Citotoksični učinak Chelidonium majus, Alchemilla vulgaris i Polygonium aviculare na različite stanične linije humanih karcinoma

Mikić, Anni

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:784590

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Anni Mikić

CITOTOKSIČNI UČINAK *CHELIDONIUM MAJUS*, *ALCHEMILLA VULGARIS* I *POLYGONUM AVICULARE* NA RAZLIČITE STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA

Diplomski rad

Akademska godina:
2015./2016.

Mentor:
Doc.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić

Split, listopad, 2016.

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 XX. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na XX sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i XX sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor:	doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić
Pomoć pri izradi:	doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić

CITOTOKSIČNI UČINAK *CHELIDONIUM MAJUS, ALCHEMILLA VULGARIS* I *POLYGONUM AVICULARE* NA RAZLIČITE STANIČNE LINIJE HUMANIH KARCINOMA

Anni Mikić, broj indeksa:55

Sažetak:

Cilj istraživanja bio je ispitati citotoksičnost vodenih ekstrakata biljaka *Chelidonium majus* (rosopas), *Alchemilla vulgaris* (vrkuta), *Polygonum aviculare* (troskot) na stanične linije humanih karcinoma mokraćnog mjehura (RT4, T24), dojke (MDA-MB-231), te pluća (A-549). Karcinomske stanice izložene su različitim koncentracijama ekstrakata biljaka (0.1 g/, 0.25 g/L, 0.5 g/L i 1 g/L) i različitim vremenskim intervalima (4, 24, 48 i 72 sata). Postotak stanica koje su preživjele ispitan je MTT-metodom. Dobiveni rezultati pokazali su da vodeni ekstrakti rosopasa, vrkute i troskota pokazuju citotoksični učinak na stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura, dojke i pluća jer smanjuju broj živih stanica. Citotoksičnost ekstrakata biljaka ovisila je o vremenu u kojem je određena stanična linija bila izložena ekstraktu, te o koncentraciji biljnih ekstrakata, a smanjenje preživljenja nije nužno bilo proporcionalno povećanju koncentracije ekstrakata biljaka.

Ključne riječi: citotoksičnost, rak, MTT, rosopas, vrkuta, troskot

Rad sadrži: 68 stranica, 37 slika, 4 tablice, 29 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc.dr.sc. Natalija Filipović - predsjednik
2. prof.dr.sc. Anita Markotić - član
3. doc.dr.sc. Vedrana Čikeš Čulić član-mentor

Datum obrane: 27. listopada 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 1.

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. XX as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XX and Faculty Council of School of Medicine, session no. XX
Mentor:	Assist. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD
Technical assistence:	Assist. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD

CYTOTOXICITY OF *CHELIDONIUM MAJUS, ALCHEMILLA VULGARIS* AND *POLYGONUM AVICULARE* ON DIFFERENT CELL LINES OF HUMAN CANCERS

Anni Mikić, index number:55

Summary:

The aim of this study was to examine the cytotoxicity of aqueous extracts of plants *Chelidonium majus* (greater celandine), *Alchemilla vulgaris* (lady's mantle), *Polygonum aviculare* (knotweed) on cell lines of human bladder cancer (RT4, T24), breast cancer (MDA-MB-231), and lung cancer (A-549). Cancer cells were exposed to various concentrations of plant extracts (0.1 g/L, 0.25 g/L, 0.5 g/L and 1 g/L) and different time intervals (4, 24, 48 and 72 hours). The percentage of cells that survived was tested by the MTT method. The results showed that aqueous extracts greater celandine, lady's mantle and knotweed show cytotoxic effects on cell lines of bladder, breast and lung cancer as they reduce the number of viable cells. The cytotoxicity of plant extracts depended on the time in which a particular cell line was exposed to the extract, and the concentration of plant extracts and reducing survival was not necessarily proportional to the increase in the concentration of plant extracts.

Key words: cytotoxicity, cancer, MTT, greater celandine, lady's mantle, knotweed

Thesis contains: 68 pages, 37 figures, 4 tables, 29 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. assist. prof. Natalija Filipović, PhD	chair person
2. full prof. Anita Markotić, PhD	member
3. assist. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD	supervisor

Defence date: October 27, 2015.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 and Library of School of Medicine, Šoltanska 1.

Sadržaj:

1. UVOD 1

1.1. Zloćudni tumori 2

1.1.1. Karcinom mokraćnog mjehura 4

1.1.2. Karcinom dojke 5

1.1.3. Karcinom pluća 9

1.2. Biljke 10

1.2.1. *Chelidonium majus* (rosopas) 11

1.2.2. *Alchemilla vulgaris* (obična vrkuta) 15

1.2.3. *Polygonum aviculare* (troskot) 16

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 20

3. MATERIJALI I METODE 22

3.1. Postupak 26

3.2. Test citotoksične aktivnosti 27

3.3. Vodeni infuzi biljaka 28

3.4. Statistička analiza 28

4. REZULTATI 30

4.1. Stanična linija RT4 31

4.1.1. Djelovanje ekstrakta rosopasa na staničnu liniju RT4 31

4.1.2. Djelovanje ekstrakta vrkute na staničnu liniju RT4 33

4.1.3. Djelovanje ekstrakta troskota na staničnu liniju RT4 34

4.2. Stanična linija T24 36

4.2.1. Djelovanje ekstrakta rosopasa na staničnu liniju T24 36

4.2.2. Djelovanje ekstrakta vrkute na staničnu liniju T24 37

4.2.3. Djelovanje ekstrakta troskota na staničnu liniju T24 39

4.3. Stanična linija MDA-MB-231 40

4.3.1. Djelovanje ekstrakta rosopasa na staničnu liniju MDA-MB-231 40

4.3.2. Djelovanje ekstrakta vrkute na staničnu liniju MDA-MB-231 42

4.3.3. Djelovanje ekstrakta troskota na staničnu liniju MDA-MB-231 43

4.4. Stanična linija A-549 45

4.4.1. Djelovanje ekstrakta rosopasa na staničnu liniju A-549 45

4.4.2. Djelovanje ekstrakta vrkute na staničnu liniju A-549 46

4.4.3. Djelovanje ekstrakta troskota na staničnu liniju A-549 48

5. RASPRAVA 50

6. ZAKLJUČAK 55

7. LITERATURA 57

8. SAŽETAK 61

9. SUMMARY 64

10. ŽIVOTOPIS 67

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Vedrani Čikeš Čulić na ugodnoj suradnji, druženju, savjetovanju i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala svima koji su mi pomogli i dali podršku tijekom studiranja.

1. UVOD

1.1. Zloćudni tumori

Zloćudna se preobrazba očituje pretjeranim umnožavanjem stanica koje stvaraju tumore ili se nakupljaju u pretjeranom broju u izvanstaničnim tekućinama (krv, ascites) i metastaziraju. Temeljni je poremećaj mutacija gena koji nadziru stanični ciklus s posljedičnim gubitkom kontrole staničnog umnožavanja. Takve promjene mogu biti nasljedne ili stečene, kao što su somatske mutacije zbog fizikalnih ili kemijskih oštećenja DNA (1).

Rizični čimbenici:

Rizični čimbenici pogoduju nastanku novotvorina. Dijele se na:

a) predodređene koje se ne mogu mijenjati: dob, spol, genska predispozicija

b) varijabilne na koje se može utjecati: prehrana, okoliš, infekcije, lijekovi i radioterapija (2).

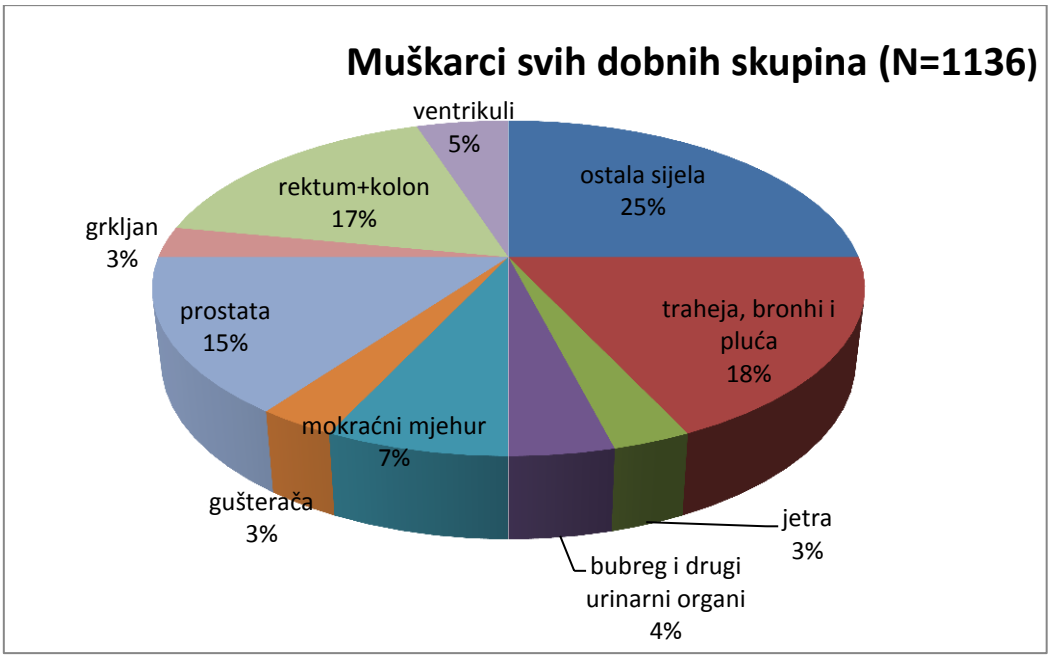
Incidencija raka u Hrvatskoj (2013. g.):

Prema spolu:

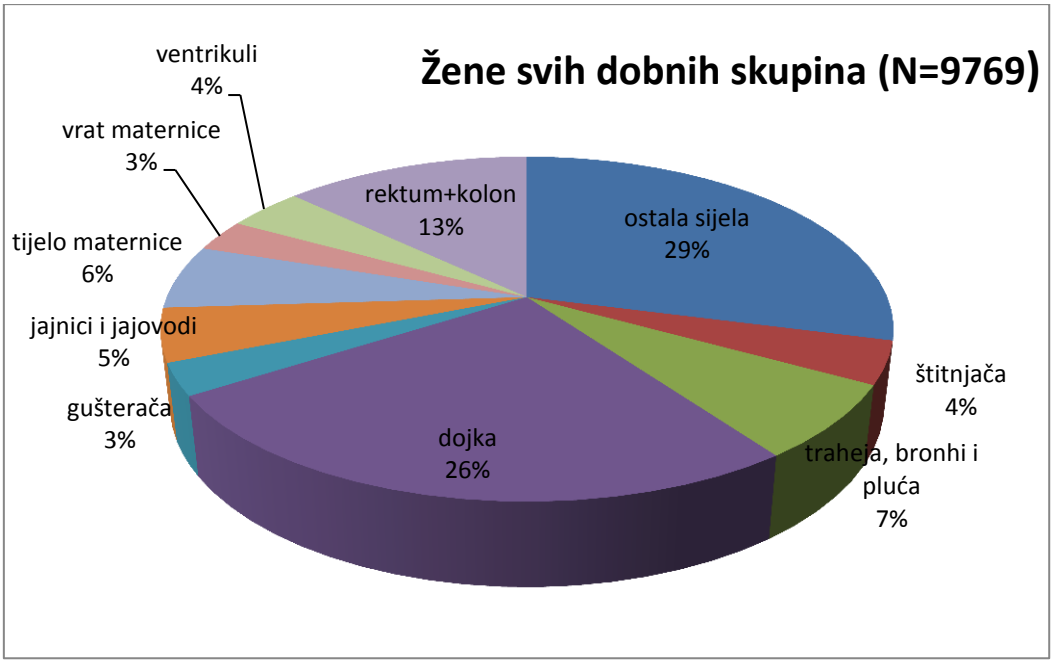
Pet najčešćih sijela raka čine ukupno 57% novih slučajeva raka u muškaraca (Slika 1): traheja, bronhi i pluća (18%), prostata (15%), kolon (10%), mokraćni mjehur (7%) i rektum, rektosigma i anus (7%) (3).

Pet najčešćih sijela raka čine ukupno 52% novih slučajeva raka u žena (Slika 2): dojka (26%), kolon (8%), traheja, bronhi i pluća (7%), tijelo maternice (6%) i rektum, rektosigma i anus (5%) (3).

Najčešća sijela raka prema spolu u 2013. g. u Republici Hrvatskoj:



Slika 1. Udio različitih vrsta raka kod muškaraca



Slika 2. Udio različitih vrsta raka kod žena

Mortalitet od raka u Republici Hrvatskoj u 2013. g.:

U Hrvatskoj je 2013. godine od raka umrlo 13 788 osoba, 7 888 muškaraca i 5 900 žena. Stope mortaliteta bile su 321,8/100 000; odnosno 321,7/100 000 muškaraca i 265,9/100 000 žena. Odnos muškaraca i žena je 57:43 (3).

1.1.1. Karcinom mokraćnog mjehura

Obično je u pitanju karcinom prijelaznog epitela. Simptomi su hematurija, a kasnije bolna urinarna opstrukcija. Dijagnoza se postavlja slikovnim prikazom ili cistoskopijom i biopsijom. Liječi se kirurški, fulguracijom, intravezikalnom instilacijom ili kemoterapijom. Preko 90% maligniteta mokraćnog mjehura otpada na karcinome prijelaznih stanica. Većinom je riječ o papilarnim karcinomima koji su obično površni, dobro diferencirani i rastu prema lumenu, dok su sesilni tumori podmukliji, skloni ranoj invaziji i metastaziranju. Planocelularni karcinom je rjeđi, a obično se javlja u bolesnika s parazitozom ili kroničnom iritacijom sluznice mjehura. Adenokarcinom se javlja kao primarna novotvorina ili predstavlja metastazu karcinoma crijeva, kojega valja isključiti. Karcinomi mjehura metastaziraju u limfne čvorove, pluća, jetru i kosti. Rak mjehura *in situ* je visokog stupnja, ali neinvazivan i obično multifokalan, pa je sklon recidiviranju (4).

Rizični čimbenici:

<u>Rizični čimbenici koji se mogu mijenjati:</u>

Pušenje je najvažniji faktor rizika za rak mokraćnog mjehura. Pušači imaju tri puta veću vjerojatnost dobivanja raka mokraćnog mjehura nego nepušači. Pušenje uzrokuje oko pola od svih slučajeva raka mokraćnog mjehura kod muškaraca i kod žena. Izloženost kemikalijama je još jedan rizik. Neke industrijske kemikalije su povezane s rakom mokraćnog mjehura. Aromatski amini, kao što su benzidin i beta-naftilamin, koji se ponekad koriste u industriji boja, mogu uzrokovati rak mokraćnog mjehura. Radnici koji su izloženi većem riziku uključuju one koje rade s gumama, kožom, tekstilom i bojama, slikari, strojari, pisači, frizeri (vjerojatno zbog velike izloženosti bojama za kosu) i vozača kamiona (vjerojatno zbog izloženosti dizelskih ispušnih plinova). Određeni lijekovi ili biljni dodaci mogu povećati rizik. Prema US Food and Drug Administration (FDA), korištenje lijeka za dijabetes (pioglitazona) više od jedne godine može biti povezano s povećanim rizikom od raka mjehura. Dodaci

prehrani koji sadrže aristolohičnu kiselinu (uglavnom u biljkama iz porodice aristolochia) su također povezani s povećanim rizikom od raka mokraćnog mjeura (5).

Rizični fakori koji se ne mogu mijenjati:

Rizik od raka mokraćnog mjehura se povećava s dobi. Oko 9 od 10 ljudi s rakom mokraćnog mjehura su stariji od 55 godina, a mnogo je češći u muškaraca nego u žena. Urinarne infekcije, bubrežni kamenci i kamenci u mokraćnom mjehuru, urinarni kateteri koji stoje na mjestu dugo vremena su povezani s rakom mokraćnog mjehura (posebno s karcinomom pločastih stanica mjehura). Šistosomijaza, parazitska infekcija crvom koji se nađe u mokaćnom mjehuru, također je faktor rizika za rak mokraćnog mjehura. U zemljama u kojima je ovaj parazit čest (uglavnom u Africi i na Bliskom istoku), rak skvamoznih stanica mokraćnog mjehura je mnogo učestaliji. Pojedinci čiji članovi obitelji imaju rak mokraćnog mjehura imaju veći rizik od dobivanja raka i sami. Ponekad to može biti zato što su članovi obitelji izloženi istim kemikalijama koji uzrokuju rak (poput onih iz duhanskog dima). Oni također mogu dijeliti promjene u nekim genima koje onemoguće tijelu da izluči određene toksine, što ih čini sklonijima oboljevanju od raka mokraćnog mjehura (5).

Klinička slika i dijagnoza

Većina bolesnika se javlja zbog makro– ili mikrohematurije. Neki su anemični, pa se hematurija otkrije pri obradi slabokrvnosti. Česti su i simptomi nadražaja (polakisurija, pečenje, učestalo mokrenje), te piurija. Bolovi u zdjelici javljaju se kod uznapredovalog tumora(4).

1.1.2. Karcinom dojke

Rak dojke najčešće zahvaća žljezdane stanice dojke u kanalićima ili lobulima. Većina bolesnica ima asimptomatsku kvržicu koja se otkriva tijekom pregleda ili probirne mamografije. Dijagnoza se potvrđuje biopsijom. Liječenje obično uključuje kirurško odstranjenje, često sa zračenjem i adjuvantnim sistemskim liječenjem (4).

