epidermalne stanice lista su često s kutikularnim pruganjima. Puči su na objema epidermama, a žlijezda tipa Asteraceae ima više na donjoj strani lista. Duge, višestanične dlake nalaze se na ovojnim listićima i na peteljci lista. Epidermalne stanice vjenčića su poligonalne, a na rubu cjevastih cvjetova neke su produžene u papile.

Identifikacija:

Europska farmakopeja (Ph. Eur. Suppl. 1999) propisuje ispitivanje identiteta i kromatografijom na tankom sloju. Poredbene supstancije su: 1,8-cineol i gvajazulen. Zagrijavanjem ploče uz propisani reagens nastaje iz proazulena kamazulen.

Ispitivanje stupnja čistoće:

- STRANE PRIMJESE: ne više od 2% (DAB 10, ÖAB, Ph. Eur.), ne više od 3% (Ph. Helv. VII).
- STABLJIKE: ne više od 5% (DAB 10), promjera većeg od 3 mm (Ph. Eur.).
- PETELJKE IZ INFLORESCENCIJE: ne više od 10% (Ph. Helv. VII).
- GUBITAK SUŠENJEM: ne više od 10% (DAB 10), ne više od 12% (Ph. Eur.).
- PEPEO: ne više od 10%, a u kiselini netopivog ne više od 1% (DAB 10).
- PEPEO: ne više od 8% (ÖAB), ne više od 10,0% (Ph. Eur.).
- SULFATNI PEPEO: ne više od 10% (Ph. Helv. VII).
- GORČINA: ne manja od 5000 (DAB 10).
- ČUVANJE: zaštićeno od svjetla i vlage, ne u plastičnim posudama.

Kemijski sastav:

Stolisnik sadrži 0,2-1% eteričnog ulja, čiji kemijski sastav jako ovisi o podrijetlu biljnog materijala. *Achillea millefolium* je morfološki, citogenetski i kemijski jako polimorfna vrsta. Zato Europska farmakopeja propisuje najmanji sadržaj proazulena pa su time svojite bez proazulena isključene.

Uz eterično ulje, u stolisniku ima flavonoida-7-O-glikozidaapigenina i lineolina, C-glikozilflavona- orijentina i izoorijentina, fenolkarbonskih kiselina i kumarina.

Djelovanje i uporaba:

Stolisnik i njegovi ljekoviti pripravci djeluju protuupalno (seksviterpenskilaktoni, azuleni), spazmolitički (eterično ulje i flavonoidi), antimikrobno i antifugalno (eterično ulje-seskviterpenskilaktoni i poliacetileni). Prema rezultatima istraživanja japanskih autora, pripravci stolisnika imaju i antitumorsko djelovanje.

Stolisnik je lijek sličan kamilici i u potpunosti je može zamijeniti. Glavno područje djelovanja su dispeptičke tegobe, grčevi u želučano-probavnom traktu. Lokalno se primjenjuje u balneoterapiji i kod kožnih bolesti. Stolisnik je veoma cijenjen u pučkoj medicini, npr. za zacjeljivanje rana (hajdučka trava) (3).

1.6. NEVEN

Vrsta: *Calendula officinalis* – neven

Porodica: Asteraceae - glavočike

Izgled biljke:

Jednogodišnja ili rjeđe dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice glavočika, visine od 30 do 50 cm, razgranate, uspravne i dlakave stabljike, dlakavih i duguljastih listova, glavice od tamnožute do narančaste boje.



Slika 3. Neven - *Calendula officinalis*

Nalazište:

Neven se može naći u nekim dijelovima Europe, SAD-a, i Kanade.

Upotreba:

Neven se koristi topikalno za liječenje različitih kožnih oboljenja kao što su varikozne vene, modrice, opekline osipi, itd.. Također topikalno se koristi za zaliječivanje ispucale kože i u aromaterapiji. Interno se koristi za liječenje probavnih tegoba te za poticanje probave. Također i interno i topikalno se koristi za liječenje upala sluznica grla i ždrijela.

Moguća upotreba:

Studije su fokusirane na dokazivanje antitumorskog te protuupalnog učinka nevena.

Ljekoviti oblici:

Dostupni oblici: vodica za usta, mast, čaj, tinktura.

Dio biljke koji se koristi: cvijet.

Farmakologija:

Farmakokinetika i farmakodinamika su nepoznate.

Antitumorska aktivnost:

Prisutna su istraživanja u kojima se koristio lutein, kemijska komponenta nevena, kao antitumorski agens. Miševi tretirani luteinom iz ekstrakta nevena su nakon dva tjedna inokulirani s tumorskim stanicama. Stanična proliferacija je mjerena kroz 70 dana. Niže koncentracije luteina dovele su do smanjenja incidencije tumora dojke, smanjenja rasta tumora, i lipidne peroksidacije, dok se veće koncentracije nisu pokazale tako uspješne. Istraživači su zaključili da niske koncentracije luteina mogu usporiti rast tumora dojki. Ranija studija je pokazala slične rezultate (1).

1.7. IGLICA

Karakteristike:

Iglica (*Geranium* L.) je rod jednogodišnjih ili trajnih biljaka iz istoimene porodice iglica (*Geraniaceae*). Rod sadrži preko 400 vrsta. Velik broj vrsta raste u prirodi na području jugoistočne Europe, no neke od njih se uzgajaju kao ukrasne biljke u cvjetnjacima. Smatraju se dobrim medonosnim biljkama, pčele sakupljaju nektar i pelud. Latinsko ime roda *Geranium* potječe od grčke riječi *geranos* (ždral), zbog kljunastih plodova. Sve iglice su jako dobre medonosne biljke. Pčele ih salijeću skupljajući nektar i pelud.

Najznačajnije vrste kod nas:

- pastirska iglica (*Geranium robertianum*)
- smeđa iglica (*Geranium phaeum*)
- zdravac (*Geranium macrorrhizum*)
- crvena iglica (*Geranium sanguineum*) (4)

1.7.1. Zdravac (*Geranium macrorrhizum* L.)

Izgled biljke:

Često se uzgaja kao ukrasna vrsta u dvorištima i parkovima. Listovi su veliki, tupo nazubljeni i gusto rastu prekrivajući tlo zbog čega je biljka pogodna za uzgoj kao niski ukrasni grmić u cvjetnjacima i kamenjarima. Listovi kada se prstima izmrve puštaju iznimno neugodan miris. Raste na vlažnim, sjenovitim mjestima, uz zidove i plotove. Trajnica je, visine do 40 cm, vrlo razgranata, dlakava. Cvjetovi su sićušni, zvjezdasti, ružičastocrveni.



Slika 4. Zdravac – *Geranium macrorrhizum*

Upotreba:

Kod upale grla grglja se čaj. Naljev se upotrebljava kod želučanih i crijevnih tegoba, proljeva novorođenčadi, bolova u želucu, grlu, reume i gihta te protiv kamenaca. Dobrim se pokazuje i kod upale bubrega. Kod upale očiju, upale živca lica i kod otečenih desni biljka se stavlja na bolno mjesto. Može se koristiti i u liječenju kožnih bolesti, poput svrbeža, ekcema, rana i upala (5).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi da li se ekstrakti biljaka: zečji trn (*Ononis spinosa*), zdravac (*Geranium macrorrhizum*), neven (*Calendula officinalis*) te stolisnik (*Achillea millefolium*) mogu potencijalno koristiti u liječenju različitih vrsta karcinoma. Hipoteza o potencijalnoj citotoksičnoj aktivnosti ispitivat će se na staničnim linijama karcinoma pluća A-549, karcinoma dojke MDA-MB-231 te karcinoma mokraćnog mjehura; linije RT4 i T24.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. STANIČNE LINIJE:

U *in vitro* istraživanju ispitivanje djelovanja ekstrakata biljaka se provodilo na karcinomskim stanicama T24 (Slika 5.), RT4, A-549 (Slika 7.) i MDA-MB-231 (Slika 6.). Obilježja tih staničnih linija su prikazana u tablicama 1, 2 te 3.

Tablica 1. Obilježja T24 i RT4 stanične linije (preuzeto sa <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