Rizični čimbenici:

Većina tumora dijagnosticira se u dobi iznad 60 godina. Obiteljska anamneza opterećena rakom dojke u rođakinje u prvom koljenu (majke, sestre, kćeri) udvostručuje ili utrostručuje rizik od razvoja raka, no opterećenost anamneze rakom u daljih rođakinja tek neznatno povećava rizik. Oko 5% žena s rakom dojke nose mutaciju jednog od 2 poznata gena za rak dojke, *BRCA1* ili *BRCA2*. Ako su rođaci tih žena također nosioci gena, one imaju tijekom života rizik od 50 do 85% da razviju rak dojke. Žene s mutacijama *BRCA1* također su imaju 20–40% rizik da u tijeku cijelog života razviju rak jajnika; u žena s mutacijom *BRCA2* rizik je manji. Žene bez opterećenja obiteljske anamneze s rakom dojke u barem 2 rođakinje u 1 koljenu vjerojatno ne nose taj gen, te im stoga probir na *BRCA1* i *BRCA2* mutacije nije potreban. Muškarci koji nose *BRCA2* mutaciju imaju povećan rizik od razvoja raka dojke (4).

Rana menarha, kasna menopauza ili prva trudnoća u kasnijim godinama povećavaju rizik (4).

Fibrocistična bolest kod koje je bilo potrebno učiniti biopsiju neznatno povećava rizik. Žene s višestrukim kvržicama u dojci, ali bez histološki potvrđenih osobina visokog rizika, ne bi se trebale smatrati visoko rizičnima. Dobroćudne promjene koje mogu malo povećati rizik od razvoja invazivnog raka dojke uključuju složeni fibroadenom, umjerenu ili floridnu hiperplaziju (s atipijom ili bez nje), sklerozirajuću adenozu i papilom. Atipična duktalna ili lobularna hiperplazija povećava rizik od invazivnog raka dojke 4 do 5 puta; rizik se povećava do 10 puta u bolesnica s opterećenom obiteljskom anamnezom rakom dojke u rođakinje u 1. koljenu (4).

Primjena oralnih kontraceptiva povećava rizik vrlo malo (za otprilike 5 slučajeva više na 100.000 žena). Rizik se povećava ponajprije tijekom godina primjene kontraceptiva, a ublažava se tijekom 10 godina nakon prestanka primjene. Rizik je najveći u žena koje započinju s primjenom kontraceptiva prije 20. godine (iako je apsolutni rizik vrlo nizak) (4).

Čini se kako postmenopauzalno liječenje hormonima umjereno povećava rizik tek nakon 3 godine primjene. Kod produljene primjene, rizik se povećava za oko 7 do 8 slučajeva na 10.000 žena za svaku godinu primjene. Čini se kako primjena samog estrogena ne povećava rizik od raka dojke. Selektivni modulatori estrogenih receptora (npr. raloksifen) mogu umanjiti rizik od razvoja raka dojke (4).

Prehrana može imati ulogu u uzrokovanju ili poticanju rasta raka dojke, no čvrsti zaključci o učinku određene prehrane (npr. one bogate mastima) nedostaju. Gojazne postmenopauzalne žene imaju povećani rizik, no nema dokaza da promjena načina prehrane umanjuje rizik. U gojaznih žena koje još menstruiraju rizik može biti smanjen (4).

Radioterapija provedena prije 30. godine povećava rizik. Liječenje Hodgkinova limfoma otprilike učetverostručuje rizik od razvoja raka dojke u sljedećih 20 do 30 godina (4).

Patologija

Većina malignih tumora dojke su epitelni tumori koji se razvijaju od stanica koje oblažu kanaliće ili lobule; rjeđe su to neepitelni tumori potporne strome (angiosarkom, primarni stromalni sarkomi, filodes tumor). Rak se dijeli na karcinom *in situ* i invazivni rak (4).

Karcinom *in situ* je bujanje stanica raka unutar kanalića ili lobula, a bez prodora u okolno tkivo strome. Obično se duktalni karcinom *in situ* (DCIS) otkriva tek mamografijom i ograničen je na jedno područje; može postati invazivan. Lobularni karcinom *in situ* (LCIS) je neopipljiva promjena koje se obično otkriva biopsijom; rijetko je vidljiva mamografijom. LCIS nije zloćudan, ali njegova prisutnost ukazuje na povećani rizik od kasnijeg invazivnog karcinoma u bilo kojoj dojci; od bolesnica s LCIS–om, njih 1 do 2% godišnje dobije rak (4).

Invazivni karcinom je ponajprije adenokarcinom. Oko 80% je infiltrirajućeg duktalnog tipa; većina ostalih su infiltrirajući lobularni. Rijetki oblici uključuju medularne, mucinozne i tubularne karcinome (4).

Pagetova bolest bradavice (koje se ne smije zamijeniti s metaboličkom bolesti kostiju koja se također zove Pagetova bolest) je oblik duktalnog karcinoma *in situ* koji se širi na kožu bradavice i areolu, a očituje se u vidu upalne promjene. Karakteristične zloćudne stanice zvane Pagetove stanice se nalaze u epidermisu. Rak može biti *in situ* ili invazivan (4).

Rak dojke invadira lokalno i širi se u početku kroz regionalne limfne čvorove, krv ili oboje. Metastatski rak dojke može zahvatiti skoro sve organe u tijelu – najčešće pluća, jetra, kosti, mozak i kožu. Većina metastaza u kožu događa se na području operirane dojke;

metastaze u kožu glave su također česte. Metastatski rak dojke se često pojavljuje godinama ili desetljećima nakon početne dijagnoze i liječenja (4).

Estrogenski i progesteronski receptori, prisutni u nekim karcinomima su jezgreni hormonski receptori koji potiču replikaciju DNK i diobu stanice kad se vežu za odgovarajuće hormone. Stoga, lijekovi koji blokiraju ove receptore mogu biti korisni u liječenju tumora s tim receptorima. Oko $^{2}/_{3}$ postmenopauzalnih bolesnica ima tumore pozitivne na estrogenske receptore (ER+). Među premenopauzalnim bolesnicama je incidencija ER+ tumora manja. Drugi stanični receptor je protein humanog epidermalnog faktora rasta (HER2); njegova prisutnost je u korelaciji s lošijom prognozom u bilo kojem stadiju raka (4).

Simptomi i znakovi

Većinu raka dojke otkriva bolesnica sama ili se otkriva tijekom rutinskog tjelesnog pregleda ili mamografije, u obliku kvržice. Rjeđe je simptom kojim se očituje bol u dojci ili povećanje ili neodređeno zadebljanje dojke. Pagetova bolest bradavice se manifestira kožnim promjenama, uključujući crvenilo, stvaranje krusta, ljuskica i iscjetka; oni se obično čine tako dobroćudnim da ih bolesnica zanemaruje, odgađajući postavljanje dijagnoze za godinu dana ili dulje. Oko 50% bolesnica s Pagetovom bolešću u vrijeme dolaska liječniku ima opipljivu masu. Rijetke bolesnice s rakom dojke dolaze sa znakovima metastatske bolesti (npr. patološkim prijelomom kosti, disfunkcijom pluća) (4).

Česti nalaz prilikom tjelesnog pregleda je dominirajuća tvorba — kvržica različita od okolnog tkiva dojke. Difuzne fibrotične promjene u kvadrantu dojke, obično gornjem vanjskom kvadrantu, su tipičnije za dobroćudne poremećaje; nešto čvršće zadebljanje u jednoj dojci, ali ne i u drugoj može biti znak raka. Uznapredovaliji rak dojke obilježen je fiksacijom kvržice za stijenku prsnog koša ili nadležeću kožu, satelitnim čvorovima ili ulceracijama kože ili naglašenijim uobičajenim osobinama kože što nastaje zbog limfedema (takozvana narančina kora). Povećani ili fiksirani limfni čvorovi pazuha, kao i supraklavikularna ili infraklavikularna limfadenopatija ukazuju na širenje tumora. Upalni rak dojke je obilježen difuznom upalom i povećanjem dojke, često bez nalaza kvržice te ima osobito agresivan tijek (4).

1.1.3. Karcinom pluća

Karcinom pluća je maligni tumor pluća, a histološki može biti karcinom malih stanica (mikrocelularni) ili ne–malih stanica (nemikrocelularni). Pušenje je glavni faktor rizika za većinu tipova raka. Simptomi su kašalj, neodređene tegobe u prsima, a rjeđe, hemoptize, ali mnogi bolesnici nemaju simptoma pa se neki pacijenti prvi put javljaju kad je bolest već metastazirala. Dijagnoza počiva na RTG–u pluća ili CT–u toraksa, a potvrđuje se biopsijom. Liječi se kirurški, kemoterapijom i/ili zračenjem. Unatoč napretku u liječenju, prognoza je loša pa je najvažnije rano otkrivanje i prevencija (4).

Epidemiologija, patofiziologija i klasifikacija

Pušenje cigareta, uključujući i pasivno pušenje je najvažniji uzrok. Rizik ovisi o životnoj dobi, intenzitetu pušenja i pušačkom stažu. Po prestanku pušenja rizik se smanjuje, ali se vjerojatno nikada ne vraća na normalu. Izloženost radonu, plinovitom produktu raspada radija i urana je najvažniji faktor rizika u nepušača. Profesionalna izloženost radonu (zaposleni u rudnicima urana), azbestu (radnici u građevinarstvu, cjevovodima, brodogradilištima i u automobilskoj industriji), siliciju (rudari i pjeskari), arsenu (radnici u valjaonicama bakra, proizvodnji pesticida i drvnoj industriji), kromatima (u čeličanama i tvornicama za proizvodnju boja), niklu (u proizvodnji akumulatora i nehrđajućeg čelika); klorometil eteru, beriliju i emisija iz koksara (radnici u čeličanama) doprinosi pojavi ove bolesti, ali u malom broju slučajeva godišnje. Rizik od raka je veći kada postoji kombinirani utjecaj, tj. izloženost toksinima i pušenje, nego kada je samo jedna vrsta rizika u pitanju. KOPB (kronična opstruktivna bolest pluća) i plućna fibroza mogu povećati sklonost ovoj bolesti; unošenje β–karotena može povećati podložnost u pušača. Zagađen zrak i dim cigare sadrže kancerogene tvari, ali nije dokazano da izazivaju karcinom pluća (4).

Simptomi i znakovi

Oko 25% karcinoma pluća su asimptomatski, a otkrivaju se slučajno pri snimanju pluća. Simptomi i znakovi ovise o tome je li u pitanju lokalni tumor, regionalno širenje ili metastaza. Paraneoplastički sindromi i opći simptomi mogu se javiti u bilo kojem stadiju bolesti (4).

Lokalni rast tumora izaziva kašalj, a rjeđe dispneju zbog opstrukcije dišnih putova, postopstruktivnu atelektazu i limfogeno širenje. Oko pola bolesnika žali se na neodređenu ili

lokaliziranu bol u prsima. Hemoptize su rjeđe, a gubitak krvi je neznatan, osim u rijetkim slučajevima kada tumor erodira glavnu arteriju i izazove obilno krvarenje i smrt gušenjem (4).

Kompresija ili invazija gornje šuplje vene može izazvati glavobolju ili osjećaj pune glave, otok lica ili gornjih ekstremiteta, nedostatak zraka dok leži na leđima i navale crvenila (pletora). Znakovi sindroma kompresije su otok lica, vrata i gornjih udova, te nabrekle potkožne vene na licu i gornjem dijelu trupa, kao i crvenilo lica i trupa (4).

Tumori u vrhu pluća mogu prodrijeti u brahijalni pleksus, pleuru ili rebra, izazvati bol u ramenu i ruci te slabost ili atrofiju ruke (Pancoastov tumor). Hornerov sindrom (ptoza, mioza, enoftalmus i anhidroza) nastaje kada je zahvaćen paravertebralni simpatički lanac ili cervikalni stelatni ganglion. Širenje tumora na perikard može proći bez simptoma ili dovesti do konstriktivnog perikarditisa ili tamponade srca (4).

Metastaze uvijek na kraju izazivaju simptome koji ovise o lokalizaciji presadnica. Presadnice u jetri izazivaju gastrointestinalne simptome i na kraju hepatičnu insuficijenciju. Metastaze u mozgu izazivaju promjene ponašanja, smetenost, afaziju, konvulzije, parezu ili paralizu, mučninu i povraćanje i na kraju komu i smrt. Metastaze u kostima izazivaju jake bolove i patološke frakture. Karcinom pluća često metastazira u nadbubrežne žlijezde, ali je adrenalna insuficijencija rijetka (4).

Paraneoplastički sindrom je skup simptoma i znakova koji ne potječu izravno od karcinoma, već od njegove aktivnosti. Najčešći paraneoplastički sindromi u oboljelih od karcinoma pluća su: hiperkalcijemija, sindrom neodgovarajuće sekrecije antidiuretskog hormona, batičasti prsti sa ili bez hipertrofične osteoartropatije, hiperkoagulabilnost sa površnim tromboflebitisom (Trousseauov sindrom), mijastenija (Eaton–Lambertov sindrom) i niz neuroloških sindroma, uključujući neuropatije, encefalopatije, encefalitide, mijelopatije i bolest cerebeluma (4).

Opći simptomi najčešće su mršavljenje i umor, a katkad su prvi pokazatelji postojećeg maligniteta (4).

1.2. Biljke

Tri biljke koje su korištene u ovom eksperimentu su: *Chelidonium majus* (rosopas), *Alchemilla vulgaris* (vrkuta), *Polygonum aviculare* (troskot).

1.2.1. *Chelidonium majus* (rosopas)

Vrsta: *Chelidonium majus* L. – rosopas obični

Porodica: *Papaveraceae* – makovi

Rod: *Chelidonium*

Izgled biljke:

Rosopas je višegodišnja zeljasta biljka s narančastocrvenim mliječnim sokom u korijenu, stabljici i listovima (Slika 3). Stabljika je razgranjena, 30-60 (100) cm visoka. Listovi su neparno perasto razdijeljeni s izduženim režnjevima, koji su odozgo zeleni, a na naličju (zbog voska) modrozeleni. Stabljika i listovi obrasli su nježnim dlakama. Cvjetovi su na dugim stapkama, sakupljeni u rahlom štitcu. Čašku čine 2 lapa, a vjenčić 4 zlatnožute latice. Cvjetanje traje od travnja do listopada. Plod je izdužen (do 5 cm dug i 2-3 cm širok) tobolac s brojnim (1500 po biljci) sjemenkama. Sjemenke su crne s bijelim elajsomom, zbog kojeg ih sakupljaju i pri tome šire mravi (mirmekohorija) (6).



Slika 3. *Chelidonium majus*, izgled (preuzeto sa: http://www.botanical.com/botanical/mgmh/c/celgre43-l.jpg)

Stanište:

Rosopas raste pojedinačno ili u skupinama u živicama, uz zidove i puteve, te na strmim kamenitim staništima. To je tipična ruderalna biljka koja raste na tlu koja je bogata nitro spojevima (6, 7).

Rasprostranjenost:

Rosopas je biljka široko rasprostranjena širom svijeta. Može se naći u Europi, Aziji, Sjeverozapadnoj Africi i Sjevernoj Americi (8).

Ljekarnički naziv:

Chelidonii herba - (Chelidonii majoriis herba) - zelen rosopasa običnog

Chelidonii herba se sastoji od pri 60-70˚ C naglo osušene zeleni rosopasa običnog *Chelidonium majus* L., Papaveraceae (8).

Svojstva:

Slabog je, ali karakterističnog mirisa, a gorkog, ljutog i neugodnog okusa (8).

Mikroskopija:

U stabljici se vide mliječne cijevi, a na epidermi puči i člankovite dlake. Epidermalne stanice lista su poligonalne. List je dorziventralan s jednim redom palisada. Epidermalne stanice latica su valovite (8).

Prašak je žućkastozelen. Sastoji se od fragmenata lista s palisadama, epidermom i pučima, kao fragmenata latica, a možda i sjemene lupine s kristalima kalcij oksalata (8).

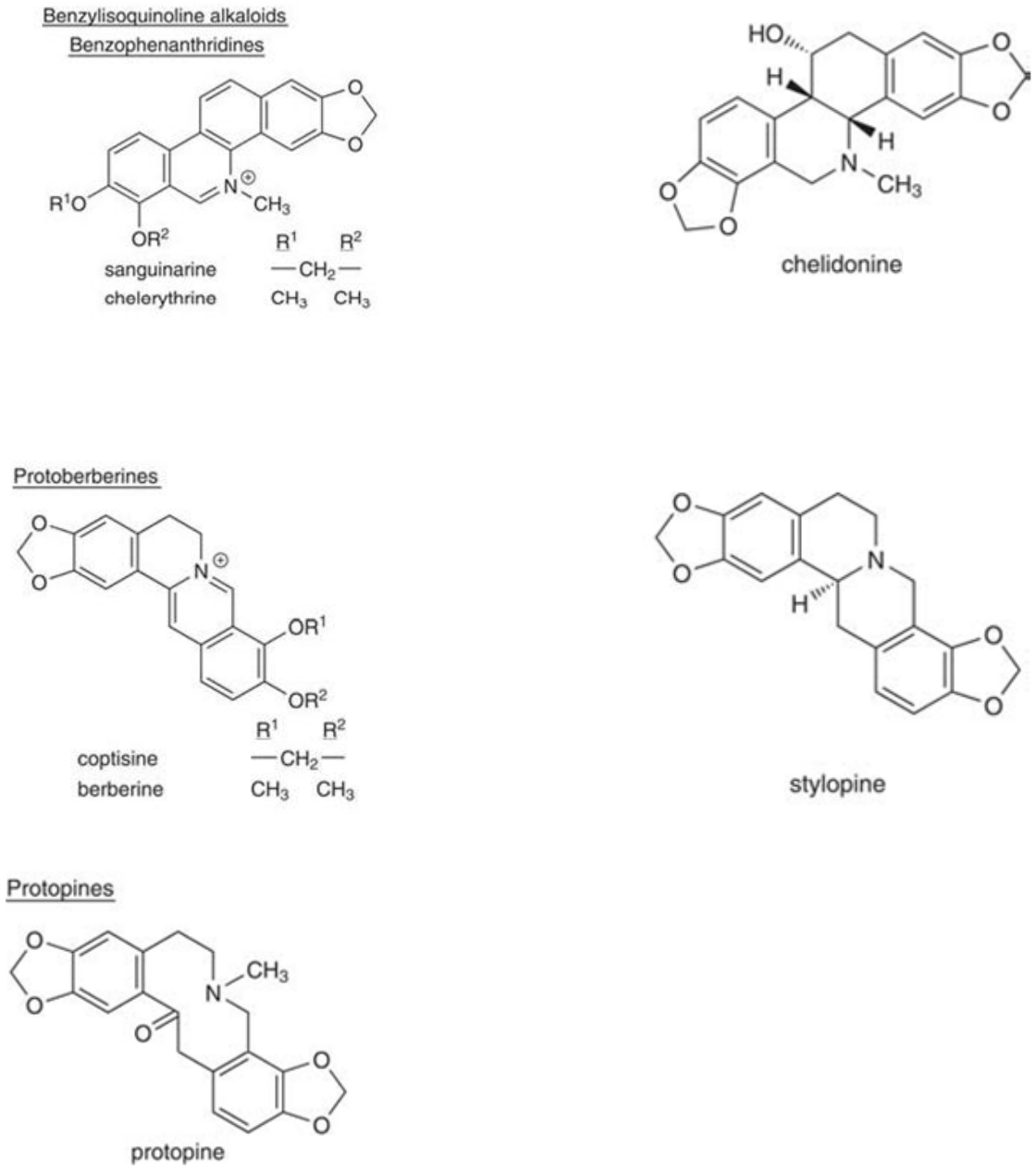
Identifikacija i ispitivanje stupnja čistoće:

Uz makroskopsku i mikroskopsku analizu, farmakopeje propisuju i provjeru identiteta i stupnja čistoće metodom kromatografije na tankom sloju (8).

Kemijski sastav:

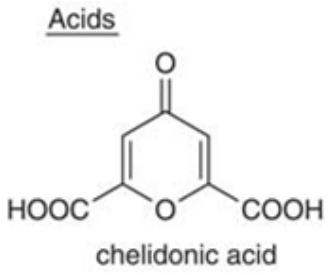
U rosopasu je identificirano više od 20 alkaloida, a neki od njih su benzofenantridinskog tipa (0,01-1%) svrstani u 3 podgrupe (Slika 4). U nadzemnom

dijelu biljke glavni alkaloid je koptizin, a u korijenu kelidonin (Slika 4). Drugi su alkaloidi keletrin i sangvinarin. Nadalje, u sastav ulaze i kiseline: kiselina rosopasa (Slika 5), jabučna kiselina, limunska, kafeinska itd. Ostali spojevi u kemijskom sastavu rosopasa su: saponini, karotenoidi, flavonoidi, fitocitostatin (kelidocistatin) i spartein (7, 8).



Slika 4. Neki od alkaloida prisutnih u kemijskom sastavu rosopasa

(preuzeto sa: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2012/01/WC500120711.pdf)



Slika 5. Kiselina prisutna u kemijskom sastavu rosopasa

(preuzeto sa: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2012/01/WC500120711.pdf)

Određivanje:

Sadržaj alkaloida određuje se fotometrijski. Ne smije biti manji od 0,6%, računano kao kelidonin (DAB 1998) (8).

Čuvanje: zaštićeno od vlage i svjetla (8).

Farmaceutski oblik:

1. Biljni pripravci u čvrstom ili tekućem dozirnom obliku ili kao biljni čaj za oralnu primjenu.

2. Biljni pripravci u čvrstom ili tekućem dozirnom obliku za vanjsku upotrebu.

Za unutarnju primjenu dolazi kao tinktura (1:10) s 45%-tnim alkoholom, te tekući i suhi ekstrakt. Kao kapi za oči i mast upotrebljava se za vanjsku primjenu (7).

Djelovanje:

Zbog žutog mliječnog soka rosopasa ljudi su vrlo rano obratili pozornost na tu biljku, pa je ona vrlo star pučki lijek. I kod nas se rosopas rabi protiv različitih bolesti, ponajprije

unutarnjih: protiv žutice, bolesti jetre, a u novije doba i za bolesti raka. Svježim sokom skidaju se bradavice (8).

Ekstrakti rosopasa primjenjuju se kod spazma probavnog trakta, upale žučnog mjehura, te bolova izazvanih žučnim kamencima. Pojedini alkaloidi imaju vrlo različita djelovanja. Kelidonin djeluje slabije centralnoumirujuće od morfina, a slabije spazmolitski od papaverina. On je mitozni otrov i sprječava rast tumora. Keleritrin uzrokuje uzetost, centralno kočenje, mučninu i podražuje sluznicu. Sangvinarin djeluje narkotično, a u većim dozama uzrokuje grčeve slične onima koje izaziva strihnin. Svi su rosopasovi alkaloidi djelotvorni protiv gram-pozitivnih bakterija (8).

1.2.2. *Alchemilla vulgaris* (obična vrkuta)

Vrsta: *Alchemilla vulgaris* L. – obična vrkuta

Porodica: *Rosaceaea* – ružovke

Rod: *Alchemilla*

Izgled biljke:

Vrkuta je višegodišnja zeljasta biljka visoka 20-40 cm (Slika 6). Iz podanka izrastaju listovi koji čine prizemnu rozetu. Oni imaju duge peteljke i okrugle plojke s 5 do 8 režnjeva, koji su na rubu nazubljeni. Iz podanka izbija i stabljika, koja nosi sjedeće listove i završava cvatom. Cvjetovi su brojni, vrlo sitni, zelenkasti. Oni imaju peteročlanu „vanjsku čašku“ i čašku, a vjenčića nemaju (6).



Slika 6. *Alchemilla vulgaris*, izgled (preuzeto sa: http://www.botanical.com/botanical/mgmh/l/ladman05.html)

Stanište:

Vrkuta raste na vlažnim livadama, u svijetlim šumama i na kamenitim mjestima (6).

Rasprostranjenost:

Vrkuta originalno potječe iz Europe, SAD-a i Kanade (9).

Kemijski sastav:

Tekući ekstrakti sadrže flavonoidske glikozide koji se sastoje od derivata kvercetina i galne kiseline (10).

Farmaceutski oblik:

Koristi se za unutarnju upotrebu kao biljni čaj za hipertenziju i kao infuz za dijabetes (10).

Djelovanje:

U Europi se tradicionalno koristi za liječenje krvarenja, ekcema, upale, proljeva, čireva, osipa na koži, poremećaja menstruacijskog ciklusa i edema. Vrkuta se primarno koristi zbog svog adstrigentnog i antidijaroičnog učinka. Visoki sadržaj tanina (pedunkulagin i alkemilin) je vjerojatno odgovoran za sposobnost cijeljenja rana i adstrigentni učinak ove biljke (6, 9).

1.2.3. *Polygonum aviculare* (troskot)

Vrsta: *Polygonum aviculare* L.- ptičji dvornik, troskot, oputina

Porodica: *Polygonaceae* – dvornici

Rod: *Polygonum*

Izgled biljke:

Troskot je jednogodišnja biljka s razgranjenom i, najčešće uz zemlju, stabljikom, duga 5-55 cm (Slika 7). Listovi su izmjenični, s kratkom peteljkom ili sjedeći i tamnozelenom eliptičnom do linearnom plojkom. Cvjetovi su ružičasti, bijeli ili zelenkasti, smješteni po 1-6 zajedno u pazušcima listova. Cvjeta od ranog ljeta do kasne jeseni. Oraščići su trobridni, a može ih biti do 2000 po biljci (6).



Slika 7. *Polygonum aviculare,* izgled biljke (preuzeto sa: http://www.plant-identification.co.uk/skye/polygonaceae/polygonum-aviculare.htm)

Stanište:

Staništa troskota su umjereno topla, slabo prozračna tla. Ptičji dvornik česta je biljka gaženih mjesta, pašnjaka, oranica, vrtova i različitih zapuštenih mjesta (6).

Rasprostranjenost:

Biljka je porijeklom iz Europe i dijela Azije s umjerenom klimom, a ne raste u tropskoj i južnoj Africi, Indiji i Polineziji (8, 11).

Ljekarnički naziv:

Polygoni avicularis herba - zelen oputine.

Pravilno osušen biljni materijal mora imati lijepu zelenu boju. U ljekarne dolazi u konciziranom obliku. Osušena zelen je bez mirisa i trpka okusa (8).

Farmaceutski oblik:

1. Usitnjena biljna tvar kao biljni čaj za oralnu primjenu.

2. Usitnjena biljna tvar za dekote za usnu sluznicu (12).

Indikacije:

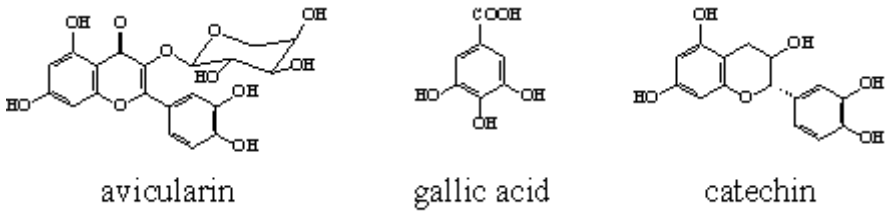
1. Tradicionalni biljni lijek se koristi za olakšanje simptoma prehlade.

2. Tradicionalni biljni lijek se koristi za liječenje manjih upala usta ili grla.

3. Tradicionalni biljni lijek se koristi za povećavanje količine urina kako bi se postiglo ispiranje mokraćnog sustava, kao pomoć kod urinarnih infekcija (12).

Kemijski sastav:

Biljka sadrži 3,6% tanina (galna kiselina, derivati katehina) (Slika 8), flavonoida (avikularin) (Slika 8), kumarina i sluzi, te približno 1% silicijeve kiseline, od čega je samo 0,2% u topivom obliku (orto-kremična kiselina) (8, 11).



Slika 8. Neki od najznačajnijih spojeva u troskotu (avikularin, galna kiselina i katehin) (preuzeto sa:http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0016_08_pharmacognosy_2/ch14.html)

Djelovanje:

U službenoj medicini se rijetko rabi. Primjenjuje se u dodatnoj terapiji protiv tuberkuloze, u nekim gotovim preparatima kao sredstvo protiv kašlja, katkad kao

ekspektorans i sekretolitik, kao i blagi diuretik. Terapijski učinak u nekim slučajevima tuberkuloze pripisuje se sadržaju kremene kiseline, a diuretski sadržaju flavonoida.

U pučkoj medicini nalazi široku primjenu kao sredstvo protiv tuberkuloze, te kao hemostiptik; također se rabi za zaustavljanje krvarenja iz pluća, želuca, uterusa i crijeva. Kao droga sa silicijevom kiselinom ulazi u sastav čajne mješavine „Kobert-Kühnscher Kiesel-tee“, koji se preporuča za početni stupanj tuberkuloze pluća (8).

Čuvanje:

Osušena zelen sprema se u vreće, pri čemu valja paziti da se listovi i cvjetovi ne otkidaju sa stabljike. Otpale dijelove treba dodati ostalom biljnom materijalu, koji treba nadzirati svakih nekoliko dana (8).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ovog istraživanja je ispitati citotoksičnost vodenih ekstrakata biljaka: *Chelidonium majus* (rosopas), *Alchemilla vulgaris* (vrkuta) i *Polygonum aviculare* (troskot) na stanične linije humanih karcinoma mokraćnog mjehura, dojke, te pluća. Stanične linije korištene u ovom ispitivanju citotoksičnosti su: RT4, T24 (karcinom mokraćnog mjehura), MDA-MB-231 (karcinom dojke), A-549 (karcinom pluća).

3. MATERIJALI I METODE

Stanične linije:

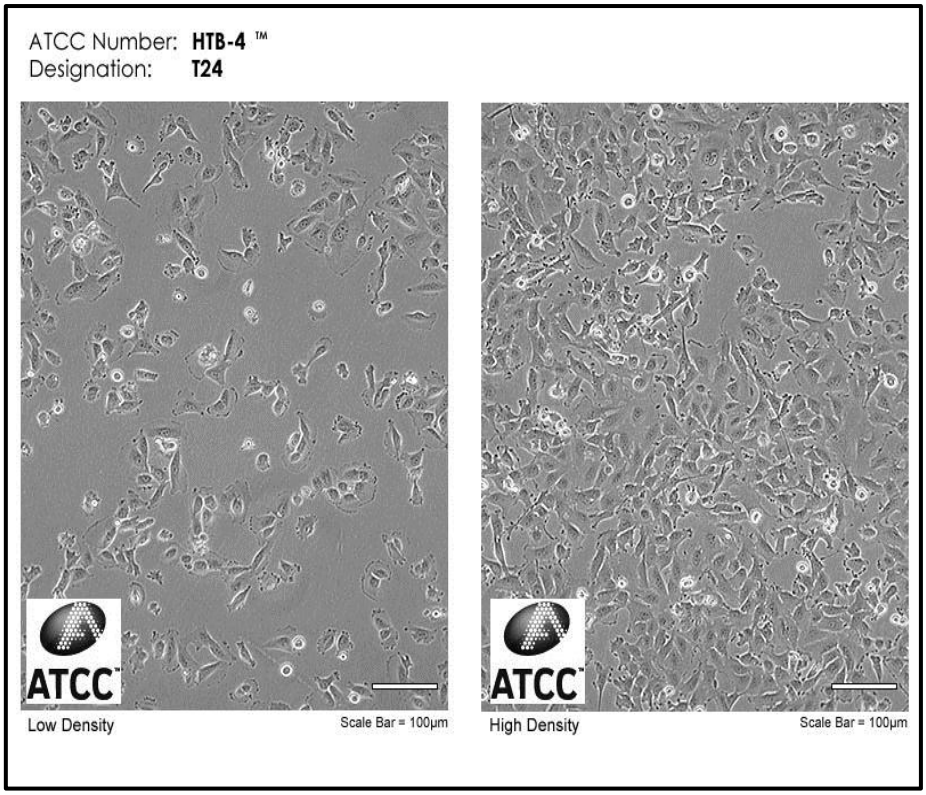
U *in vitro* istraživanju ispitivanje djelovanja ekstrakata biljaka provodilo se na karcinomskim stanicama RT4 i T24 staničnim linijama mokraćnog mjehura (Tablica 1 i 2), MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke (Tablica 3) i A-549 staničnoj liniji karcinoma pluća (Tablica 4).