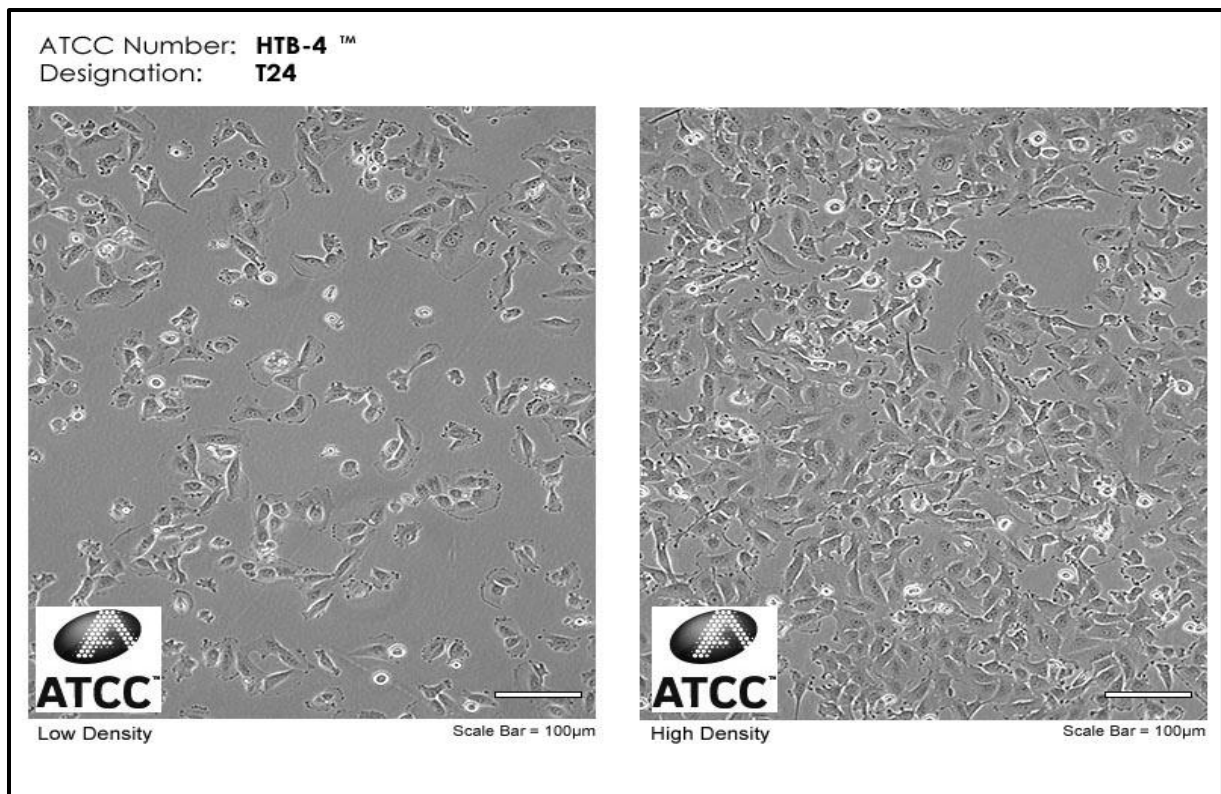
Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	mokraćni mjehur
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	Stanična linija T24: karcinom prijelaznih stanica
	Stanična linija RT4: papilom prijelaznih stanica
Dob i spol	63 godine, muškarac (RT4); 81 godina, žena (T24)

Tablica 2. Obilježja A-549 stanične linije (preuzeto sa <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

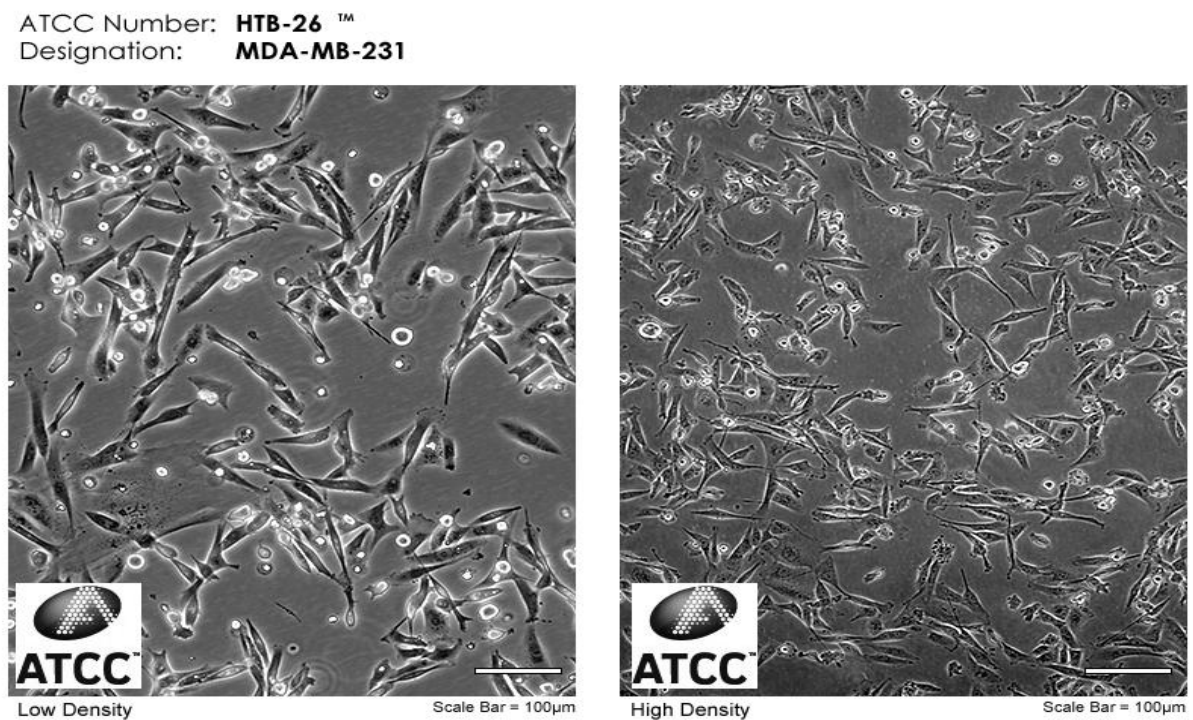
Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	pluća
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	Stanična linija A-549: karcinom
Dob i spol	58 godina, muškarac

Tablica 3. Obilježja MDA-MB-231 stanične linije (preuzeto sa <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

Organizam	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
Tkivo	dojka
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	Stanična linija MDA-MB-231: adenokarcinom
Dob i spol	51 godina, žena

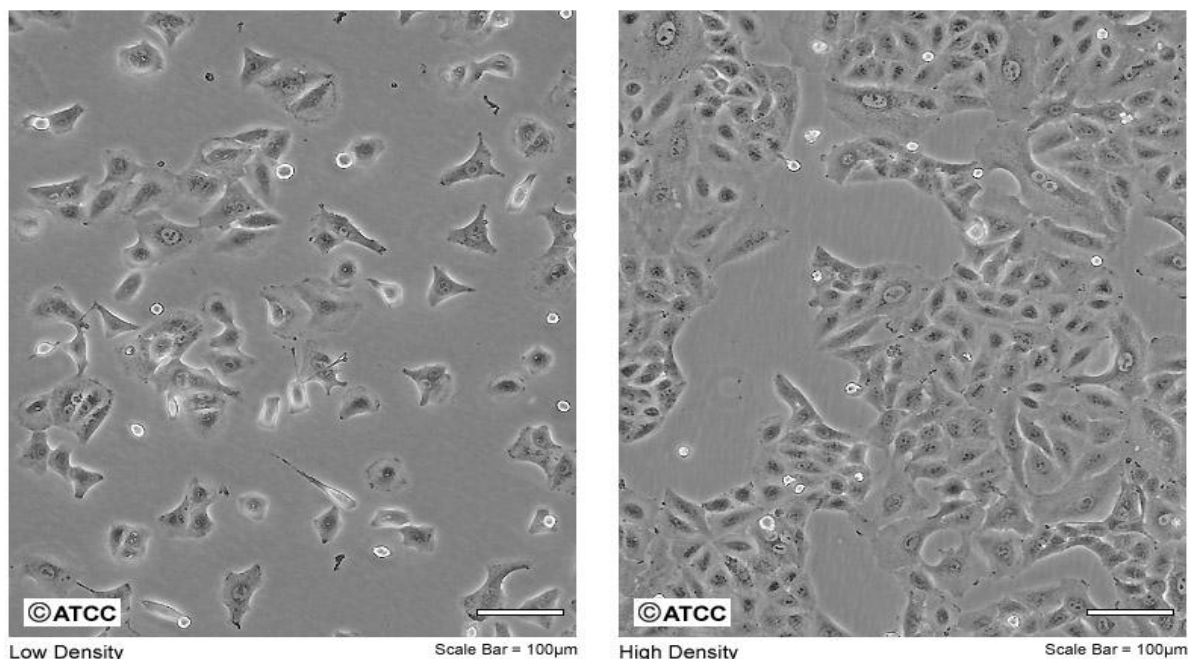


Slika 5. Karcinomske stanice T24 stanične linije (preuzeto sa <http://www.lgcstandards-atcc.org>)



Slika 6. Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije (preuzeto sa <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**



Slika 7. Karcinomske stanice A-549 stanične linije (preuzeto sa <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

3.2. POSTUPAK

Nakon odmrzavanja, stanične linije su uzgojene u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO₂, u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju. Jednak broj stanica nanesen je u jažice pločica s 96 jažica u četiri replikata. U jažice je dodan DMEM medij i sve ostavljeno preko noći za prihvata na podlogu. Zatim su stanice tretirane s individualnim otopinama vodenih ekstrakata biljaka koncentracija 0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L te 1 g/L u mediju, u triplikatu tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Koncentracije ekstrakta biljaka su dobivene postepenim razrjeđivanjem početne koncentracije ekstrakta pomiješanog s medijem. U tri jažice, koje su predstavljale kontrolnu skupinu, nije dodan nijedan ekstrakt već su ostavljene stanice u samom DMEM mediju.

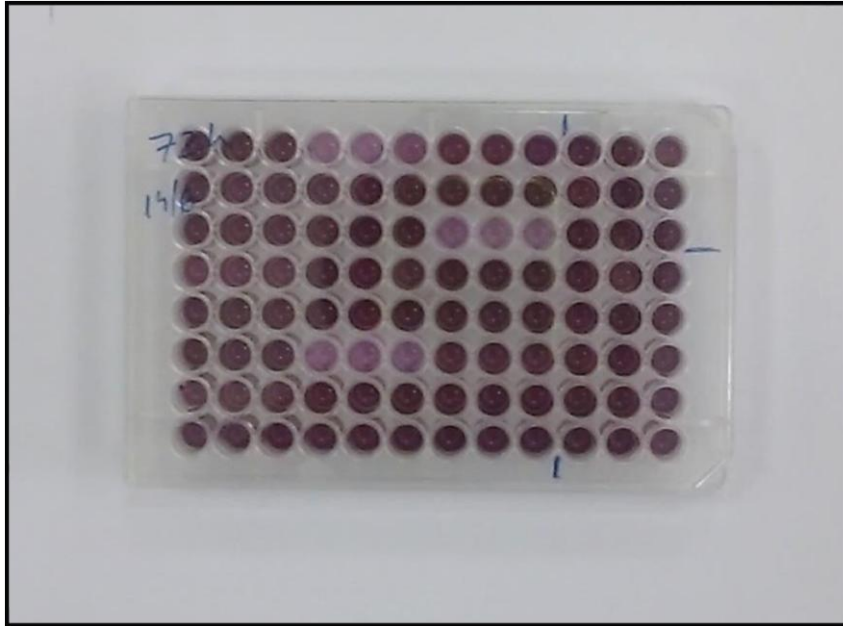


Slika 8. Karcinomske stanice presađene u 96 jažica i izložene različitim koncentracijama ekstrakata biljaka (prije dodavanja MTT-a).