Tablica 1. Obilježja RT4 stanične linije (preuzeto sa https://www.lgcstandards-atcc.org/)

Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	mokraćni mjehur
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	papilom prijelaznih stanica
Dob i spol	63 godine, muškarac

Tablica 2. Obilježja T24 stanične linije (preuzeto sa: https://www.lgcstandards-atcc.org/)

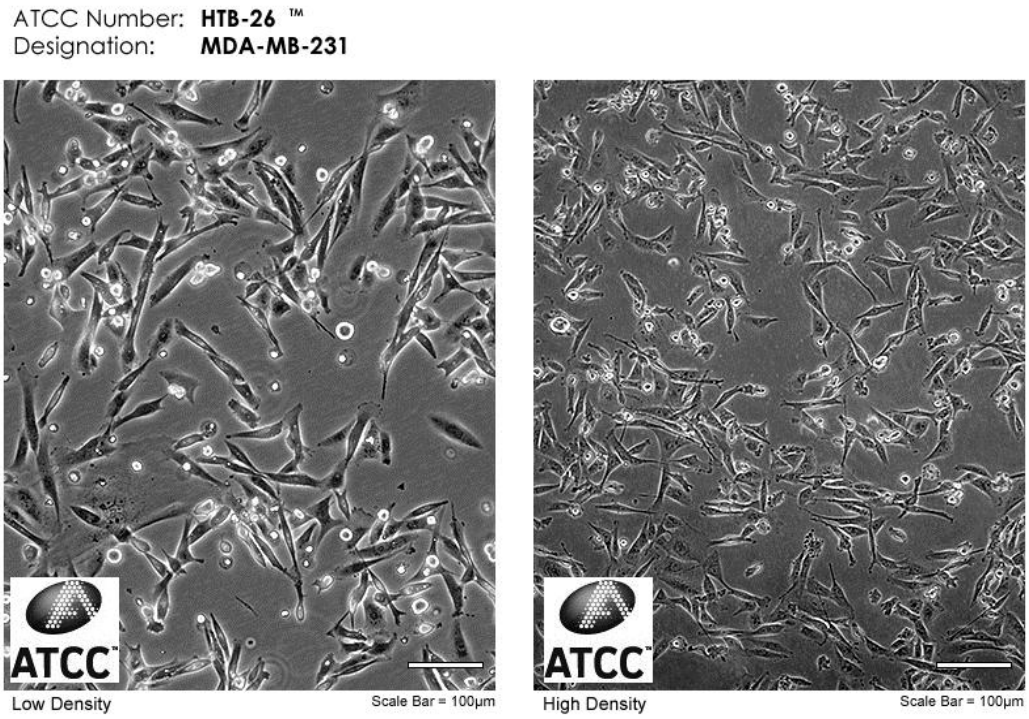
Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	mokraćni mjehur
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	karcinom prijelaznih stanica
Dob i spol	81 godina, žena



Slika 9. Karcinomske stanice T24 stanične linije (preuzeto sa: https://www.lgcstandards-atcc.org/)

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

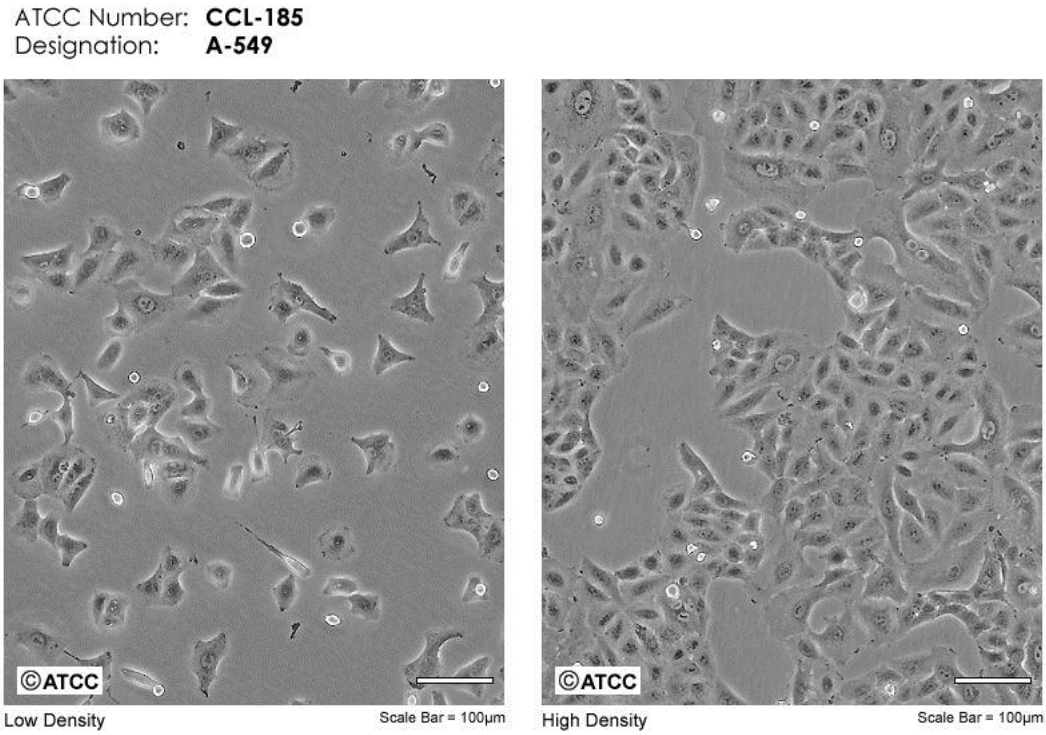
Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	dojka
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	adenokarcinom
Dob i spol	51 godina, žena



Slika 10. Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

Tablica 4. Obilježja A-549 stanične linije (preuzeto sa: http://www.lgcstandards-atcc.org)

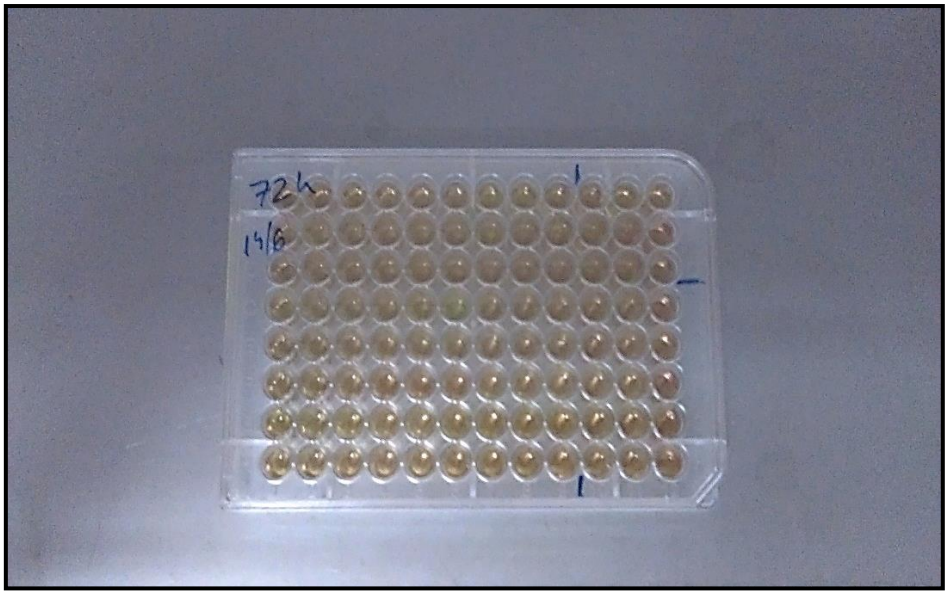
Organizam	***Homo sapiens*, čovjek**
Tkivo	pluća
Forma proizvoda	smrznuto
Morfologija	epitelna
Obilježje kulture	adherentna
Bolest	karcinom
Dob i spol	58 godina, muškarac



Slika 11. Karcinomske stanice A-549 stanične linije (preuzeto sa http://www.lgcstandards-atcc.org)

3.1. Postupak

Nakon odmrzavanja, stanične linije su uzgojene u vlažnom inkubatoru na 37°C uz 5% CO_2, u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju koji sadrži visoki postotak glukoze i L-glutamin. Jednak broj stanica nanesen je u jažice pločica s 96 jažica u četiri replikata (Slika 11). U jažice je dodan DMEM medij i sve ostavljeno preko noći za prihvat 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, 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.

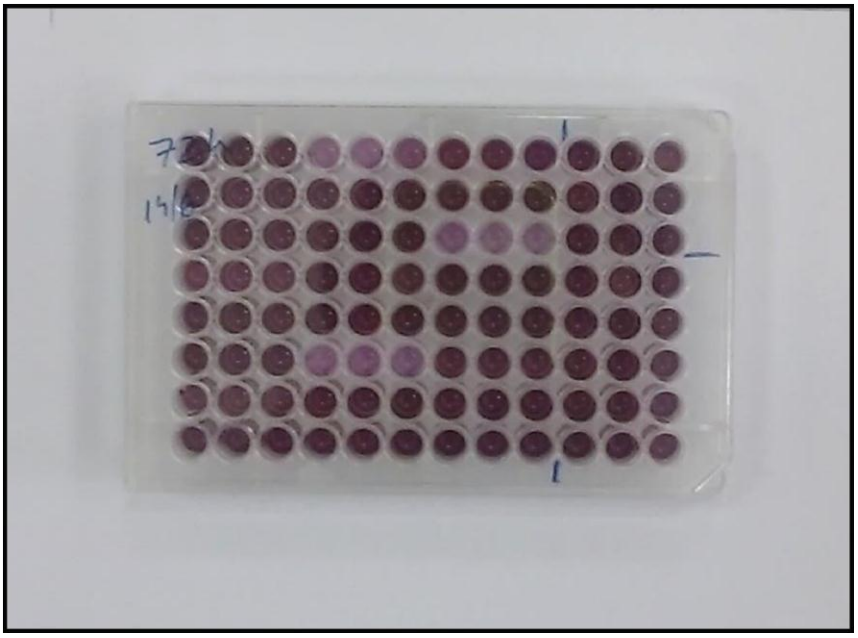


Slika 12: Karcinomske stanice presađene u 96 jažica i izložene različitim koncentracijama ekstrakata biljaka (prije dodavanja MTT-a)

3.2. 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 (13). Rezultirajući intracelularni ljubičasti spoj formazan, biljeg živih stanica, može se izmjeriti spektrofotometrijski za svaku jažicu posebno, uključujući i jažice s kontrolnom skupinom u kojima očekujemo najviši stupanj obojenja, kao i najveću apsorbanciju. Da bi se mogla očitati apsorbancija novonastalog ljubičastog spoja, potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid) (13). Nakon jednog sata MTT je ispran i dodan je DMSO (Slika 12). Pločice su inkubirane 10 min na 37 °C uz treskanje. Apsorbancija je mjerena na 570 nm . Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenim ekstraktima biljaka te

apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj nam je citotoksične aktivnosti korištenih biljaka.



Slika 13: Ljubičasto obojenje (biljeg živih stanica) nakon dodavanja DMSO-a (koji otapa neotopljeni ljubičasti spoj formazan) u otopinu MTT-a

3.3. Vodeni infuzi biljaka

Biljke korištene u ovom ispitivanju (rosopas, vrkuta i troskot) kupljene su u biljnoj ljekarni. Za dobivanje vodenog infuza, kod sve tri biljke korišteni su nadzemni dijelovi: stabljika, list i cvijet. Vodeni infuzi su se dobili prelijevanjem 15 g suhog biljnog materijala s 200 mL kipuće destilirane vode nakon čega su pokriveni satnim stakalcem, ostavljeni da stoje 30 minuta na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Uzorak se zatim filtrirao kroz običan filter papir, te se potom uparío do suha na rotacijskom vakuum uparivaču nakon čega je suhi ostatak otopljen je do koncentracije od 60 g/L dodatkom destilirane vode .

3.4. Statistička analiza

Nakon izmjerenih apsorbancija ispitivanih (čine ih vodeni ekstrakti rosopasa, vrkute i troskota s karcinomskim stanicama staničnih linija) i kontrolnih skupina (čine ih karcinomske

stanice u mediju), izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija ispitivanih i kontrolnih skupina nakon 4, 24, 46 i 72 sata. Zatim su izračunate vrijednosti omjera između srednjih vrijednosti ispitivanih i kontrolnih skupina za svaku koncentraciju biljnog ektrakta nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Rezultati su izračunati u programu Microsoft Excel i prikazani su grafički.

4. REZULTATI

Rezultati pokazuju preživljenje karcinomskih stanica RT4, T24, MDA-MB-231 i A-549 stanične linije u usporedbi s kontrolama (kontrole imaju 100% preživljenje stanica) u odnosu na:

1. različite koncentracije biljnih ekstrakata rosopasa, vrkute i troskota (0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L i 1 g/L)

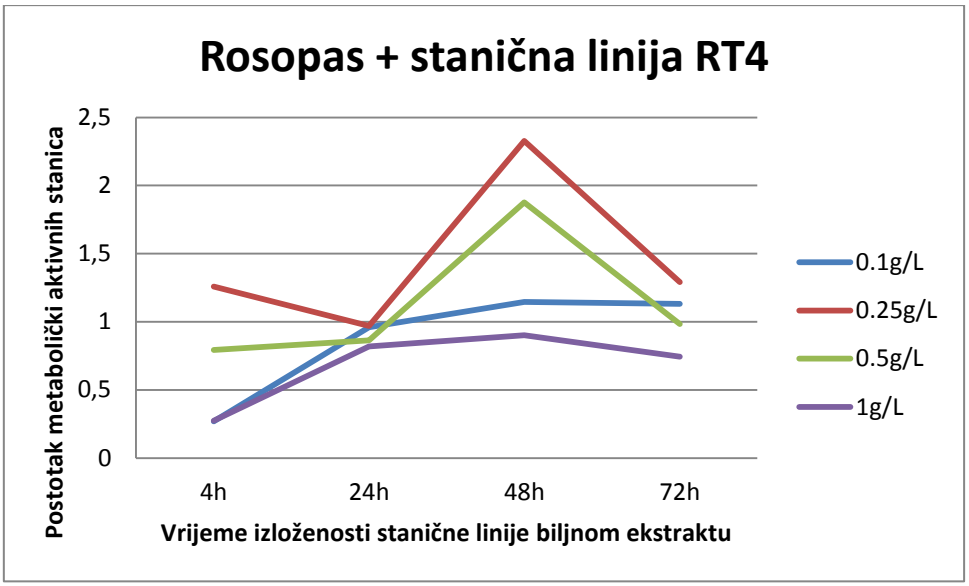
2. vrijeme izloženosti staničnih linija vodenim ekstraktima rosopasa, vrkute i troskota (4, 24, 48 i 72 sata).

Rezultati su prikazani zasebno za svaku staničnu liniju i mogu se vidjeti na Slikama od 14 do 37.

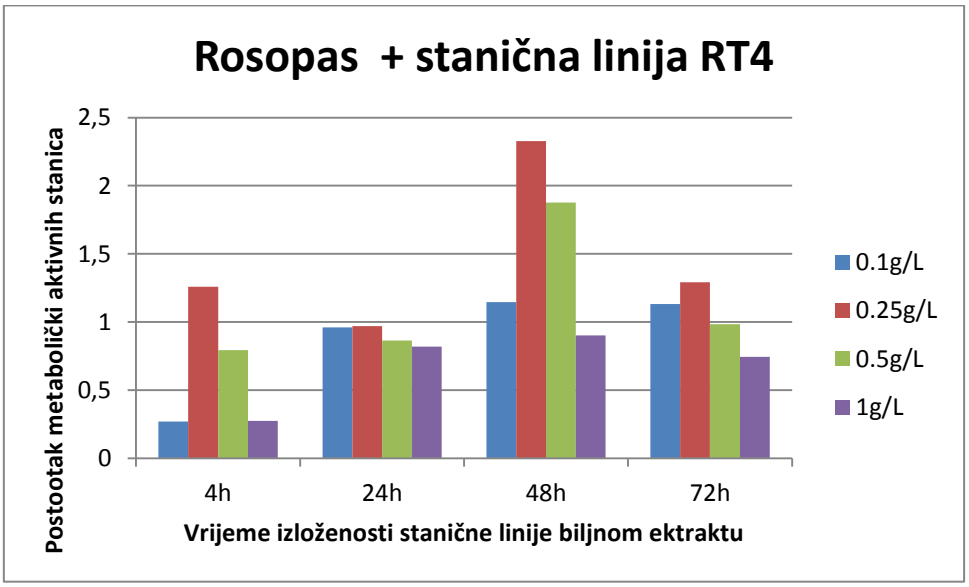
4.1. Stanična linija RT4

4.1.1. Djelovanje ekstrakta rosopasa na staničnu liniju RT4

Citotoksičnost ekstrakta rosopasa u odnosu na kontrolu se najbolje vidi u prva 4 sata za najmanju i najveću koncentraciju (0,1 g/L i 1 g/L) kada je preživljenje manje od 50%, dok nakon 24, 48 i 72 sata iste te koncentracije ne pokazuju značajan pad preživljenja (Slika 14 i 15). Koncentracija ekstrakta rosopasa od 0,25 g/L ne pokazuje gotovo nikakav učinak na karcinomske stanice ni u kojem vremenskom roku izloženosti, dok koncentracija od 0,5 g/L pokazuje blagi pad preživljenja stanica nakon 4 i 24 sata (Slika 14 i 15).



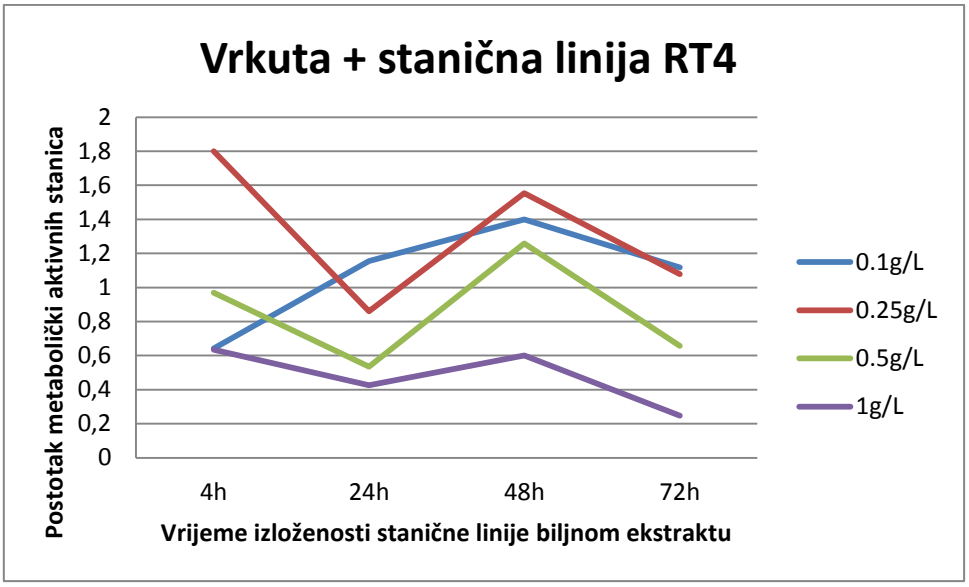
Slika 14. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta rosopasa



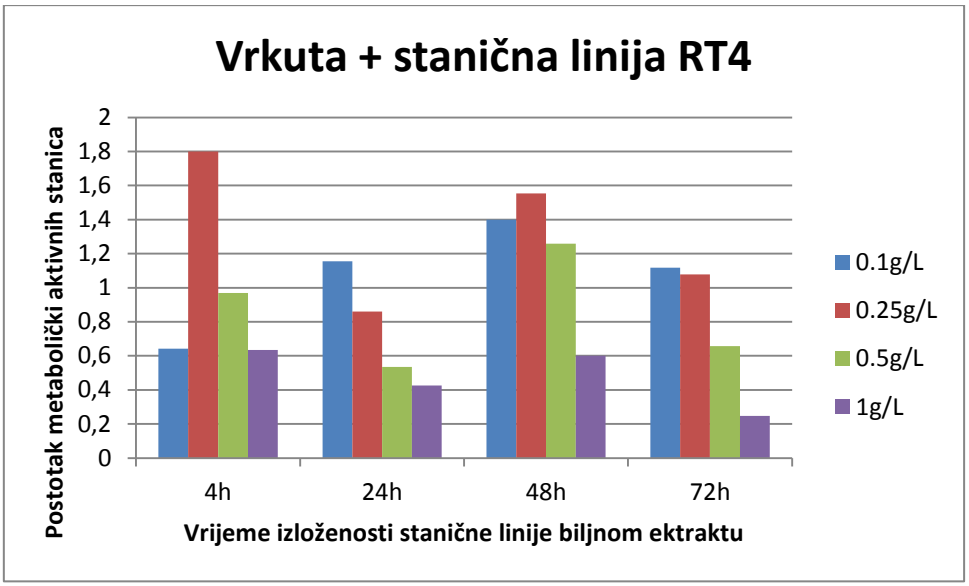
Slika 15. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta rosopasa

4.1.2. Djelovanje ekstrakta vrkute na staničnu liniju RT4

Koncentracije ekstrakta vrkute od 0,1 g/L i 0,25 g/L imaju najmanji značaj na preživljenje karcinomskih stanica u odnosu na kontrolu jer gotovo ne smanjuju broj živih stanica nakon četiri vremenska intervala, osim koncentracije od 0,1 g/L nakon 4 sata (Slika 16 i 17). Koncentracija ekstrakta vrkute od 0,5 g/L uzrokuje smanjenje preživljenja stanica nakon 4, 24 i 72 sata od čega je najznačajniji pad broja stanica nakon 24 sata kada je preživljenje oko 50% (Slika 16 i 17). Najznačajniji rezultat pokazuje koncentracija ekstrakta vrkute od 1 g/L jer vidno smanjuje preživljenje stanica nakon svih vremenskih intervala, a najbolji rezultat se vidi nakon 72 sata kada je postotak metabolički aktivnih stanica oko 25%. (Slika 16 i 17).



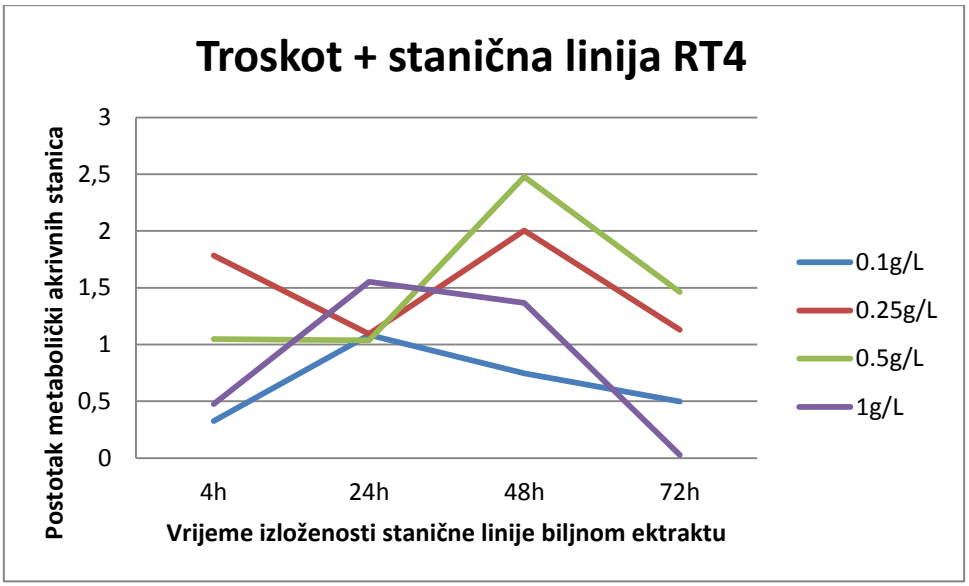
Slika 16. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta vrkute



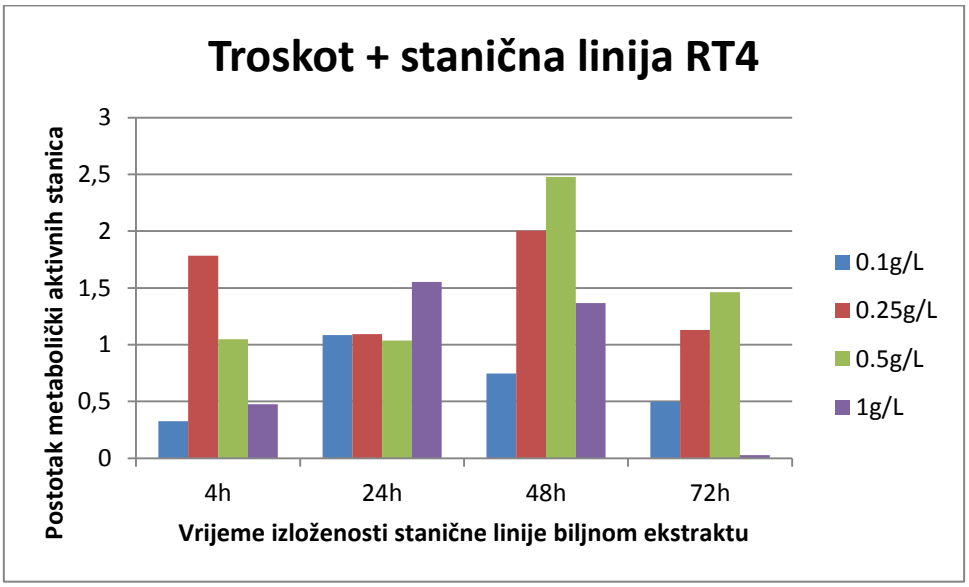
Slika 17. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta vrkute

4.1.3. Djelovanje ekstrakta troskota na staničnu liniju RT4

Koncentracije ektsrakta troskota od 0,25 g/L i 0,5 g/L ne pokazuju nikakavutjecaj na karcinomske stanice stanične linije RT4 ni nakon jednog vremenskog intervala u odnosu na kontrolu (Slika 18 i 19), dok koncentracija ekstrakta od 0,1 g/L pokazuje citotoksičnost nakon 4, 48 i 72 sata, a najznačajnija je ona nakon 4 sata kada je preživljenje stanica oko 33%. Najmanje preživljenje stanica je nakon izlaganja ekstrakta troskota koncentracije 1 g/L kroz 72 sata kada broj živih stanica iznosi oko 2,5% (Slika 18 i 19).



Slika 18. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta troskota

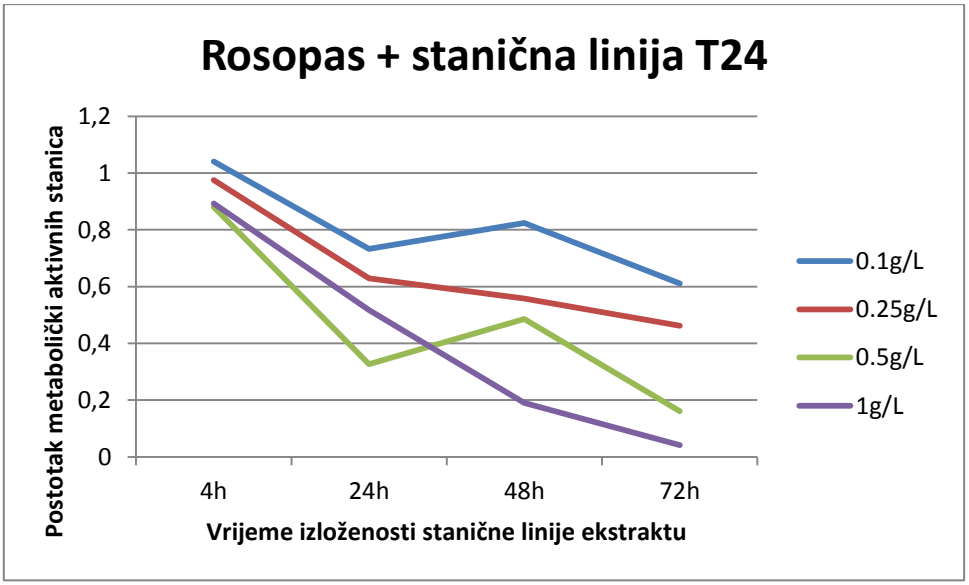


Slika 19. Preživljenje karcinomskih stanica RT4 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta troskota

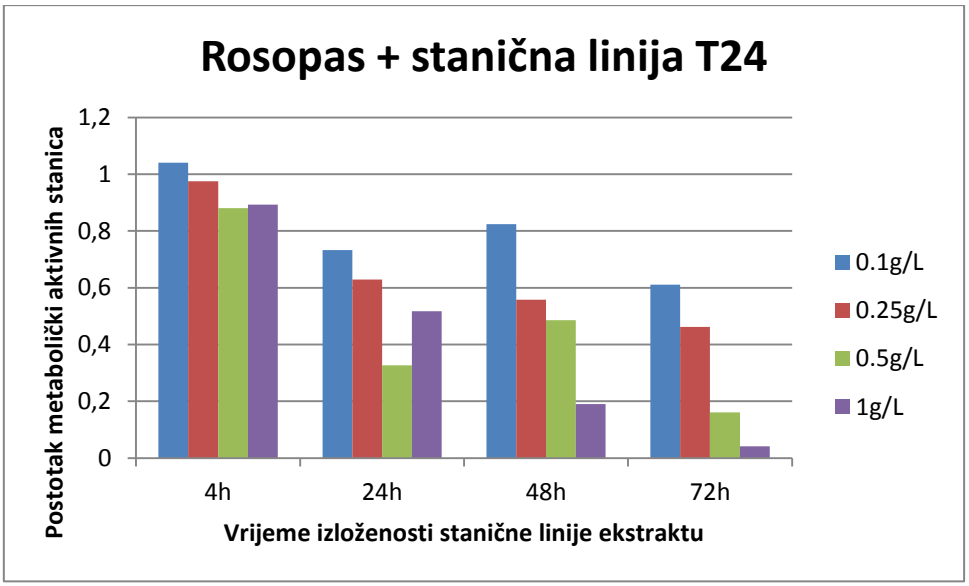
4.2. Stanična linija T24

4.2.1. Djelovanje ekstrakta rosopasa na staničnu liniju T24

Karcinomske stanice T24 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje nakon svih vremenskih intervala inkubacije sa svim koncentracijama ekstrakta rosopasa, osim najmanje koncentracije (0,1 g/L) nakon 4 sata gdje nema smanjenja preživljenja u odnosu na kontrolu (Slika 20 i 21). Najmanja koncentracija ekstrakta ujedno je i najmanje učinkovita, dok najveća koncentracija (1 g/L) pokazuje najveću citotoksičnost jer nakon 48 sati postotak aktivnih stanica iznosi oko 19%, a nakon 72 sata preživljenje se spušta na oko 4% (Slika 20 i 21). Koncentracija ekstrakta rosopasa od 0,25 g/L pokazuje najveću citotoksičnost nakon 24 sata kada je postotak aktivnih stanica oko 33%, a koncentracija ekstrakta od 0,5 g/L najveću citotoksičnost ima nakon 72 sata kada je preživljenje smanjeno na oko 16% (Slika 20 i 21).



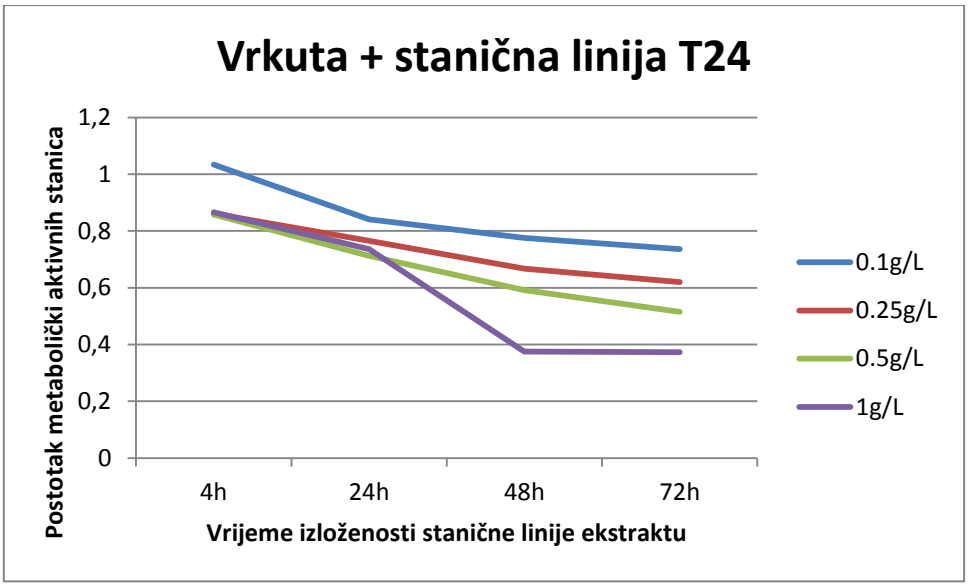
Slika 20. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta rosopasa



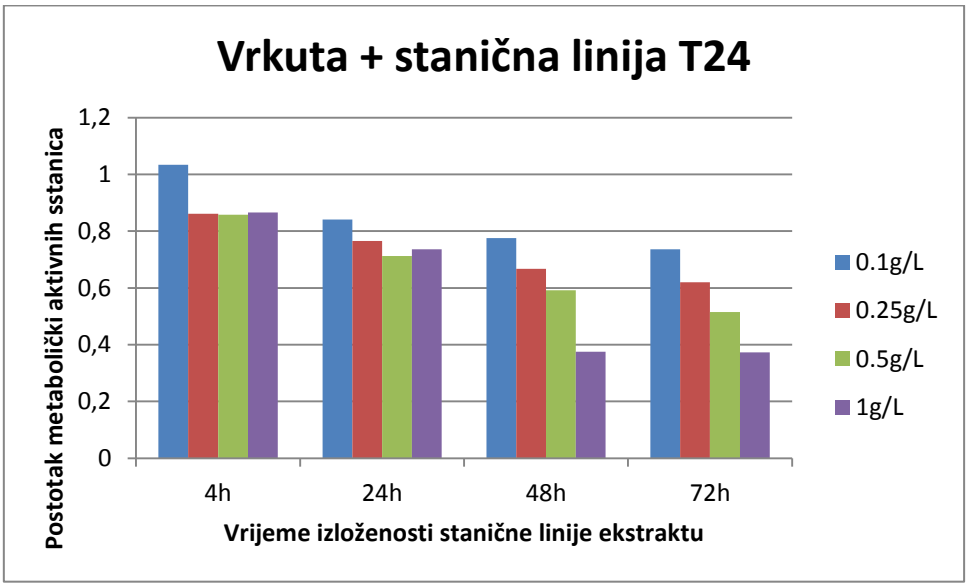
Slika 21. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta rosopasa

4.2.2. Djelovanje ekstrakta vrkute na staničnu liniju T24

Karcinomske stanice T24 stanične linije pokazuju smanjenje preživljenja nakon svih vremenskih intervala inkubacije sa svim koncentracijama ekstrakta vrkute, osim najmanje koncentracije (0,1 g/L) nakon 4 sata koja nema utjecaja na preživljenje u odnosu na kontrolu (Slika 22 i 23). Najznačajni rezultati vidljivi su nakon 48 i 72 sata i to kod koncentracija od 0,5 g/L (preživljenje između 50 i 60%) i 1 g/L (preživljenje oko 37%) (Slika 22 i 23).