3.3. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI

Stanična živost i proliferacija određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu. Žuti tetrazolin MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) se reducira u metabolički aktivnim stanicama. MTT testom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja jednom od ekstrakata biljaka, jer mrtve, odnosno metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Metabolički aktivne stanice, sposobne za život, pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Kada stanice odumru, gube sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a (26). Rezultirajući intracelularni ljubičasti formazan može se izmjeriti spektrofotometrijski. Da bi se mogla očitati apsorbancija (na 570 nm) novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid) (26). Nakon jednog sata MTT je ispran i dodan je DMSO. Pločice su inkubirane 10 min na 37 °C uz treskanje. Apsorbancija je mjerena na 570 nm (signal) i 690 nm (pozadina).

Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim ekstraktima biljaka te apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj nam je citotoksične aktivnosti korištenih biljaka.



Slika 9. Ljubičasto obojenje (biljeg živih stanica) nakon dodavanja DMSO-a (koji otapa neotopljeni ljubičasti spoj formazan) u otopinu MTT-a



Slika 10. Spektrofotometar

4. REZULTATI

Empirijska obrada:

- Kao ograničenje istraživanja uzima se zanemarivanje vremenskog aspekta. Razlog je premala serija podataka.

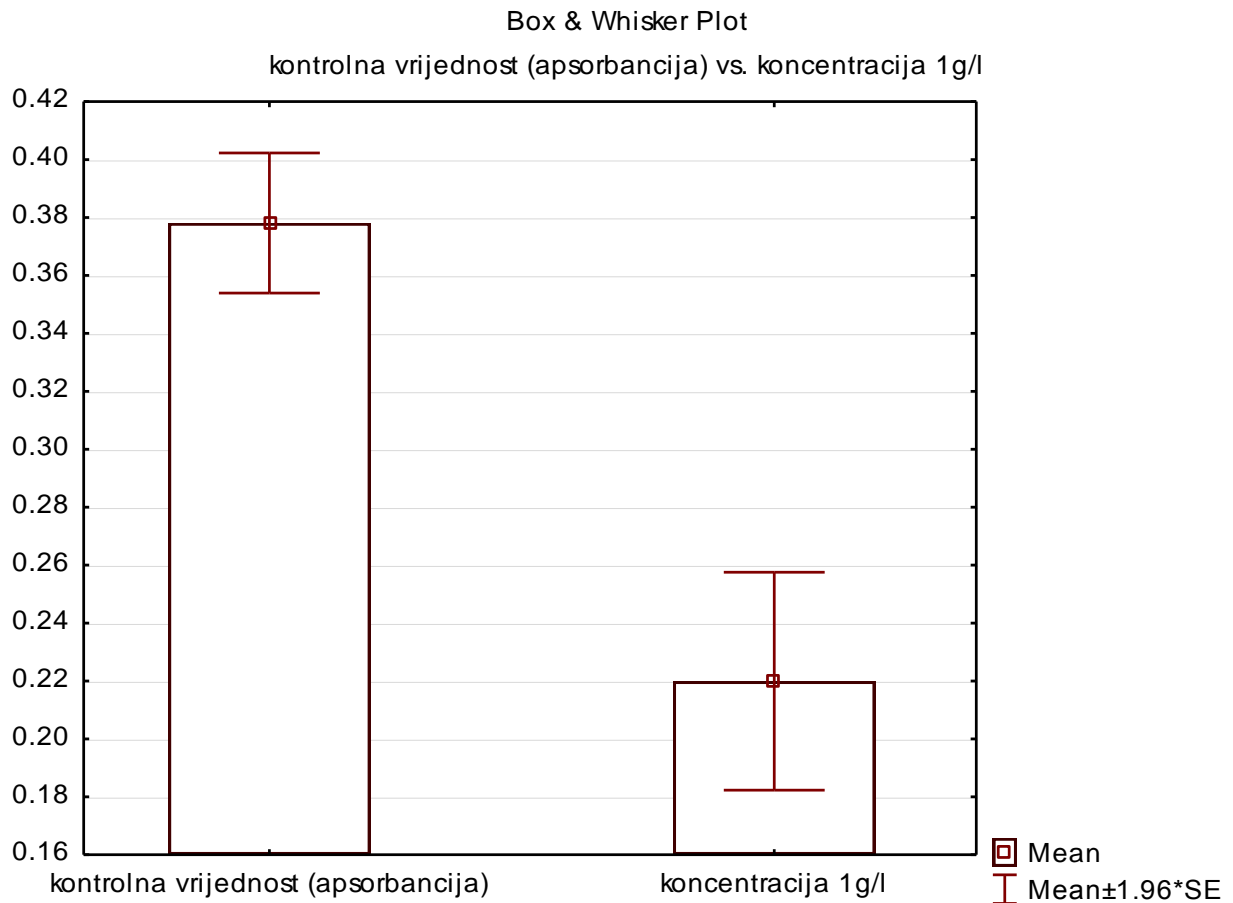
4.1. KARCINOM PLUĆA - A-549

4.1.1. Rezultati ukupno:

Tablica 4.1. Ukupni rezultati za staničnu liniju karcinoma pluća A-549

T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek – kontrolna skupina	Prosjek – Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija)- vs. koncentracija 0.1 g/L	0.38	0.34	1.31	91	0.19	48	45
kontrolna vrijednost (apsorbancija)- vs. koncentracija 0.25 g/L	0.38	0.39	-0.37	91	0.71	48	45
kontrolna vrijednost (apsorbancija)- vs. koncentracija 0.50 g/L	0.38	0.36	0.66	92	0.51	48	46
kontrolna vrijednost (apsorbancija)- vs. koncentracija 1 g/L	0.38	0.22	6.96	93	0.00	48	47

Pronađene su razlike u apsorbciji između kontrolne skupine i skupine tretirane raznim koncentracijama individualnih otopina. Uočena je statistički značajna razlika u apsorbciji tek pri koncentraciji otopine od 1 g/L.



Slika 11. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 1 g/L za staničnu liniju karcinoma pluća A-549

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbanije 0,38, dok je prosječna razina apsorbanije uz koncentraciju otopine od 1 g/L 0,22. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.

4.1.2. Rezultati prema biljkama:

Tablica 4.2. Rezultati prema biljkama za staničnu liniju karcinoma pluća A549

Zečji trn - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t-vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.38	0.22	2.89	22	0.01	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.38	0.40	-0.72	20	0.48	12	10
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.38	0.42	-1.38	21	0.18	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.38	0.46	-2.45	20	0.02	12	10
Zdravac - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t-vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.38	0.12	7.48	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.38	0.40	-0.62	22	0.54	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.38	0.43	-1.58	21	0.13	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.38	0.19	2.96	22	0.01	12	12
Neven - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t-vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.38	0.33	1.59	22	0.13	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.38	0.33	1.70	22	0.10	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.38	0.35	0.87	21	0.40	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.38	0.35	0.91	22	0.37	12	12
Stolisnik - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t-vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.38	0.22	4.20	21	0.00	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.38	0.33	0.74	22	0.46	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.38	0.35	0.64	22	0.53	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.38	0.39	-0.30	21	0.77	12	11

Postojanje razlike u apsorbanciji između kontrolne skupine i skupine tretirane raznim koncentracijama individualnih otopina uočeno je tek pri koncentraciji otopine 1 g/L za biljke zečji trn, zdravac i stolisnik. Za koncentraciju od 0,50 g/L i 0,25 g/L nije utvrđena statistički značajna razlika, dok je za koncentraciju od 0,1 g/L utvrđena statistički značajna razlika za zdravac, te neočekivana značajna negativna razlika za zečji trn.

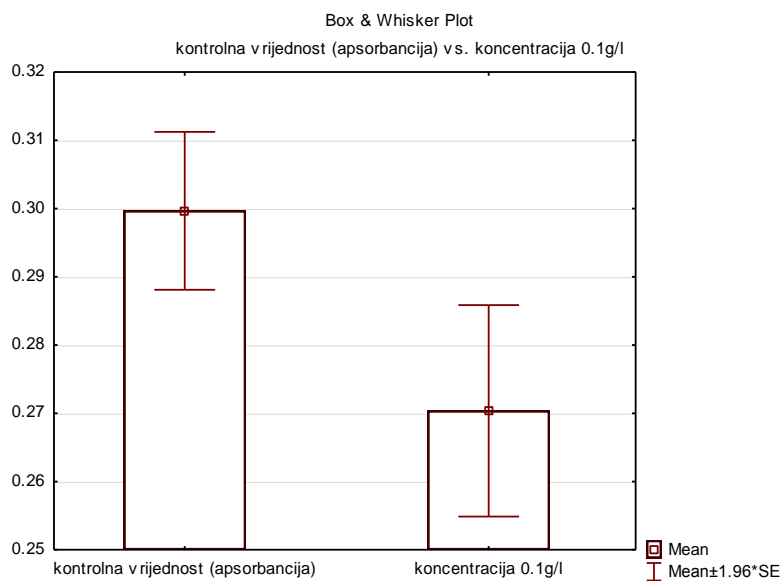
4.2. KARCINOM DOJKE – MDA- MB - 231

4.2.1. Rezultati ukupno:

Tablica 5.1. Ukupni rezultati za staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231

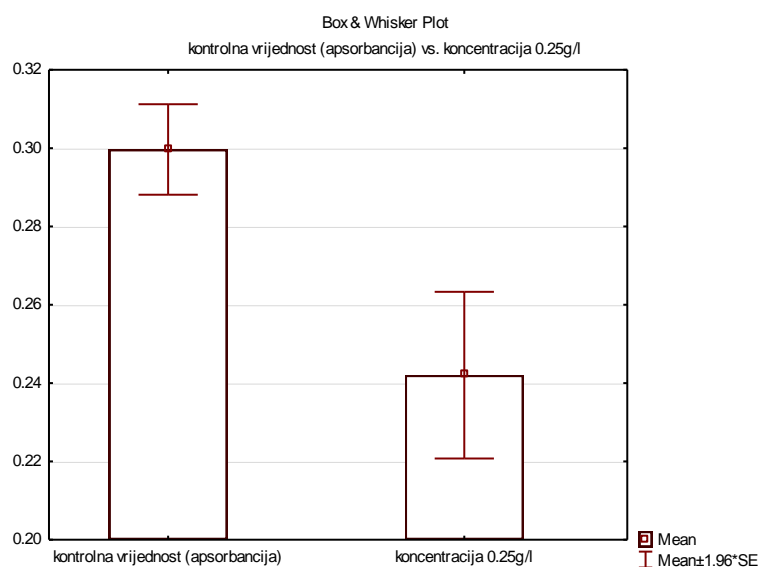
T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t-vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.30	0.23	6.46	93	0.00	48	47
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.30	0.22	6.27	94	0.00	48	48
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.30	0.24	4.77	90	0.00	48	44
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.30	0.27	2.97	94	0.00	48	48

Na temelju rezultata t-testa može se uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji za sve biljne ekstrakte s obzirom na dodavane koncentracije.



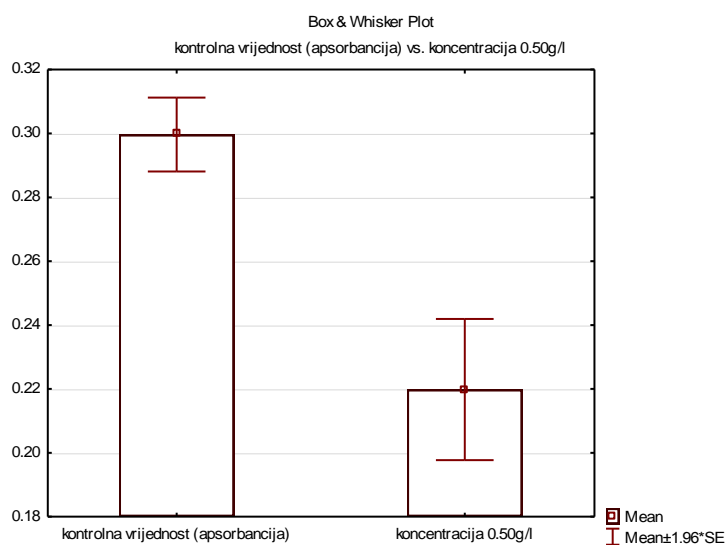
Slika 12. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 0,1 g/L za staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,30, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije od 0,1 g/L 0,27. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.



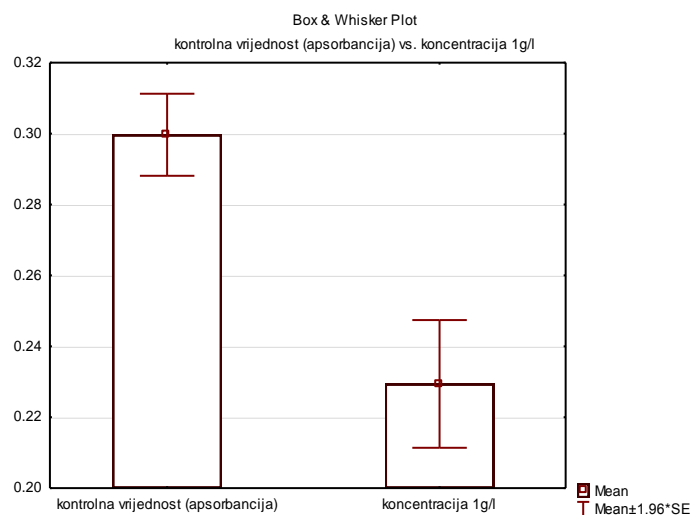
Slika 13. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 0,25 g/L za staničnu liniju karcinoma dojke MDA MB-231

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,30, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije od 0,25 g/L 0,24. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.



Slika 14. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 0,5 g/L za staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,30, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije od 0,50 g/L 0,22. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.



Slika 15. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 1 g/L za staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,30, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije od 1 g/L 0,23. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.

4.2.2. Rezultati prema biljkama:

Tablica 5.2. Rezultati prema biljkama za staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231

Zečji trn - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.30	0.22	3.72	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.30	0.19	4.12	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.30	0.22	3.14	21	0.00	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.30	0.27	1.60	22	0.12	12	12
Zdravac - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.30	0.21	3.64	21	0.00	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.30	0.19	3.35	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.30	0.25	2.14	21	0.04	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.30	0.29	0.37	22	0.72	12	12
Neven - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.30	0.26	2.04	22	0.05	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.30	0.26	2.21	22	0.04	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.30	0.28	1.07	21	0.30	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.30	0.29	0.55	22	0.59	12	12
Stolisnik - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.30	0.22	3.44	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.30	0.24	3.30	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.30	0.23	2.98	21	0.01	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.30	0.23	3.62	22	0.00	12	12

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom zdravac koncentracija 0,25 g/L, 0,50 g/L i 1 g/L, dok nije utvrđena statistički značajna razlika kod stanica tretiranih biljkom zdravac koncentracije 0,1 g/L.

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom zečji trn koncentracija 0,25 g/L, 0,50 g/L i 1 g/L, dok nije utvrđena statistički značajna razlika kod stanica tretiranih biljkom zečji trn koncentracije 0,1 g/L.

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom neven koncentracije 0,50 g/L, dok nije utvrđena statistički značajna razlika kod stanica tretiranih biljkom neven koncentracija 0,1 g/L, 0,25 g/L i 1 g/L.

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom stolisnik svih koncentracija 0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,50 g/L i 1 g/L.

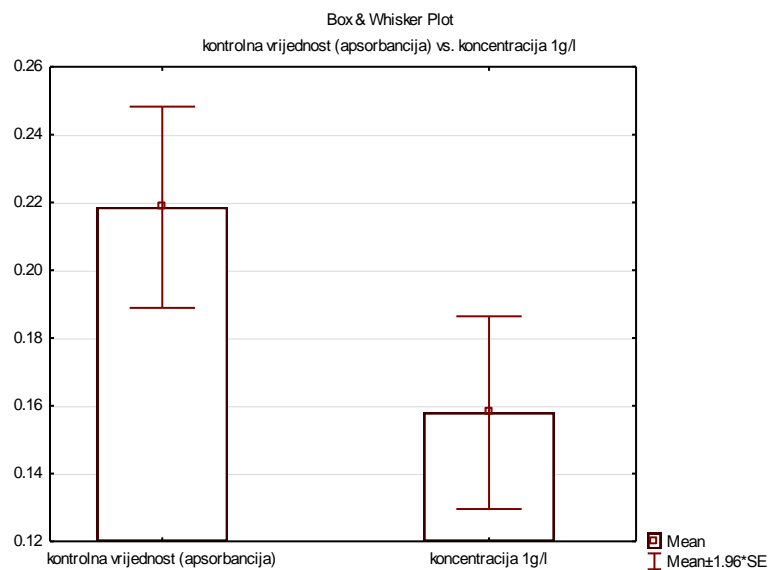
4.3 KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA - RT4

4.3.1. Rezultati ukupno:

Tablica 6.1. Ukupni rezultati za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura RT4

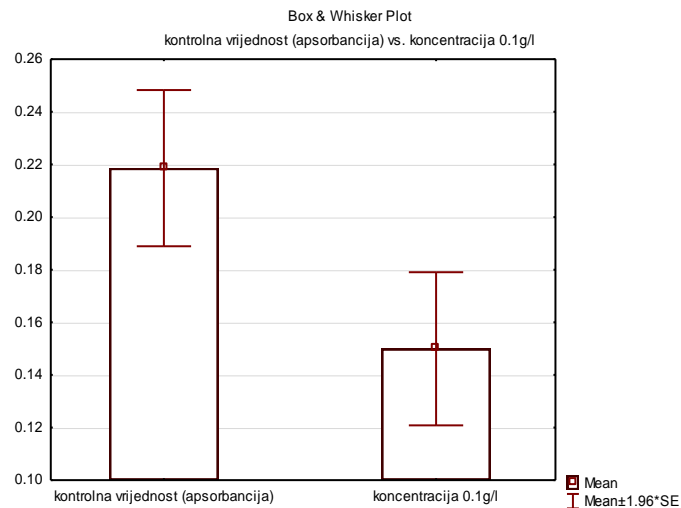
T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.22	0.16	2.88	90	0.00	48	44
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.22	0.19	1.55	94	0.12	48	48
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.22	0.22	-0.27	93	0.79	48	47
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.22	0.15	3.23	90	0.00	48	44

Na temelju rezultata t-testa može se uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji za sve skupine s obzirom na dodavanje biljke koncentracija 0,1 g/L i 1 g/L, dok pri koncentraciji 0,25 g/L i 0,50 g/L nije došlo do statistički značajnog pada vrijednosti apsorbancije.