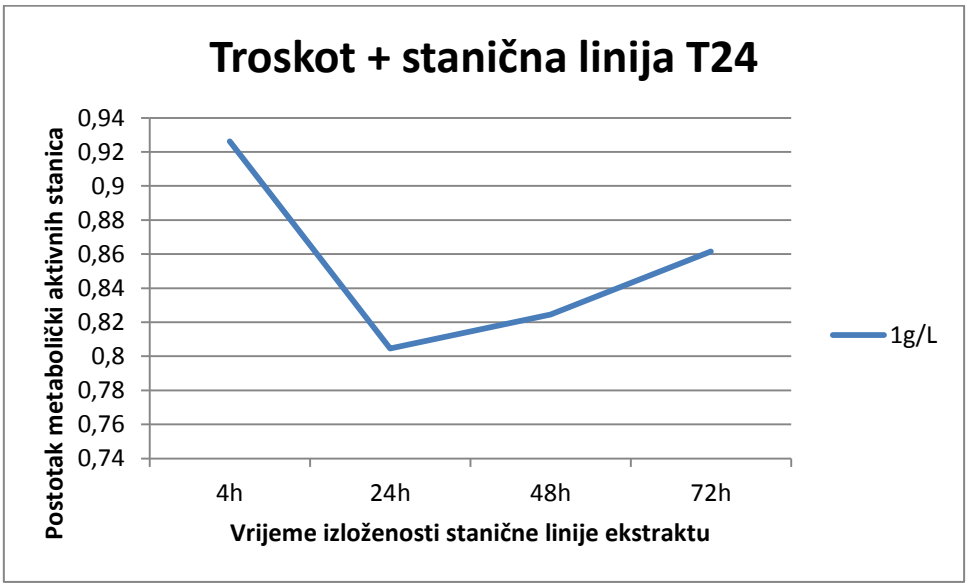
Slika 22. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta vrkute



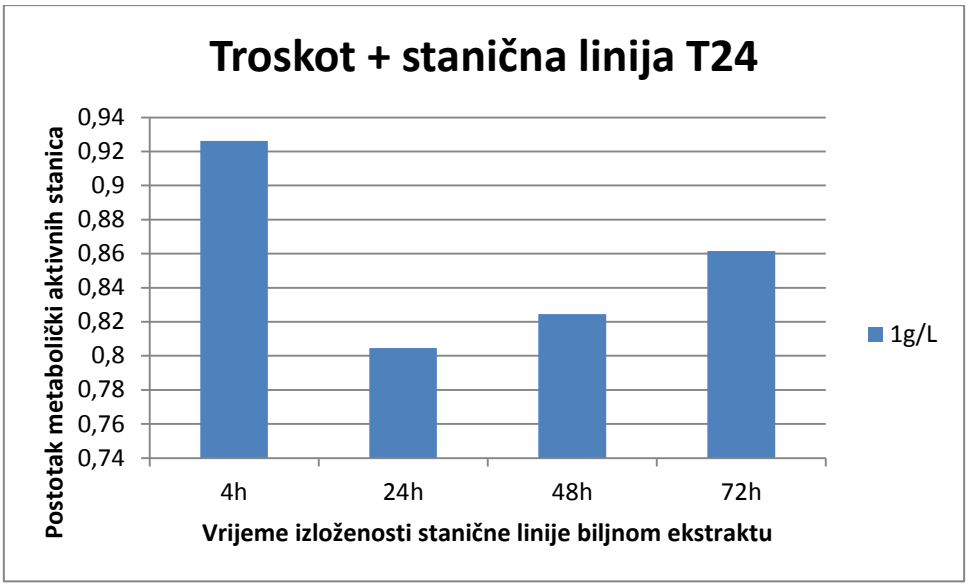
Slika 23. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta vrkute

4.2.3. Djelovanje ekstrakta troskota na staničnu liniju T24

Karcinomske stanice T24 stanične linije pokazuju smanjenje preživljenja nakon što su izložene ekstraktu troskota od 1 g/L nakon svih vremenskih intervala (4, 24, 48 i 72 sata) u odnosu na kontrolu (Slika 24 i 25). Najznačajniji pad živih stanica vidi se nakon 24 sata kada je broj stanica oko 80% (Slika 24 i 25).



Slika 24. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta troskota

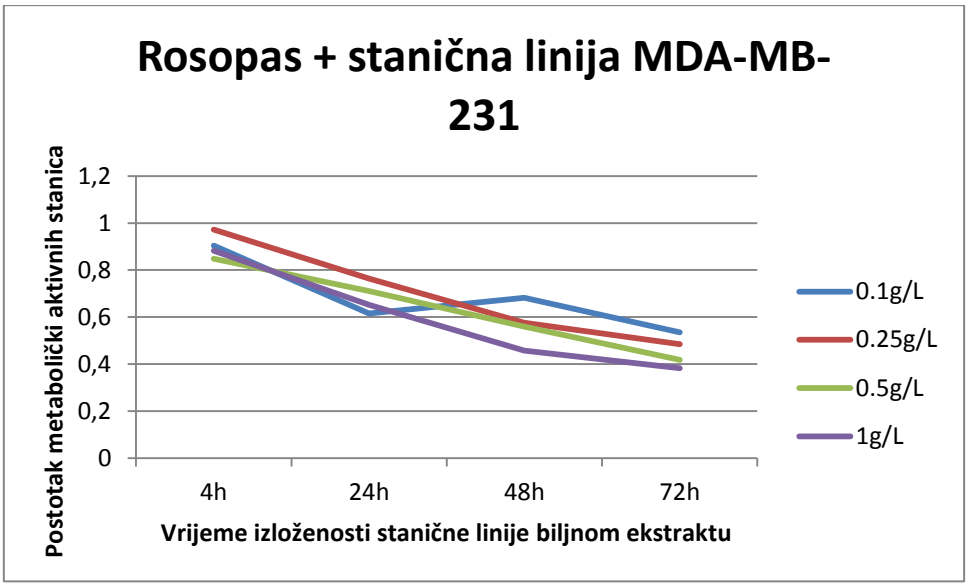


Slika 25. Preživljenje karcinomskih stanica T24 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta troskota

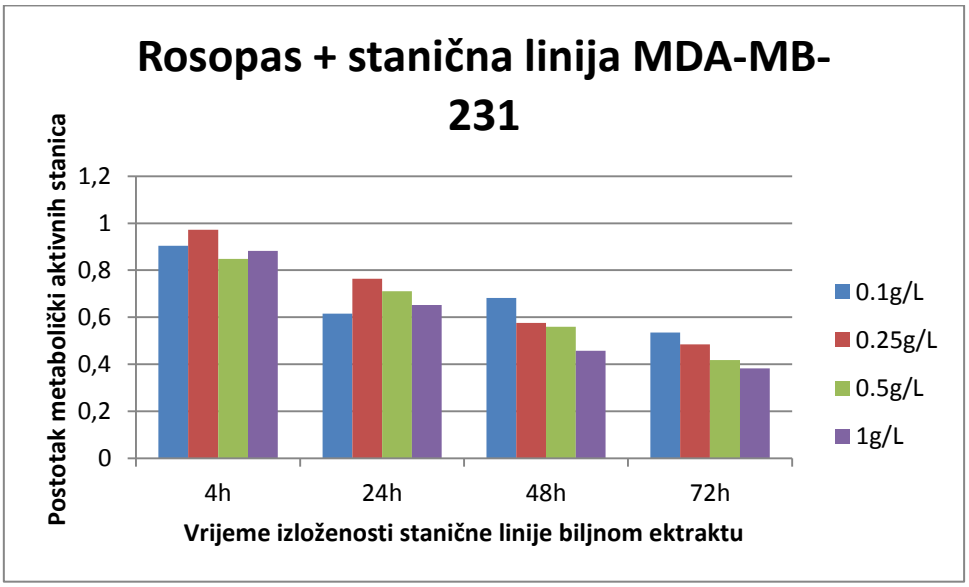
4.3. Stanična linija MDA-MB-231

4.3.1. Djelovanje ekstrakta rosopasa na staničnu liniju MDA-MB-231

Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije pokazuju smanjenje preživljenja nakon svih vremenskih intervala inkubacije sa svim koncentracijama ekstrakta rosopasa u odnosu na kontrolu (Slika 26 i 27). Pad broja metabolički aktivnih stanica je proporcionalan vremenskim intervalima i koncentracijama (pad broja stanica je veći nakon duže vremenske izloženosti stanične linije biljnom ekstraktu i pri višim koncentracijama), te najveću citotoksičnost postiže koncentracija ekstrakta od 1 g/L nakon 72 sata kada preživljenje iznosi oko 38% (Slika 26 i 27).



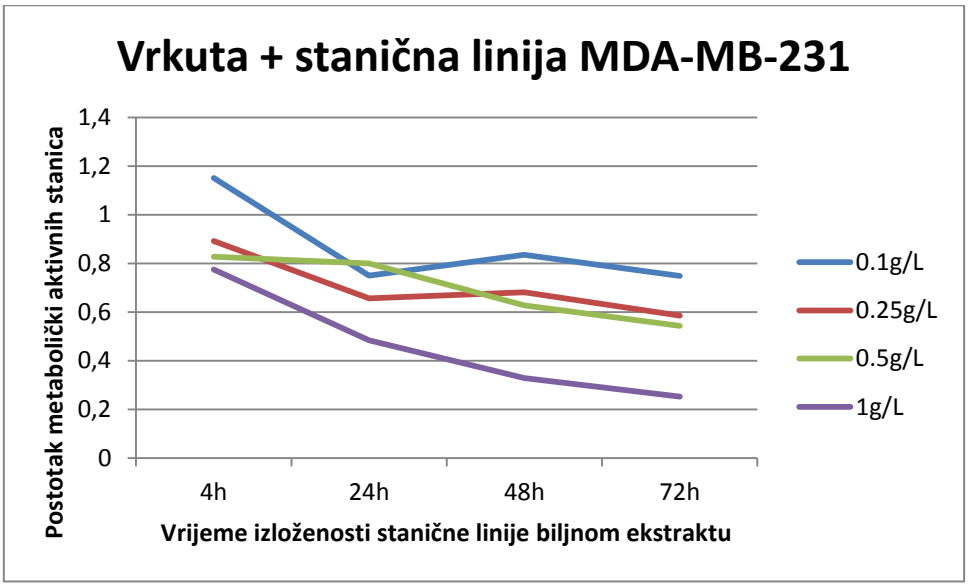
Slika 26. Preživljenje karcinomskih stanica MDA-MB-231 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta rosopasa



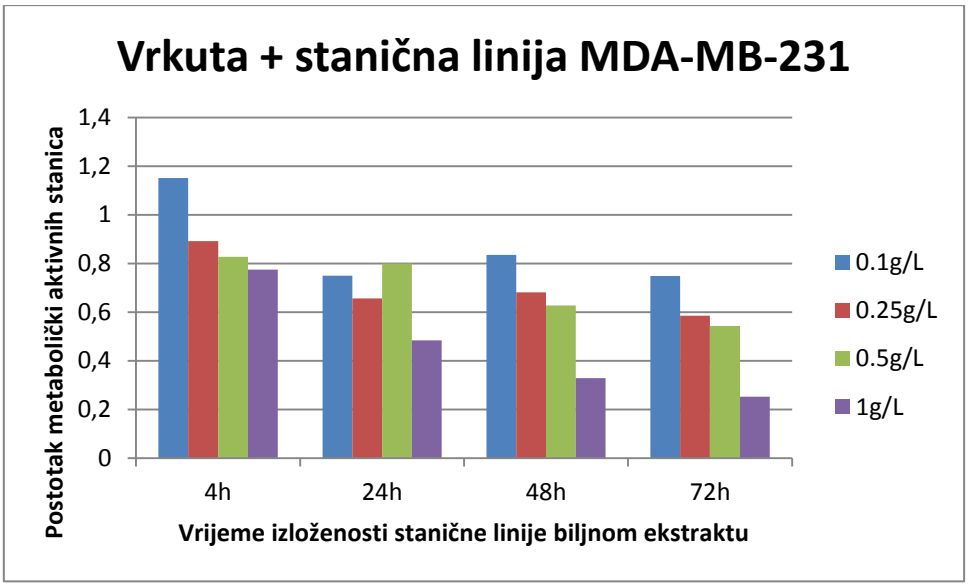
Sika 27. Preživljenje karcinomskih stanica MDA-MB-231 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta rosopasa

4.3.2. Djelovanje ekstrakta vrkute na staničnu liniju MDA-MB-231

Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje nakon svih vremenskih intervala inkubacije sa svim koncentracijama ekstrakta vrkute, osim najmanje koncentracije (0,1 g/L) nakon 4 sata koja ne utječe na smanjenje u odnosu na kontrolu (Slika 28 i 29). Najznačajniji pad broja stanica vidi se kod najveće koncentracije od 1 g/L nakon svih vremenskih intervala, najviše nakon 72 sata kada je najmanje preživljenje i iznosi oko 25% (Slika 28 i 29).



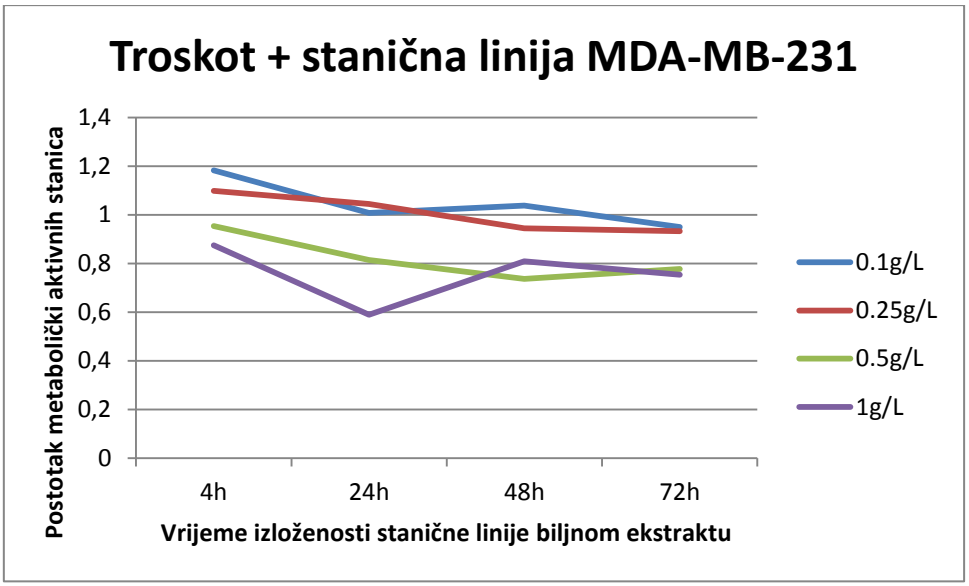
Slika 28. Preživljenje karcinomskih stanica MDA-MB-231 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta vrkute



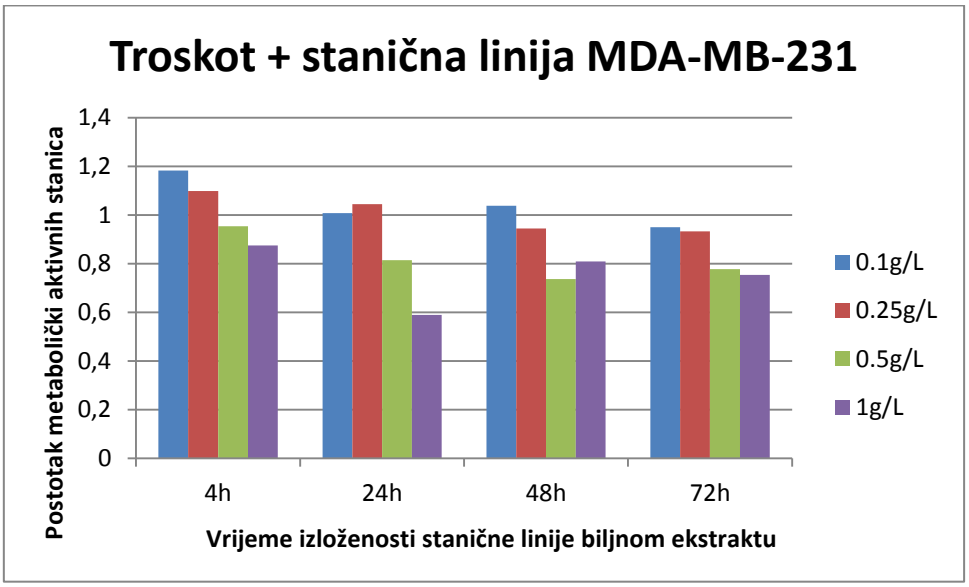
Slika 29. Preživljenje karcinomskih stanica MDA-MB-231 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta vrkute

4.3.3. Djelovanje ekstrakta troskota na staničnu liniju MDA-MB-231

Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije ne pokazuju gotovo nikakvo smanjenje preživljenja pri inkubaciji s ekstraktom troskota koncentracija od 0,1 g/L i 0,25 g/L nakon nijednog od četiri vremenska intervala (Slika 30 i 31), dok koncentracije od 0,5 g/L i 1 g/L smanjuju broj živih stanica nakon sva četiri vremenska intervala, od kojih je za koncentraciju od 0,5 g/L najznačajnije ono nakon 48 sata (oko 74% živih stanica), a za koncentraciju od 1 g/L najznačajnije ono nakon 24 sata (oko 59% živih stanica) (Slika 30 i 31).