Slika 16. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 1 g/L za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura RT4

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,22, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica RT4 tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije 1 g/L 0,16. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.



Slika 17. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 0,1 g/L za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura RT4

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,22, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica RT4 tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije 0.1 g/L 0,15. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.

4.3.2. Rezultati prema biljkama:

Tablica 6.2. Rezultati prema biljkama za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura RT4

Zečji trn - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	P	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.22	0.21	0.24	20	0.81	12	10
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.22	0.17	1.30	22	0.21	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.22	0.16	1.69	21	0.11	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.22	0.15	1.68	21	0.11	12	11
Zdravac - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.22	0.10	2.84	20	0.01	12	10
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.22	0.16	1.39	22	0.18	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.22	0.20	0.42	22	0.68	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.22	0.11	2.79	22	0.01	12	12
Neven - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.22	0.14	2.10	22	0.05	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.22	0.20	0.50	22	0.62	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.22	0.24	-0.63	22	0.54	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.22	0.18	0.87	21	0.40	12	11
Stolisnik - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.22	0.18	0.84	22	0.41	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.22	0.23	-0.20	22	0.84	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.22	0.29	-1.77	22	0.09	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.22	0.17	1.06	20	0.30	12	10

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da ne postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom zečji trn i stolisnik.

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije skupina koje su tretirane biljkom zdravac koncentracija 0,1 g/L i 1 g/L, dok nije utvrđena statistički značajna razlika kod stanica tretiranih biljkom zdravac koncentracija 0,25 g/L i 0,50 g/L.

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom neven koncentracije 1 g/L, dok nije utvrđena statistički značajna razlika kod stanica tretiranih biljkom neven koncentracija 0,1 g/L, 0,25 g/L i 0,50 g/L.

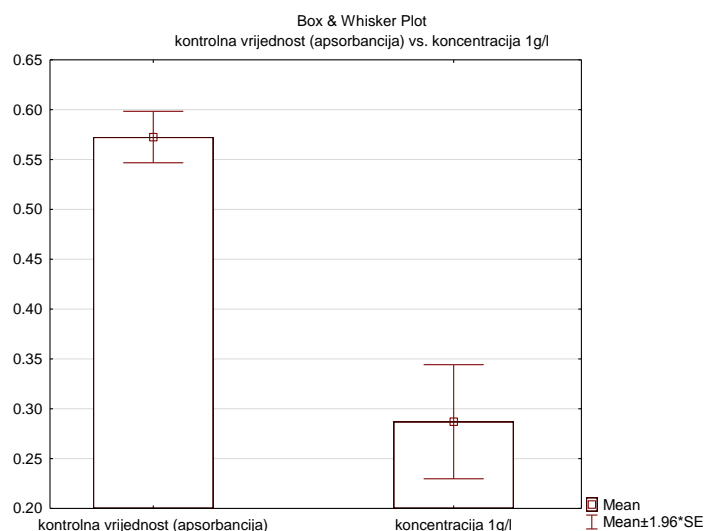
4.4. KARCINOM MOKRAĆNOG MJEHURA - T24

4.4.1. Rezultati ukupno:

Tablica 7.1. Ukupni rezultati za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24

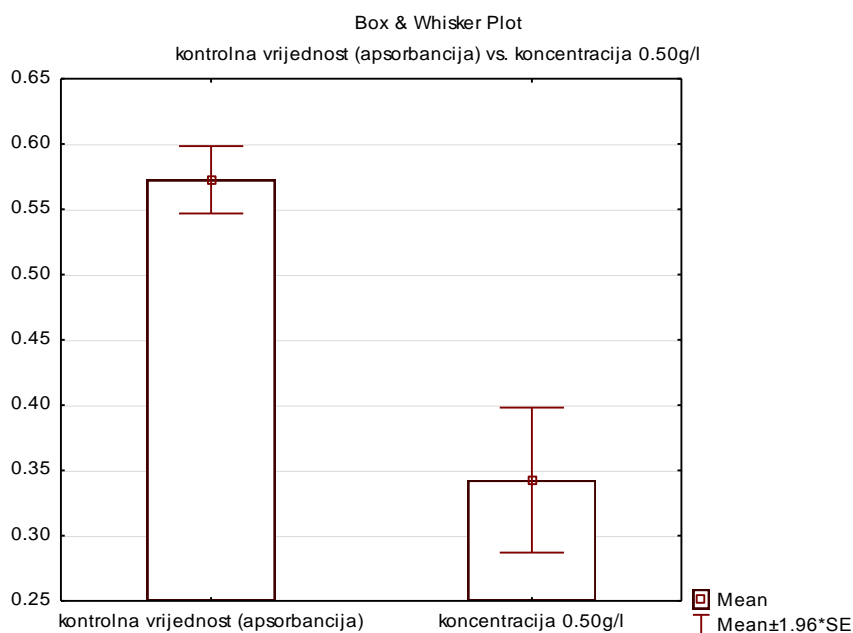
T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.57	0.29	9.10	91	0.00	48	45
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.57	0.34	8.03	81	0.00	48	35
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.57	0.38	7.62	81	0.00	48	35
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.57	0.40	6.73	82	0.00	48	36

Na temelju rezultata t-testa može se uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji za sve skupine s obzirom na dodavanje ekstrakata biljaka koncentracija 0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L i 1g/L.



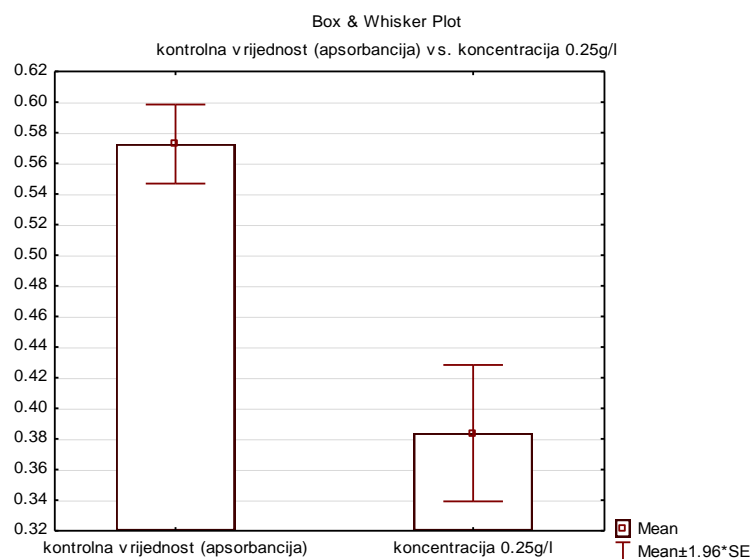
Slika 18. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 1 g/L za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,57, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica tretiranih biljkama koncentracije 1 g/L 0,29. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.



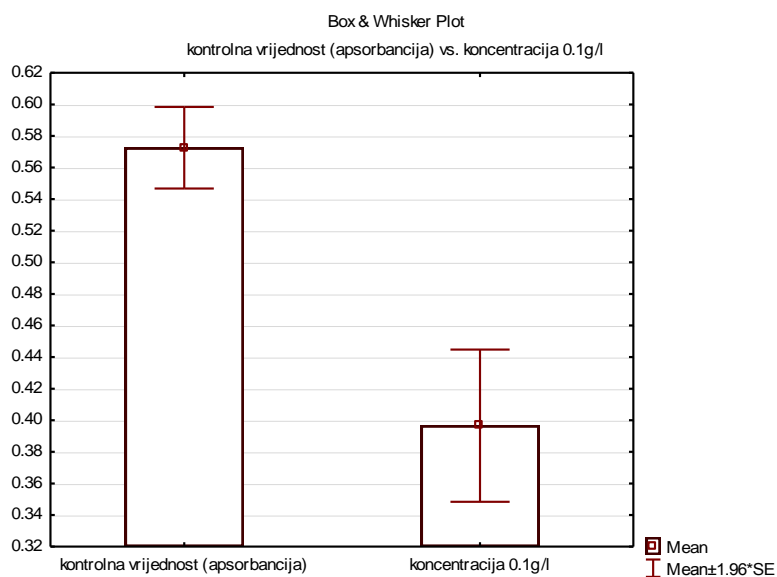
Slika 19. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 0,5 g/L za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0.57, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica T24 tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije 0,50 g/L 0,34. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.



Slika 20. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 0,25 g/L za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,57, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica T24 tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije 0,25 g/L 0,38. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.



Slika 21. Odnos kontrolne vrijednosti i koncentracija 0,1 g/L za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24

Iz grafičkog prikaza se može uočiti da je prosječna razina apsorbancije kod kontrolne skupine 0,57, dok je prosječna razina apsorbancije kod stanica T24 tretiranih biljnih ekstraktima koncentracije 0,1 g/L 0,40. Okomite linije prikazuju intervalnu procjenu pri razini pouzdanosti od 95%.