Slika 30. Preživljenje karcinomskih stanica MDA-MB-231 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta troskota

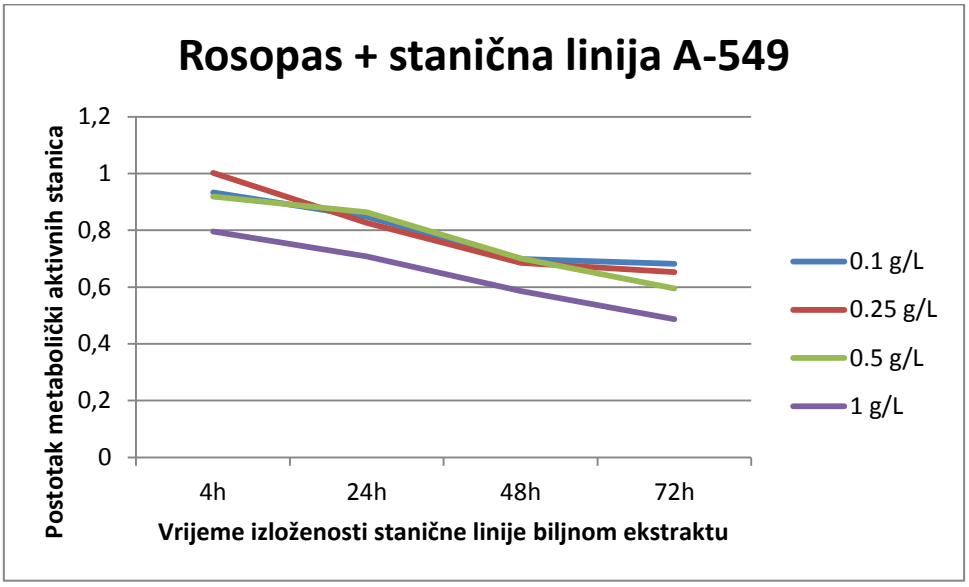


Slika 31. Preživljenje karcinomskih stanica MDA-MB-231 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta troskota

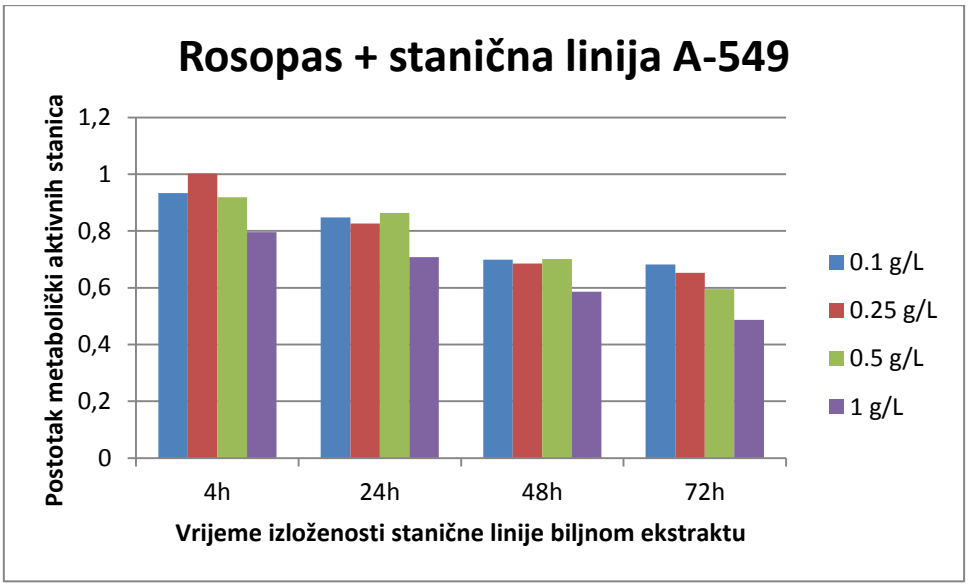
4.4. Stanična linija A-549

4.4.1. Djelovanje ekstrakta rosopasa na staničnu liniju A-549

Karcinomske stanice A-549 stanične linije pokazuju smanjenje preživljenja nakon svih vremenskih intervala inkubacije sa svim koncentracijama ekstrakta rosopasa u odnosu na kontrolu (Slika 32 i 33). Citotoksičnost ekstrakta je proporcionalna vremenskim intervalima, isto tako i koncentracijama (citotoksičnost se povećava nakon duže vremenske izloženosti pri većim koncentracijama), a najveći pad broja stanica opaža se nakon 72 sata pri najvećoj koncentraciji ekstrakta (1 g/L) kada je postotak živućih stanica oko 49% (Slika 32 i 33).



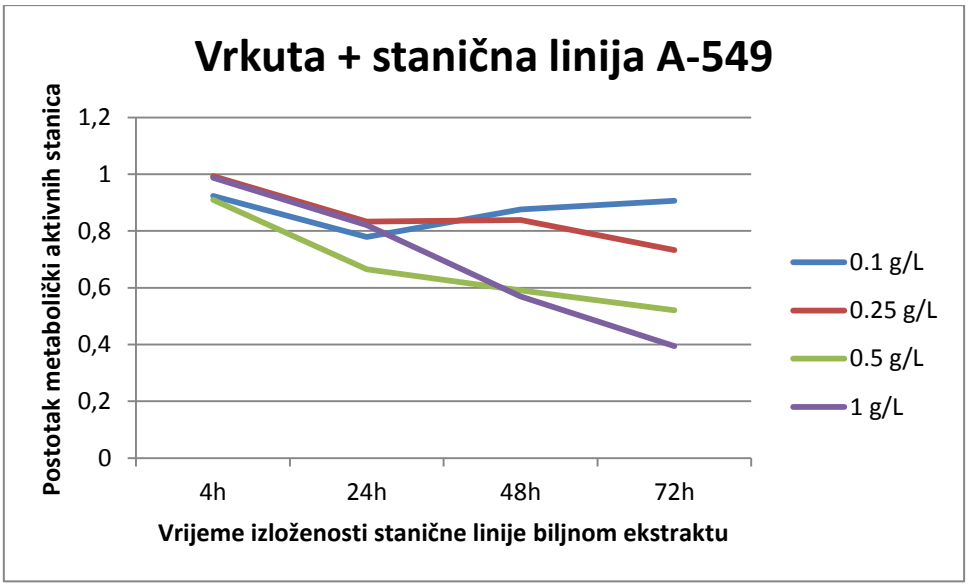
Slika 32. Preživljenje karcinomskih stanica A-549 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta rosopasa



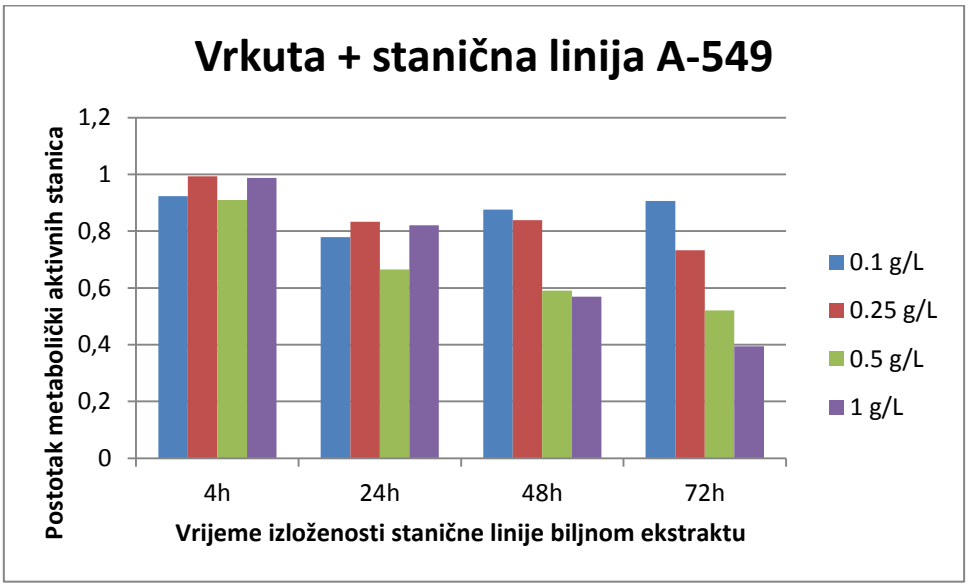
Slika 33. Preživljenje karcinomskih stanica A-549 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta rosopasa

4.4.2. Djelovanje ekstrakta vrkute na staničnu liniju A-549

Karcinomske stanice A-549 stanične linije pokazuju smanjenje preživljenja pri svim vremenskim intervalima inkubacije s ekstraktom vrkute u odnosu na kontrolu (Slika 34 i 35). Najmanje smanjenje broja stanica vidi se nakon 4 sata pri svim koncentracijama (Slika 34 i 35). Nakon 24 sata najveću citotoskičnost pokazuje koncentracija od 0,5 g/L (oko 66% živih stanica), dok nakon 48 i 72 sata najveću citotoksičnost ima koncentracija od 1 g/L od kojih je najznačajnija ona nakon 72 sata (oko 39% živih stanica) (Slika 34 i 35).



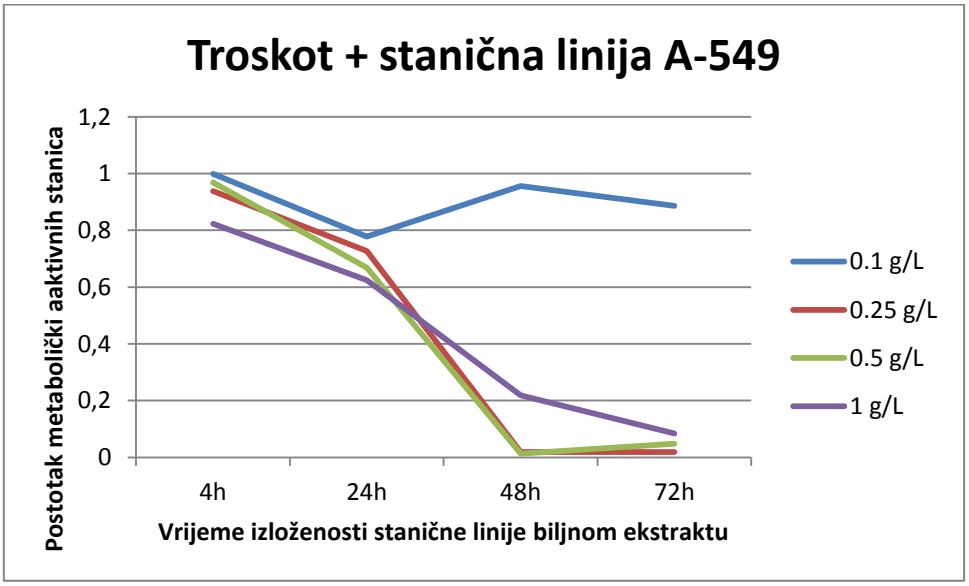
Slika 34. Preživljenje karcinomskih stanica A-549 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta vrkute



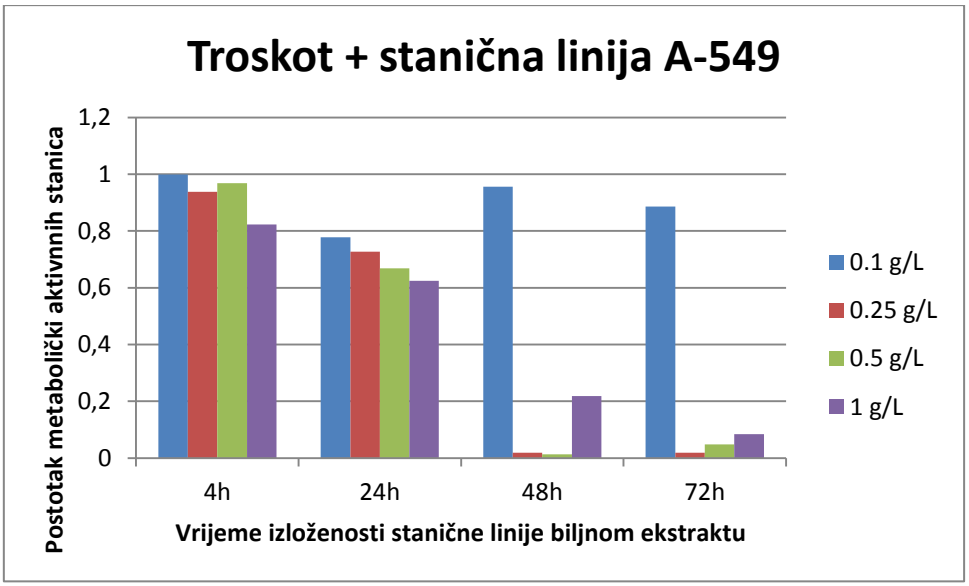
Slika 35. Preživljenje karcinomskih stanica A-549 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta vrkute

4.4.3. Djelovanje ekstrakta troskota na staničnu liniju A-549

Karcinomske stanice A-549 stanične linije pokazuju smanjenje preživljenja nakon inkubacije sa svim koncentracijama ekstrakta troskota i svim vremenskim intervalima u odnosu na kontrolu (Slika 36 i 37). Najmanji pad preživljenja se vidi nakon prva 4 sata za sve koncentracije, dok najbolje rezultate pokazuju koncentracije od 0,25 g/L i 0,5 g/L nakon 48 i 72 sata (Slika 36 i 37). Postotak živih stanica nakon 48 sati za koncentraciju 0,25 g/L iznosi oko 1,8%, a za koncentraciju od 0,5 g/L iznosi oko 1,3%, dok nakon 72 sata pri koncentraciji od 0,25 g/L postotak živih stanica je oko 1,8%, a pri koncentraciji od 0,5 je oko 4,8% (Slika 36 i 37).



Slika 36. Preživljenje karcinomskih stanica A-549 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta troskota



Slika 37. Preživljenje karcinomskih stanica A-549 stanične linije nakon izlaganja ekstrakta troskota

5. RASPRAVA

Više od 12 milijuna novih slučajeva karcinoma mokraćnog mjehura pojavi se godišnje u svijetu od čega se 5,4 milijuna pojavi u razvijenim zemljama i 6,7 milijuna u zemljama u razvoju. Rak mokraćnog mjehura zauzima deveto mjesto u svjetskoj incidenciji oboljenja od raka; to je sedmi najčešći zloćudni tumor u muškaraca i sedamnaesti u žena (14). Rak mokraćnog mjehura ima značajan utjecaj na zdravlje ljudi, a tako će i ostati zbog visoke prevalencije pušenja. Pušenje je najčešći čimbenik rizika za oko polovicu svih karcinoma mokraćnog mjehura. Profesionalna izloženost aromatskim aminima i policikličkim aromatskim ugljikovodicima su drugi važni čimbenici rizika. Utjecaj prehrane i onečišćenja okoliša je manje izražen. Sve više dokaza upućuje na značajan utjecaj genetske predispozicije na učestalost oboljenja. Važnost primarne prevencije uključuje programe koji se bave prestankom pušenja i smanjenja stresa koje treba ohrabrivati i podržavati (15).

Jedan od deset novodijagnosticiranih rakova širom svijeta svake godine je rak dojke, a to je najčešći rak u žena kako u zemljama u razvoju tako i u razvijenim područjima. To je ujedno i glavni uzrok smrti od raka među ženama diljem svijeta (16). Učestalost raka dojke raste s dobi, udvostručuje se svakih 10 godina, sve do menopauze, kada stopa rasta znatno usporava. U usporedbi s rakom pluća, učestalost raka dojke je veća kod mlađih dobnih skupina (17).

Rak pluća je vodeći uzrok smrti od raka u razvijenim zemljama i također je u alarmantnom porastu u zemljama u razvoju. Ova razorna bolest povezana je s oko 1,5 milijuna slučajeva širom svijeta. Rak pluća je multifaktorijalna bolest; između 80 i 90% slučajeva raka pluća nastaje zbog pušenja, a 10% muškaraca i 20% žena koji razviju bolest nikada nisu pušili. S druge strane, mnogi ljudi koji puše ne razviju rak pluća (18). Ova bolest i dalje će biti glavni zdravstveni problem i kroz prve polovice ovog stoljeća. Preventivne strategije, posebno kontrola duhana, prilagođena populacijama s najvećim rizikom su ključ smanjenja globalnog tereta od raka pluća (19).

Nastankom moderne antitumorske terapije, medicinska zajednica je podijeljena u dva suprotna pravca; jedan od njih tvrdi apsolutnu nužnost korištenja sintetiziranih kemijskih spojeva za uspješno liječenje pacijenata, a drugi zagovara alternativne terapije raka, posebno onih na bazi prirodnih izvora, uključujući ekstrakte iz biljaka.

Do sada su se provodila *in vitro* istraživanja biljaka na karcinome mokraćnog mjehura, dojke i pluća. Neke od njih su: *Scutellariae radix, Allium sativum, Vernonia amygdalina, Pfaffia paniculata, Maytenus serrata, Eleutherococcus senticosus* i *Panax ginseng*.

Antitumorski učinak biljke S*cutellariae radix* (korijen grozničice) i njenih spojeva baikaleina, baikalina i vogonina ispitivan je na staničnoj liniji KU-1 i EJ-1 humanog karcinoma mokraćnog mjehura. Svi spojevi su inhibirali staničnu proliferaciju ovisno o dozi, a baikalin je pokazao najveću antiproliferativnu aktivnost (20). Ulogu u liječenju karcinoma mokraćnog mjehura ima i *Allium sativum* (češnjak) koji je ispitivan na životinjskom modelu i pokazao se učinkovit u inhibiciji rasta raka, što najvjerojatnije proizlazi iz stimulacije imunološkog sustava organizma. Studije sugeriraju da češnjak može biti koristan u sprečavanju supresije imunološkog odgovora koji je povezan s povećanim rizikom od malignosti, a da održavanje stimulacije imunog sustava može značajno smanjiti rizik od raka (21).