4.4.2. Rezultati prema biljkama:

Tablica 7.2. Rezultati prema biljkama za staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura T24

Zečji trn - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.57	0.12	12.57	21	0.00	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.57	0.30	6.76	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.57	0.33	6.60	21	0.00	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.57	0.33	6.25	22	0.00	12	12
Zdravac - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.57	0.21	5.66	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.57	0.23	5.88	21	0.00	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.57	0.32	4.85	22	0.00	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.57	0.36	3.55	22	0.00	12	12
Neven - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1 g/L	0.57	0.34	4.28	21	0.00	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.57	0.49	2.16	22	0.04	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.57	0.50	2.26	22	0.03	12	12
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.57	0.51	2.01	22	0.06	12	12
Stolisnik - T-test for Independent Samples Note: Variables were treated as independent samples							
	Prosjek - Kontrolna skupina	Prosjek - Koncentracija	t- vrijednost	df	p	Valid N - Kontrolna skupina	Valid N - Koncentracija
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 1g/L	0.57	0.48	2.19	21	0.04	12	11
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.50 g/L	0.57	0.00		10		12	0
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.25 g/L	0.57	0.00		10		12	0
kontrolna vrijednost (apsorbancija) vs. koncentracija 0.1 g/L	0.57	0.00		10		12	0

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom zdravac koncentracija 0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,50 g/L i 1 g/L.

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom zečji trn kod svih koncentracija (0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,50 g/L i 1 g/L).

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom neven kod koncentracija 0,25 g/L, 0,5 g/L i 1 g/L.

Iz tabličnog prikaza se može uočiti da postoji statistički značajna razlika u apsorbanciji između kontrolne skupine i apsorbancije kod skupina koje su tretirane biljkom stolisnik koncentracije 1 g/L, dok za ostale koncentracije nismo imali raspoložive podatke.

5. RASPRAVA

Karcinom pluća je najčešći karcinom kod muškaraca, a sve češće se javlja i kod žena. Uočilo se da je veća incidencija karcinoma pluća u razvijenijim zemljama, poglavito vezana uz naviku pušenja kao glavnog rizičnog čimbenika. Nadalje u razvijenim zemljama došlo je do blagog pada incidencije karcinoma kod muškaraca, dok se bilježi porast kod ženske populacije (6). Karcinom dojke zauzima prvo mjesto kod žena, dok mu incidencija i dalje raste. 2012. godine zauzeo je drugo mjesto prema učestalosti u svijetu. Uočeno je da socioekonomski status direktno korelira sa stadijem bolesti i općenitim ishodom. Iako je incidencija u rastućem trendu, smrtnost se nužno ne povećava, poglavito zbog educiranosti javnosti i ranijeg otkrivanja, naročito u razvijenim zemljama (7). Karcinom mokraćnog mjehura zauzima sedmo mjesto u svijetu po učestalosti karcinoma u muškaraca te sedamnaesto u žena (8). 2012. godine dijagnosticirano je 430 000 novih slučajeva. Općenito incidencija karcinoma je značajno niža kod žena nego kod muškaraca, dok je također uočeno da incidencija korelira s pušenjem, što ukazuje da pušenje i kod karcinoma mokraćnog mjehura predstavlja značajan rizični čimbenik (9).

Svrha ovog istraživanja je utvrditi da li osim standardne terapije citostaticima postoji mogućnost liječenja ili potporne terapije u vidu različitih biljnih izvora. U tablici 8. prikazane su tradicionalno korištene biljke s razinom dokaza o djelotvornosti istih (27).

B – dobri znanstveni dokazi; do dva RKT (randomizirana kontrolirana pokusa) ili bar jedna meta analiza ili slabija studija i utemeljenje u teoriji/ *in vivo* pokusima.

C – nejasni ili proturječni znanstveni dokazi; RKT slabije kvalitete, slabije studije bez dokaza u teoriji/ *in vivo* pokusima ili samo teorijski/ *in vivo* dokazi.

Tablica 8. Tradicionalno korištene biljke u liječenju i prevenciji različitih linija karcinoma.

NAZIV BILJKE	DJELOVANJE	RAZINA DOKAZA
<i>Chelidonium majus</i> (Rosopas)	prevencija i terapija raka	B
<i>Actaea racemosa</i> (Habulica)	prevencija raka dojke	C
<i>Oenothera biennis</i> (Noćurak)	prevencija i terapija raka dojke	C
<i>Linum usitatissimum</i> (Lan)	prevencija i terapija raka dojke	C
<i>Paeonia sp.</i> (Božur)	rak pluća	C
<i>Salvia officinalis</i> (Kadulja)	prevencija raka pluća	C
<i>Rhodiola rosea</i> (Rodiola)	rak mokraćnog mjehura	C
<i>Boswellia serrata</i> (Indijski tamjan)	terapija raka mozga	B
<i>Lycium sp.</i> (Goji)	prevencija i terapija raka	C
<i>Aloe vera</i>	prevencija raka	C
<i>Asimina triloba</i> (Indijanska banana)	terapija raka	C
<i>Astragalus membranaceus</i> (Kozlinac)	terapija raka	C
<i>Bromelain</i>	prevencija i terapija raka	C
<i>Bupleurum sp.</i>	prevencija hepatocelularnog karcinoma	C
<i>Uncaria sp.</i>	prevencija raka	C
<i>Larrea sp.</i>	prevencija i terapija raka	C
<i>Chrysanthemum sp.</i>	prevencija raka, terapija prekancerogenih lezija	C
<i>Echinacea sp.</i>	prevencija i terapija raka	C
<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Jiaogulan)	prevencija i terapija raka	C

<i>Allium sativum</i> (Češnjak)	prevencija raka	C
<i>Ginkgo biloba</i>	rak debelog crijeva i rektuma, rak želuca, rak gušterače, rak jajnika	C
<i>Ginseng</i>	prevencija raka, rak želuca	C
<i>Lavandula angustifolia</i>	terapija uznapredovalog raka	C
<i>Grifola fondonza</i> (Maitake gljiva)	prevencija i terapija raka	C
<i>Sylibum marianum</i>	prevencija raka	C
<i>Viscum album</i> (Bijela imela)	prevencija i terapija raka	C
Modificirani pektini iz citrusa	rak prostate	C
<i>Nerium oleander</i>	prevencija i terapija raka	C
<i>Podophylum sp.</i>	rak maternice	C
<i>Coriolus versicolor</i> (Šarena tvrdokoška)	adjuvant (leukemija, rak debelog crijeva i rektuma, rak jetre, pluća, grla, želuca)	C
<i>Plantago sp.</i>	rak debelog crijeva	C
<i>Trifolium pratense</i> (Crvena djetelina)	rak prostate	C
<i>Ganoderma lucidum</i> (Hrastova sjajnica)	prevencija i terapija raka	C
<i>Rheum sp.</i>	rak grla	C
<i>Salvia officinalis</i>	prevencija raka pluća	C
<i>Serenoa repens</i>	prevencija raka, prevencija i terapija raka prostate	C
<i>Lentinus edodes</i> (Shiitake gljiva)	adjuvans u kemoterapiji	C
<i>Scutellaria sp.</i>	prevencija i terapija raka	C
<i>Ulmus rubra</i> (Glatki brijest)	prevencija i terapija raka	C
<i>Rumex sp.</i>	prevencija i terapija raka	C

<i>Arthrospira sp.</i> (alga spirulina)	rak usne šupljine	C
<i>Fragaria sp.</i>	prevencija raka rektuma i debelog crijeva	C
<i>Artemisia annua</i> (Slatki pelin)	prevencija i terapija raka	C
<i>Camellia sinensis</i> (Zeleni čaj)	prevencija i terapija raka	C
<i>Curcuma longa</i>	prevencija i terapija raka	C

Jedna od biljaka za koju postoji čvrsta razina dokaza, pogotovo u terapiji karcinoma mozga jest *Boswellia serrata* (Indijski tamjan). Istraživanja su pokazala da su triterpenoidi, koji uključuju bosveličnu kiselinu, odgovorni za citotoksičnu i antitumorsku aktivnost biljke. Smatra se da mehanizam djelovanja uključuje indukciju apoptoze kroz aktivaciju kaspaza, pojačavanje ekspresije Bax proteina, blokiranje signalnog puta NF- κ B te indukciju poli(ADP)-riboza polimeraze (10). U prevenciji te terapiji karcinoma prisutni su čvrsti dokazi i o učinkovitosti biljke *Chelidonium majus* (Rosopas). Alkaloidi izolirani iz biljke pokazali su jaku antitumorsku aktivnost dok je i sam biljni ekstrakt pokazao dobru citotoksičnu aktivnost, ovisnu o vremenu i koncentraciji. Mehanizam djelovanja uključuje zaustavljanje staničnog ciklusa te indukciju apoptoze. Također, istraživanje je pokazalo da citotoksična aktivnost raste istodobnom primjenom s citostatikom doksorubicinom (11).

Za karcinom pluća, kao jednu od ispitivanih linija u našem istraživanju, biljka *Paeonia sp.* (Božur) predstavlja jednu od djelotvornijih i potencijalno učinkovitu alternativu u liječenju. Dokazan je njezin citotoksični, antioksidativni, protuupalni te antitumorski učinak. Citotoksični učinak ispitivan je upravo na staničnoj liniji karcinoma pluća A-549 te je uočeno da svoj učinak ispoljava potičući oksidativni stres i apoptozu, zaustavljanjem staničnog ciklusa te blokirajući NF- κ B kaskadni put (12).

Za drugu ispitivanu liniju, karcinom dojke, potencijalna mogućnost liječenja nalazi se u vidu biljaka *Oenothera biennis* (Noćurak) te *Linum usitatissimum* (Lan). Polifenolima, kao sastojcima noćurka, dokazana su protuupalna, antioksidativna te antitumorska svojstva. Ispitivanje na staničnoj liniji karcinoma dojke pokazalo je da polifenolni ekstrakti noćurka utječu na stanično preživljenje te kao takvi imaju potencijal u liječenju ove vrste karcinoma (13). Smatra se da sjeme lana, bogato lignanima te α -linolenskom kiselinom, posjeduje

antitumorsku aktivnost. Istraživanja na životinjama su pokazala da prehrana obogaćena sjemenom lana usporava rast tumora, pojačava učinak tamoksifena te Trastzumab/Herceptin monoklonskog protutijela. Mehanizam djelovanja uključuje suzbijanje stanične proliferacije te stimuliranje apoptoze moduliranjem metabolizma estrogena, estrogenskih receptora te signalnih putova (14).

Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura raste s godinama, što predstavlja mogućnost upotrebe *anti-aging* agensa u prevenciji ovog oblika karcinoma. *Rhodiola rosea* (Rodiola) ima dokazan *anti-age* učinak te je istraživanjem uočen antitumorski učinak jedne od njezinih bioaktivnih komponenti: salidrozida. Rezultati istraživanja su pokazali da ekstrakti rodiole te salidrozidi učinak ostvaruju inhibicijom translacije (15).

Kao predmet našeg istraživanja koristili smo biljke zečji trn (*Ononis spinosa*), zdravac (*Geranium macrorrhizum*), stolisnik (*Achillea millefolium*) te neven (*Calendula officinalis*), odnosno promatrali njihovu citotoksičnu aktivnost. Biljka zečji trn otprije je korištena u narodnoj medicini za liječenje različitih kožnih oboljenja na osnovu svog antibakterijskog, antifungalnog, protuupalnog te analgetskog učinka (16). U vidu citotoksične aktivnosti, promatran je korijen zečjeg trna koji sadrži glikozid spinonin. Istraživanje je pokazalo da nema učinak na različite linije staničnih karcinoma kao ni na HIV-1 reverznu transkriptazu (17). Našim istraživanjem uočili smo da u određenim koncentracijama i vremenskim intervalima ekstrakt biljke zečji trn pokazuje učinak na stanične linije karcinoma pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24.

Biljka zdravac i njezino eterično ulje poznato je po svom antioksidativnom te protuupalnom učinku. Za glavni sastojak eteričnog ulja citronelol uočeno je da suzbija degranulaciju mastocita, što predstavlja potencijal ove biljke i u liječenju alergijskih oboljenja (18). Citotoksična aktivnost ekstrakta biljke *Gerranium* djelomično je umanjena antioksidansima, a stimulirana prooksidansima. To je pokazalo da je citotoksična aktivnost uvjetovana stvaranjem prooksidativnih produkata. Rezultati su pokazali da je citotoksična aktivnost umanjena dodavanjem antioksidansa N,N'-difenil-p-fenilen diamina (DPPD) te kelatorom željezovih iona deferoksaminom. Nadalje, citotoksičnost je stimulirana prooksidansom N,N'-bis(2-kloroetil)-N-nitrozurea (BCNU). Citotoksična aktivnost je dokazana u *in vitro* uvjetima, te poglavito uvjetovana djelovanjem kvercetina i njegovih derivata (19). Našim istraživanjem uočili smo da u određenim koncentracijama i vremenskim

intervalima ekstrakt biljke zdravac pokazuje učinak na sve promatrane stanične linije karcinoma.

Stolisnik je u narodnoj medicini poznato sredstvo za liječenje različitih kožnih upala te rana. Smatra se da je ovaj učinak uvjetovan imunostimulacijskim učinkom preko Akt kaskadnog puta (20). Također, istraživanja su pokazala da stolisnik osim spazmolitičkog učinka i primjene kod dispeptičkih tegoba još može umanjiti bol kod primarne dismenoreje u žena (21). Citotoksična aktivnost biljke porodice *Achillea* mjerena je na staničnoj liniji karcinoma prostate. Također, koristeći MTT metodu, rezultati su pokazali jak antioksidativni, citotoksični i pro-apoptički učinak, pogotovo kod alkoholnih ekstrakata (22). Nadalje, citotoksična aktivnost biljke porodice *Achillea* mjerena je na staničnoj liniji HeLa te pokazala dobru citotoksičnu aktivnost. Citotoksičnost je mjerena i na staničnoj liniji leukemije K562, gdje su rezultati bili nešto lošiji nego kod HeLa stanica (23). Našim istraživanjem uočili smo da u određenim koncentracijama i vremenskim intervalima ekstrakt biljke stolisnik pokazuje učinak na stanične linije karcinoma pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24.

Neven se tradicionalno koristi za liječenje kožnih bolesti i za zacjeljivanje rana. Smatra se da taj učinak postiže stimulacijom faktora rasta CTGF (eng. *connective tissue growth factor*) te α -SMA (eng. *α -smooth muscle actin*) (24). Prisutna su istraživanja u kojima se koristio lutein, kemijska komponenta nevena, kao antitumorski agens. Miševi tretirani luteinom iz ekstrakta nevena su nakon dva tjedna inokulirani s tumorskim stanicama. Stanična proliferacija je mjerena kroz 70 dana. Niže koncentracije luteina dovele su do smanjenja incidencije tumora dojke, smanjenja rasta tumora, i lipidne peroksidacije, dok se veće koncentracije nisu pokazale tako uspješne. Istraživači su zaključili da niske koncentracije luteina mogu usporiti rast tumora dojki. Ranija studija je pokazala slične rezultate (25). Našim istraživanjem uočili smo da u određenim koncentracijama i vremenskim intervalima ekstrakt biljke neven pokazuje učinak na stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4.

Na temelju svega navedenog vidljivo je da postoji potencijal u liječenju karcinoma biljnim izvorima. Rezultati pokazuju pozitivne ishode te posljedično smanjeno preživljenje stanica karcinoma pluća, mokraćnog mjehura te dojke. Ovo istraživanje pokazalo je da *in vitro* izlaganje stanica karcinoma mokraćnog mjehura, pluća te dojke ekstraktima biljaka zečji trn, zdravac, neven te stolisnik dovodi do smanjenog preživljenja tih istih stanica. Smanjeno

preživljenje nije uočeno jednako pri svim koncentracijama te u različitim vremenskim intervalima izloženosti djelovanju ekstrakta. Nadalje postotak preživljenja ovisno o ekstraktu biljke i ispitivanoj staničnoj liniji, kreće se u rasponu od manje od 1% do više od 80%, čime je potvrđena hipoteza i ostvaren cilj istraživanja. Kako je potvrđen uspjeh djelovanja ekstrakata korištenih biljaka u određenim koncentracijama i vremenu djelovanja *in vitro*, sljedeći korak u ispitivanju učinka ovih istih biljnih ekstrakata je ispitivanje *in vivo* na modelima karcinoma pluća, mokraćnog mjehura i dojke kod životinja.

6. ZAKLJUČAK

1. *In vitro* izlaganje stanica karcinoma pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4, ekstraktima biljaka zečji trn (*Ononis spinosa*), zdravac (*Geranium macrorrhizum*), stolisnik (*Achillea millefolium*) te neven (*Calendula officinalis*) dovodi do smanjenog preživljenja tih stanica.

2. Smanjeno preživljenje stanica karcinoma pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4 nije jednako kod svih biljnih ekstrakata, kod jednakih koncentracija i vremenskih intervala izloženosti djelovanja.

3. Smanjenje preživljenja stanica karcinoma pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4 nije uvijek bilo u razmjeru s povećanjem koncentracije ekstrakta.

4. Kako je potvrđen uspjeh djelovanja ekstrakata korištenih biljaka u određenim koncentracijama i vremenu djelovanja *in vitro*, sljedeći korak u ispitivanju učinka ovih istih ekstrakata bilo bi ispitivanje *in vivo* na modelima karcinoma pluća, mokraćnog mjehura i dojke kod životinja.

7. LITERATURA

1. Skidmore-Roth, L. *Mosby's handbook of herbs & natural supplements*. 2nd ed. Colorado: Mosby; 2009.
2. Šamija, M. i suradnici. *Onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
3. Kuštrak, D. *Farmakognozija i fitofarmacija*. Zagreb: Golden marketing- Tehnička knjiga; 2005.
4. Bučar, M. *Medonosne biljke kontinentalne Hrvatske*. Zagreb: Grafički zavod; 2008.
5. M. Bučar Z, V. Gligić T. *Iglica (Geranium) - Plantea* [Internet]. Plantea. 2015 [pristupljeno 10. Veljače 2016]. Dostupno sa: <http://www.plantea.com.hr/iglica/>
6. Cheng TD, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1653-71.
7. Ghoncheh M, Mirzaei M, Salehiniya H. Incidence and Mortality of Breast Cancer and their Relationship with the Human Development Index (HDI) in the World in 2012. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(18):8439-43.
8. Kakehi Y, Hirao Y, Kim WJ, Ozono S, Masumori N, Miyanaga N, et al. Bladder Cancer Working Group report. *Japanese journal of clinical oncology*. 2010;40(1):i57-64.
9. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. 2016. [Epub ahead of print]
10. Khan MA, Ali R, Parveen R, Najmi AK, Ahmad S. Pharmacological evidences for cytotoxic and antitumor properties of Boswellic acids from *Boswellia serrata*. *J Ethnopharmacol*. 2016. [Epub ahead of print]
11. Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, et al. *Chelidonium majus* crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2016;190:362-71.
12. Almosnid NM, Gao Y, He C, Park HS, Altman E. In vitro antitumor effects of two novel oligostilbenes, cis- and trans-suffruticosol D, isolated from *Paeonia suffruticosa* seeds. *Int J Oncol*. 2016;48(2):646-56.
13. Lewandowska U, Owczarek K, Szewczyk K, Podsędek A, Koziółkiewicz M, Hrabec E. Influence of polyphenol extract from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) seeds on human prostate and breast cancer cell lines. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2014;68:110-8.