Vernonia amygdalina (VA) je jestiva afrička planinska biljka iz obitelji Asteraceae koja u sebi ima velike količine alkaloida, saponina i tanina. Za ekstrakt *V. amygdalina* je nađeno da inhibira proliferaciju raka dojke MCF-7 stanica, a za njene frakcije koje su dobivene otapanjem biljke u različitim otapalima, pokazalo se da dobivene frakcije inhibiraju i rast MKL-F stanične linije karcinoma dojke. Tumačenje tih učinaka nije jednostavno, jer ekstrakti lista *V. amygdalina* sadrže dosta potencijalno antikancerogeno aktivne sastojke različitih funkcionalnih i strukturnih svojstava, kao što su antioksidansi (flavonoidi), lipofilni terpenoidi i saponini (22). Nadalje, iz kore ili korijena biljke *Pfaffia paniculata* (suma), također poznata pod nadimkom Brazilski ginseng i "para tudo" ("za sve"), pronađeni su ekstrakti koji imaju citotoksično djelovanje na MCF-7 stanice raka dojke jer je uočeno oštećenje stanica, mitohondrijske membrane i nuklearne strukture, iako detaljni mehanizam djelovanja ekstrakata na stanice raka još treba istražiti (22).

Standardni režimi kemoterapije kao što su gemcitabin, paklitaksel, docetaksel, etopozid i vinorelbin često imaju ograničene koristi zbog teške toksičnosti. Nedavna izvješća predlažu da biljni lijekovi i njihovi spojevi koji izgledaju kao da imaju manju ili nisku toksičnost mogu pružiti atraktivnu strategiju za terapiju raka pluća. Tradicionalno, ljekovito bilje kao što su *Platycodon grandiflorus* (balončić), *Morus alba* (bijela murva), *Prunus armeniaca* (marelica), *Rhus verniciflua* (ruj), *Perilla frutescens* (perila), *Tussilago farfara* (podbjel) korišteno je u liječenju raka pluća (23). Celastraceae (kurikovke) su najviše spomenuta porodica kad se govori o antitumorskoj aktivnosti u modelima raka pluća, iza čega slijedi porodica Araliaceae (bršljani), Euphorbiaceae (mlječikovke) i Fabaceae (mahunarke). *Maytenus serrata* je jedina proučavana vrsta porodice kurikovkih koja pokazuje antitumorsko djelovanje u svojim plodovima, korijenu i stabljci drva. *Eleutherococcus*

senticosus (sibirski ginseng) i *Panax ginseng* (azijski ginseng) crvena tipa su procijenjene vrste iz porodice bršljana. Između četiri studije koje spominju *P. ginseng* crvenog tipa, jedna od studija pokazuje antitumorsku aktivnost ove vrste protiv adenoma pluća izazvan različitim kancerogenim agensima. Istražujući mehanizme djelovanja pokazalo se da se aktivirane stanice ubojice generiraju *in vitro*, što ukazuje na imunomodulatorne učinke (24).

U centru našeg istraživanja bile su tri biljke (rosopas, vrkuta i troskot) čiji smo potencijalni citotoksični učinak ispitivali na staničnim linijama karcinoma mokraćnog mjehura, dojke i pluća.

Biljka *Chelidonium majus* (rosopas) je jedna od biljaka s čvrstim dokazima antitumorske aktivnosti. Jedna od studija je ispitivala djelovanje kelidonina izoliranog iz etanolnog ekstrakta rosopasa na HeLa stanice čiji su rezultati pokazali ihibiciju proliferacije i indukciju apoptoze HeLa stanica preko moguće promjene p38-p53 i AKT/PI3 kinazom signaliziranih puteva (25). Isto tako rosopas je pokazao djelovanje u studiji u kojoj su se ispitivali toksični učinci ekstrakta biljke na humanim karcinomima staničnih linija A549, H460, HCT 116, SW480, MDA-MB 231 i MCF-7 preko MTT i SRB (sulforhodamin B) metode. Ekstrakt rosopasa je pokazao o vremenu i dozi ovisno povećanje citotoksičnosti kod svih šest staničnih linija. Ovakvi rezultati ukazuju na moguću korisnost sirovog ekstrakta rosopasa u liječenju tumora, bilo preko svojeg izravnog citotoksičnog učinka, u prevenciji metastaza ili kao adjuvantna terapija (26).

Naši rezultati su u skladu s ovom studijom jer smo pronašli da vodena infuzija rosopasa u svim koncentracijama smanjuje preživljenje karcinomskih stanica svih staničnih linija, a najbolja se pokazala koncentracija rosopasa od 1 g/L na karcinomske stanice T24 stanične linije jer rezultati nakon 72 sata pokazuju da je postotak živih stanica oko 4%.

Alchemilla vulgaris (vrkuta) je najviše poznata po svom svojstvu cijeljenja rana. Studija koja je istraživala učinak vrkute i glicerina na epitelnim i miofibroblastnim stanicama, te učinak ozdravljenja kožnih lezija u štakora, pokazala je zacjeljujuća svojstva povezana s promitotičkom aktivnošću u epitelnim stanicama i miofibroblastima vrkute (27).

U našem istraživanju vrkuta je pokazala citotoksični učinak na sve stanične linije u svim koncentracijama. Najbolji rezultati vrkute pokazali su se na staničnim linijama RT4 i MDA-MB-231 jer koncentracija ekstrakata obe biljke od 1 g/L nakon 72 sata pokazuje smanjenje živih stanica na oko 25%.

Polygonum aviculare (troskot) pojavljuje se u studijama o antitumorskoj aktivnosti. Jedna od studija je istraživala citotoksičnost ekstrakta troskota (otopljen u metanolu) na staničnu liniju MCF-7 raka dojke koja je tretirana različitim koncentracijama ekstrakta. Rezultati su pokazali da ekstrakt troskota pokazuje citotoksičnost na MCF- 7 stanične linije u koncentracijama višim od 300 ng/µL (28). Neke od studija pokazuju i njegova antioksidativna svojstva jer veže na sebe slobodne radikale i superoksid radikale (29).

Troskot u našem istraživanju također ukazuje na citotoksičnost, iako ne na svim staničnim linijama u određenim koncentracijama. Najlošiji rezultat imaju koncentracije od 0,25 g/L i 0,5 g/L na staničnoj liniji RT4 jer nisu pokazale nikakvu citotoksičnost, dok je najbolji rezultat imala koncentracija od 1 g/L nakon 72 sata i to na staničnoj liniji RT4 kada je broj živih stanica iznosio oko 2,5 %.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Vodeni ekstrakti rosopasa, vrkute i troskota pokazuju citotoksični učinak na stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura (RT4, T24), dojke (MDA-MB-231) i pluća (A-549).

2. Citotoksičnost ekstrakata biljaka na stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura, dojke i pluća ovisi o vremenu u kojem je određena stanična linija izložena ekstraktu i također ovisi o koncentraciji biljnih ekstrakata.

3. Smanjeno preživljenje karcinomskih stanica mokraćnog mjehura (RT4, T24), dojke (MDA-MB-231) i pluća (A-549) nije nužno bilo razmjerno povećanju koncentracije biljnog ekstrakta.

4. Smanjeno preživljenje karcinomskih stanica mokraćnog mjehura (RT4, T24), dojke (MDA-MB-231) i pluća (A-549) nije nužno bilo razmjerno povećanju vremenskog intervala od 4, 24, 48 i 72 sata.

5. Dokazani učinak ekstrakata biljaka se može primijeniti za daljnje istraživanje u *in vivo* ispitivanjima na karcinomima mokraćnog mjehura, dojke i pluća ili se mogu izolirati spojevi iz ekstrakata i pojedinačno svakom ispitati citotoksičnost.

7. LITERATURA

1. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur. Patofiziologija. Sedmo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. 669.

2. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija.Četvrto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. 175.

3. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013. Registar za rak Republike Hrvatske. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Zagreb; 2015. [Online] Dostupno na: http://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2013_final.pdf. Pristupljeno: 08.09.2016.

4. Ivančić Ž. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Hrvatsko izdanje. Split: Placebo; 2010.

5. Bladder cancer risk fators. American Cancer Society. [Online] Dostupno na: http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-risk-factors Pristupljeno: 24.10.2016.

6. Hulina N. Više biljke-stablašice. Zagreb: Golden marketing-tehnička knjiga; 2011.

7. Assessment report on Chelidonium majus L., herba. Committee on Herbal Medicinal Products. Europan Medicines Agency; 2011. [Online] Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2012/01/WC500120711.pdf. Pristupljeno: 02.09.2016

8. Kuštrak D. Farmakognozija Fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing-Tehnička knjiga; 2005.

9. Skidmore-Roth L. Mosby´s Handbook of Herbs & Natural Supplements. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 2004.

10. Takir S, Altun I, Sezgi B, Suzgec-Selcuk S, Mat A, Uydes-Dogan B. Vasorelaxant and blood pressure lowering effects of alchemilla vulgaris: A comparative study of methanol and aqueous extracts. Pharmacognosy Magazine. 2015;11(41):163.

11. Horváth G, Molnár P,Bencsik T. Pharmacognosy. UP MS Department of Pharmacognosy: 2014. digital texbook library [Online] Dostupno na:

http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop412A/2011-0016_08_pharmacognosy_2/adatok.html Preuzeto: 04.09.2016.

12. European Union herbal monograph on Polygonum aviculare L., herba. Committee on Herbal Medicinal Products. Europan Medicines Agency; 2015 [Online] Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Herbal_monograph/2015/10/WC500195776.pdf. Preuzeto: 04.09.2016.

13. Riss T, Hook B, Duellman S. Evaluation of real time cell viability assays multiplexed with other methods. Toxicol Lett. 2015;238(2):S179-S80.

14. Ploeg M, Aben KKH, Kiemeney LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. World Journal of Urology. 2009;27(3):289-93.

15. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P et al. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. European Urology. 2013;63(2):234-41.

16. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Research.2004;6(6):229-39.

17. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ. 2000;321(7261):624-8.

18. Padmavathi P, Srinivasa Rao D , Radhakrishna U. Lung Cancer in Non-small cells: Its Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. International Journal of Research and Scientific Innovation. 2014;1(9):128-130.

19. Cheng TY D, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. Journal of Thoracic Oncology. 2016;11(10):1653-1671.

20. Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, Yasumoto R, Wada S, Yamamoto K, et al. Antitumor effects of Scutellariae radix and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. Urology. 2000;55(6):951–955.

21. Lamm DL, Riggs DR. Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. J Nutr. 2001;131(3s):1067S-70S.

22. Levitsky DO, Dembitsky VM. Anti-breast Cancer Agents Derived from Plants. Natural Products and Bioprospecting. 2015;5(1):1-16.

23. Yin S, Wei W, Jian F, Yang N. Therapeutic Applications of Herbal Medicines for Cancer Patients. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013;2013:1-15.

24. Monteiro LDS, Bastos XB, Barbosa-Filho JM, de Athayde-Filho PF, Diniz MDFFM, Sobral MV. Medicinal Plants and Other Living Organisms with Antitumor Potential against Lung Cancer. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014;2014:1-15.

25. Paul A, Bishayee K, Ghosh S, Mukherjee A, Sikdar S, Chakraborty D,et al. Chelidonine isolated from ethanolic extract of Chelidonium majus promotes apoptosis in HeLa cells through p38-p53 and PI3K/AKT signalling pathways. Journal of Chinese Integrative Medicine. 2012;1025-38.

26. Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, Todorovic D, Djurdjevic P, Zaric M et al. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. Journal of Ethnopharmacology. 2016;190:362-71.

27. Shrivastava R, Cucuat N, John GW. Effects ofAlchemilla vulgaris and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats. Phytotherapy Research. 2007;21(4):369-73.

28. Habibi RM,Mohammadi RA, Delazar A, Halabian R, Soleimani RJ,Mehdipour A, et al. Effects of polygonum aviculare herbal extract on proliferation and apoptotic gene expression of MCF-7. DARU. 2011;19(5):326-31.

29. HSU CY. Antioxidant activity of extract from Polygonum aviculare L. Biological Research. 2006;39(2):281-8.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitivanje citotoksičnosti vodenih ekstrakata biljaka *Chelidonium majus* (rosopas), *Alchemilla vulgaris* (vrkuta), *Polygonum aviculare* (troskot) na stanične linije humanih karcinoma mokraćnog mjehura (RT4, T24), dojke (MDA-MB-231), te pluća (A-549).

Materijali i metode: Citotoksičnost stanica se ispitivala MTT metodom kojom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon izlaganja jednom od ekstrakata biljaka, jer mrtve, odnosno metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Ekstrakti biljaka su pripravljeni u četiri različite koncentracije (0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L i 1 g/L), a učinak je gledan nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost ekstrakata određivanaje spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm.

Rezultati: Karcinomske stanice RT4 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje stanica u odnosu na kontrolu nakon izloženosti vodenog ekstrakta:

- rosopasa u koncentraciji od 0,1 g/L i 1 g/L nakon 4 sata
- vrkute u koncentraciji od 0,5 g/L nakon 24 sata i 1 g/L nakon 72 sata
- troskota u koncentraciji od 0,1 g/L nakon 4 sata i 1 g/L nakon 72 sata.

Karcinomske stanice T24 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje stanica u odnosu na kontrolu nakon izloženosti vodenog ekstrakta:

- rosopasa u koncentraciji od 0,5 g/L i 1 g/L nakon 72 saata
- vrkute u koncentraciji od 1 g/L nakon 48 i 72 sata
- troskota u koncentraciji od 1 g/L nakon 24 sata.

Karcinomske stanice MDA-MB-231 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje stanica u odnosu na kontrolu nakon izloženosti vodenog ekstrakta:

- rosopasa u svim koncentracijima nakon 72 sata
- vrkute u koncentraciji od 1 g/L nakon 48 i 72 sata
- troskota u koncentraciji od 1 g/L nakon 24 sata.

Karcinomske stanice A-549 stanične linije pokazuju smanjeno preživljenje stanica u odnosu na kontrolu nakon izloženosti vodenog ekstrakta:

- rosopasa u koncentraciji od 1 g/L nakon 72 sata
- vrkute u koncentraciji od 1 g/L nakon 72 sata

- troskota u koncentraciji od 0,25 g/L i 0.5 g/L nakon 48 sati, te 1 g/L nakon 72 sata.

Zaključak: Vodeni ekstrakti rosopasa, vrkute i troskota pokazuju citotoksični učinak na stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura (RT4, T24), dojke (MDA-MB-231) i pluća (A-549). Citotoksičnost ekstrakata biljaka na stanične linije ovisi o vremenu u kojem je određena stanična linija izložena ekstraktu, te o koncentraciji biljnih ekstrakata.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Cytotoxicity of *Chelidonium majus, Alchemilla vulgaris* and *Polygonum aviculare* on different cell lines of human cancers.

Objectives: To determ a cytotoxicity of aqueous extracts of *Chelidonium majus* (Greater celandine), *Alchemilla vulgaris* (Lady's mantle) and *Polygonum aviculare* (Knotweed) on cell lines of bladder carcinoma (RT4, T24), breast cancer (MDA-MB-231) and lung cancer (A-549).

Material and methods: The cytotoxicity of cells was tested by the MTT method used to determine the percentage of metabolically active cells after exposure to one of the plant extracts, since dead or metabolically inactive cells do not bind MTT. Plant extracts were prepared at four different concentrations (0.1 g/L, 0.25 g/L, 0.5 g/L and 1 g/L), and the effect is seen after 4, 24, 48 and 72 hours. The efficacy of the extracts was observed spectrophotometrically after measurement of absorbance at 570 nm.

Results: Cancer cells of RT4 cell line show reduced cell survival compared to the control after exposure to aqueous extract:

- greater celandine at a concentration of 0.1 g/L and 1 g/L after 4 hours
- lady's mantle at a concentration of 0.5 g/L after 24 hours and 1 g/L after 72 hours
- knotweed at a concentration of 0.1 g/L after 4 hours and 1 g/L after 72 hours.

Cancer cells of T24 cell line show reduced cell survival compared to the control after exposure to aqueous extract:

- greater celandine at a concentration of 0.5 g/L and 1 g/L after 72 hours
- lady's mantle at a concentration of 1 g/L after 48 and 72 hours
- knotweed at a concentration of 1 g/L after 24 hours.

Cancer cells of MDA-MB-231 cell line show reduced cell survival compared to the control after exposure to aqueous extract:

- greater celandine in all concentrations after 72 hours
- lady's mantle at a concentration of 1 g/L after 48 i 72 hours
- knotweed at a concentration of 1 g/L after 24 hours.

Cancerous cells of A-549 cell line show reduced cell survival compared to the control after exposure to aqueous extract:

- greater celandine at a concentration of 1 g/L after 72 hours
- lady's mantle at a concentration of 1 g/L after 72 hours
- knotweed at a concentration of 0.25 g/L, 0.5 g/L after 48 and 1 g/L after 72.

Conclusion: The aqueous extracts of greater celandine, lady's mantle and knotweed show the cytotoxic effect on cell lines of bladder cancer (RT4, T24), breast (MDA-MB-231) and lung cancer (A-549). The cytotoxicity of plant extracts on cell lines depends on time in which a particular cell line is exposed to the extract, and also depends on the concentration of plant extracts.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Anni Mikić

Datum rođenja: 27. prosinac 1992.

Adresa i mjesto stanovanja: Danilska 50, 22000 Šibenik

Broj mobitela: 095/847-7961

E-mail: a.miki92@gmail.com

Obrazovanje:

1998.-2006. Osnovna škola „Vidici“, Šibenik

2006.-2010. Srednja škola „Gimnazija Antuna Vrančića“

2010.-2016. Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

(Visoko učilište: Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu)

Vještine:

Aktivno se služim engleskim i pasivno talijanskim jezikom.