14. Mason JK, Thompson LU. Flaxseed and its lignan and oil components: can they play a role in reducing the risk of and improving the treatment of breast cancer?. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(6):663-78.
15. Liu Z, Li X, Simoneau AR, Jafari M, Zi X. Rhodiola rosea extracts and salidroside decrease the growth of bladder cancer cell lines via inhibition of the mTOR pathway and induction of autophagy. *Mol Carcinog.* 2012;51(3):257-67.
16. Altuner EM, Ceter T, İşlek C. Investigation of antifungal activity of *Ononis spinosa* L. ash used for the therapy of skin infections as folk remedies. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(4):633-9.
17. Kirmizigül S, Gören N, Yang SW, Cordell GA, Bozok-johansson C. Spinonin, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma*. *J Nat Prod.* 1997;60(4):378-81.
18. Kobayashi Y, Sato H, Yorita M, et al. Inhibitory effects of geranium essential oil and its major component, citronellol, on degranulation and cytokine production by mast cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(6):1172-8.
19. Venskutonis PR, Dedonyte V, Lazutka J, et al. A preliminary assessment of singlet oxygen scavenging, cytotoxic and genotoxic properties of *Geranium macrorrhizum* extracts. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(2):157-63.
20. Freysdottir J, Logadottir OT, Omarsdottir SS, Vikingsson A, Hardardottir I. A polysaccharide fraction from *Achillea millefolium* increases cytokine secretion and reduces activation of Akt, ERK and NF- κ B in THP-1 monocytes. *Carbohydr Polym.* 2016;143:131-8.
21. Jenabi E, Fereidoony B. Effect of *Achillea Millefolium* on Relief of Primary Dysmenorrhea: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2015;28(5):402-4.
22. Bali EB, Açıık L, Elçi P, Sarper M, Avcu F, Vural M. In vitro anti-oxidant, cytotoxic and pro-apoptotic effects of *Achillea teretifolia* Willd extracts on human prostate cancer cell lines. *Pharmacogn Mag.* 2015;11(2):S308-15.
23. Kundaković T, Stanojković T, Juranić Z, Kovacević N. Cytotoxic and antioxidant activity of *Achillea alexandri-regis*. *Pharmazie.* 2005;60(4):319-20.
24. Dinda M, Mazumdar S, Das S, et al. The Water Fraction of *Calendula officinalis* Hydroethanol Extract Stimulates In Vitro and In Vivo Proliferation of Dermal Fibroblasts in Wound Healing. *Phytother Res.* 2016. [Publicirano online u Wiley Online Library]

25. Park JS, Chew BP, Wong TS. Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c mice. *J Nutr.* 1998;128(10):1650-6.
26. Riss T, Hook B, Duellman S. Evaluation of real time cell viability assays multiplexed with other methods. *Toxicol Lett.* 2015;238(2):S179-S80.
27. Zovko-Končić M, Fitoterapija, predavanje prezentirano 2014. na Medicinskom fakultetu u Splitu.

8. SAŽETAK

Cilj: Ispitati citotoksično djelovanje biljaka: zečji trn (*Ononis spinosa*), zdravac (*Geranium macrorrhizum*), stolisnik (*Achillea millefolium*) te neven (*Calendula officinalis*) na karcinomske stanice pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4. Pretpostavka je da će se nakon izlaganja karcinomskih staničnih linija biljnom ekstratu smanjiti preživljenje karcinomskih stanica, to jest broj karcinomskih stanica će biti manji u odnosu na kontrolnu skupinu stanica koje nisu izložene ekstraktima.

Materijali i metode: Ispitivanje citotoksičnog djelovanja ekstrakata biljaka se provodilo na stanicama karcinoma pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4. Citotoksičnost se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 sata MTT testom.

Rezultati: Karcinomske stanice A-549 stanične linije pluća pokazuju statistički značajno smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli nakon tretmana biljkama:

- ❖ zečji trn u koncentraciji od 1 g/L
- ❖ zdravac u koncentraciji od 0,1 g/L i 1 g/L
- ❖ stolisnik u koncentraciji od 1 g/L

Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije dojke pokazuju statistički značajno smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli nakon tretmana biljkama:

- ❖ zečji trn u koncentraciji od 0,25 g/L, 0,5 g/L i 1 g/L.
- ❖ zdravac u koncentraciji od 0,25 g/L, 0,5 g/L i 1 g/L
- ❖ neven u koncentraciji od 0,5 g/L
- ❖ stolisnik u svim ispitivanim koncentracijama

Karcinomske stanice T24 stanične linije mokraćnog mjehura pokazuju statistički značajno smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli nakon tretmana biljkama:

- ❖ zečji trn u svim ispitivanim koncentracijama
- ❖ zdravac u svim ispitivanim koncentracijama
- ❖ neven u svim ispitivanim koncentracijama
- ❖ stolisnik u koncentraciji od 1 g/L

Karcinomske stanice RT4 stanične linije mokraćnog mjehura pokazuju statistički značajno smanjeno preživljenje u odnosu prema kontroli nakon tretmana biljkama:

- ❖ zdravac u koncentraciji od 0,1 g/L i 1 g/L
- ❖ neven u koncentraciji od 1 g/L

Zaključci: Ovo istraživanje pokazuje da *in vitro* izlaganje stanica karcinoma pluća A-549, dojke MDA-MB-231 te mokraćnog mjehura T24 i RT4, ekstraktima biljaka zečji trn (*Ononis spinosa*), zdravac (*Geranium macrorrhizum*), stolisnik (*Achillea millefolium*) te neven (*Calendula officinalis*) dovodi do smanjenog preživljenja tih stanica. Smanjeno preživljenje nije jednako kod svih biljnih ekstrakata, kod jednakih koncentracija i vremenskih intervala izloženosti djelovanja. Smanjenje preživljenja nije uvijek bilo u razmjeru s povećanjem koncentracije ekstrakta.

9. SUMMARY

The research goal: To examine cytotoxic effect of plants: Restharrow (*Ononis Spinosa*), Bevan's Variety (*Geranium macrorrhizum*), Yarrow (*Achillea millefolium*) and Marigold (*Calendula officinalis*) on lung cancer cells A-549, breast cancer cells MDA-MB-231 and urinary bladder cancer cells T24 and RT4.

According to the hypothesis, the survival rate of cancer cells will be reduced after exposure of cancer cell lines to herbal extract, meaning that the number of cancer cells will be lesser in relation to control group of cells which are not exposed to herbal extract.

Materials and methods: The cytotoxic effect of plant extracts was examined on the cancer cells of lung cancer cell line A-549, breast cancer cell line MDA-MB-231 and urinary bladder cancer cell lines T24 and RT4. The cytotoxicity was determined after 4, 24, 48 and 72 hours by MTT test.

Results: The lung cancer cells A-549 showed statistically significant reduced survival rate in relation to the control cells after the treatment with the plants:

- ❖ Restharrow at a concentration of 1 g/L
- ❖ Bevan's Variety at a concentration of 1 g/L and 1 g/L
- ❖ Yarrow at a concentration of 1 g/L

The breast cancer cells MDA-MB-231 showed statistically significant reduced survival rate in relation to the control cells after the treatment with the plants:

- ❖ Restharrow at a concentration of 0.25 g/L, 0.5 g/L and 1 g/L.
- ❖ Bevan's Variety at a concentration of 0.25 g/L, 0.5 g/L and 1 g/L.
- ❖ Marigold at a concentration of 0.5 g/L
- ❖ Yarrow in all tested concentrations

The urinary bladder cancer cells T24 showed statistically significant reduced survival rate in relation to the control cells after the treatment with the plants:

- ❖ Restharrow at all tested concentrations
- ❖ Bevan's Variety at all tested concentrations
- ❖ Marigold at all tested concentrations
- ❖ Yarrow at a concentration of 1 g/L

The urinary bladder cancer cells RT4 showed statistically significant reduced survival rate in relation to the control cells after the treatment with the plants:

- ❖ Bevan's Variety at a concentration of 0.1 g/L and 1 g/L
- ❖ Marigold at a concentration of 1 g/L

Conclusions: This research shows that *in vitro* exposure of lung cancer cells A-549, breast cancer cells MDA-MB-231 and urinary bladder cancer cells T24 and RT4 to the plant extracts of Restharrow (*Ononis Spinosa*), Bevan's Variety (*Geranium macrorrhizum*), Yarrow (*Achillea millefolium*) and Marigold (*Calendula officinalis*) leads to reduced survival rate of those cells. The reduced survival rate is not equal to every plant extract, to equal concentrations and time intervals of the exposure. The reduced survival rate was not always in proportion to the increase of the concentration of the extract.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Mirko Modrić

Datum rođenja: 25.09.1992

Adresa: Donje Glavice 72, 21230 Sinj

Državljanstvo: hrvatsko

e-mail: modrimirko71@gmail.com

Obrazovanje:

- 1999. - 2007. Osnovna škola "Ivan Lovrić", Sinj, Republika Hrvatska
- 2007. - 2011. Srednja škola "Opća gimnazija Dinka Šimunovića", smjer: opća gimnazija, Sinj, Republika Hrvatska
- 2011. - 2016. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

Materinski jezik

Hrvatski

Strani jezici

engleski (aktivno) i talijanski