

# Antiproliferativno djelovanje prave i lažne jerihonske ruže na stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom

---

**Marić, Helena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:247946>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-03**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**HELENA MARIĆ**

**ANTIPROLIFERATIVNO DJELOVANJE PRAVE I LAŽNE  
JERIHONSKE RUŽE NA STANIČNE LINIJE HUMANIH  
KARCINOMA MJERENO MTT METODOM**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2021./2022.**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić**

**Split, svibanj 2022.**

**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 odobrena na 74. sjednici Vijeća studija Farmacije  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić  
**Pomoć pri izradi:** Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

**Antiproliferativno djelovanje prave i lažne jerihonske ruže na stanične linije humanih karcinoma  
mjereno MTT metodom**

Helena Marić, broj indeksa 188

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati citotoksični učinak uzoraka dobivenih iz *Anastatica hierochuntica* i *Selaginella lepidophylla* na stanične linije humanih karcinoma vrata maternice (SiHa) i jajnika (SK-OV-3). Objekte stanične linije tretirane su ekstraktima *Anastatica hierochuntica* dobivenim različitim metodama izolacije; autolizom i Clevenger destilacijom i ekstraktom *Selaginella lepidophylla* dobivenog Clevenger destilacijom koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL. Citotoksičnost ekstraktata na staničnim linijama se određivala nakon 4, 24, 48 i 72 h korištenjem MTT metode. Omjer apsorbancije stanica tretiranih uzorcima dobivenih iz *Anastatica hierochuntica* i *Selaginella lepidophylla* apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti korištenih uzoraka. Iako *Selaginella lepidophylla* pripada drugačijoj biljnoj porodici od *Anastatica hierochuntica*, njezin ekstrakt je pokazao značajno citotoksično djelovanje na obje stanične linije. Najveće citotoksično djelovanje ovog ekstrakta uočeno je pri koncentraciji od 100 µg/mL u vremenskom intervalu od 48 h. Različite metode dobivanja ekstrakta iz *Anastatica hierochuntica* odredile su razliku u njihovoj citotoksičnoj aktivnosti pri čemu je ekstrakt dobiven autolizom pokazao bolju citotoksičnu aktivnost. Ekstrakt *Anastatica hierochuntica* dobiven autolizom pokazao je najbolju citotoksičnu aktivnost na obje stanične linije. Najbolja citotoksična aktivnost postignuta je pri koncentraciji od 100 µg/mL u vremenskom intervalu od 72 h. Djelovanje uzoraka nije uvijek razmjerno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, te u pojedinim slučajevima, dolazi do oporavka stanica.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom „Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala“ (IP-2016-06-1316).

**Ključne riječi:** biljke, karcinom, citotoksičnost, MTT metoda

**Rad sadrži:** 62 stranica, 18 slika, 2 tablice, 56 referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. doc. dr. sc. Jasminka Omerović, predsjednik
2. doc. dr. sc. Marina Degoricija, član
3. izv. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić, član-mentor

**Datum obrane:** 13.05.2022.

**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.74  
**Mentor:** Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD  
**Technical assistance:** Sandra Marijan, mag. for. chem. mol. biol.

### **The antiproliferative action of The True Rose of Jericho (*Anastatica hierochuntica*) and The False Rose of Jericho (*Selaginella lepidophylla*) on human cancer cell lines measured by MTT method**

Helena Marić, index number 188

The aim of this study was to examine the cytotoxic effect of samples obtained from *Anastatica hierochuntica* and *Selaginella lepidophylla* on human cervical (SiHa) and ovarian (SK-OV-3) cancer cells. Both cell lines were treated with *Anastatica hierochuntica* extracts obtained by different isolation methods; autolysis and Clevenger distillation and *Selaginella lepidophylla* extract obtained by Clevenger distillation at concentrations of 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL. Cytotoxicity of extracts on cell lines was determined after 4, 24, 48 and 72 h using the MTT method. The ratio of the absorbance of cells treated with samples obtained from *Anastatica hierochuntica* and *Selaginella lepidophylla* and the absorbance of those not treated is an indicator of the cytotoxic activity of the samples used. Although *Selaginella lepidophylla* belongs to a different plant family than *Anastatica hierochuntica*, its extract has shown significant cytotoxic effects on both cell lines. The greatest cytotoxic effect of this extract was observed at a concentration of 100 µg/mL in a time interval of 48 h. Different methods of obtaining the extract from *Anastatica hierochuntica* determined the difference in their cytotoxic activity. The extract obtained by autolysis showed better cytotoxic activity. The extract of *Anastatica hierochuntica* obtained by autolysis showed the best cytotoxic activity on both cell lines. The best cytotoxic activity was achieved at a concentration of 100 µg/mL over a time interval of 72 h.

The effectiveness of samples is not always proportional to the increase of concentration and incubation time, and in some cases, cell recovery occurs.

This research has been fully supported by the Croatian Science Foundation under the project “Plants as a source of bioactive sulphur compounds and their ability to hyperaccumulate metals” (IP-2016-06-1316).

**Keywords:** plants, cancer, cytotoxicity, MTT assay

**Thesis contains:** 62 pages, 18 figures, 2 tables, 56 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Assist. prof. Jasminka Omerović, PhD, chair person
2. Assist. Prof. Marina Degoricija, PhD, member
3. Assoc. prof. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, member - supervisor

**Defence date:** 13.05.2022.

**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.

## **Zahvala**

*Prvenstveno se želim zahvaliti svojim roditeljima koji su me cijelog života pravilno usmjeravali i poticali, ali me nikada nisu opterećivali niti vezali. Hvala na slobodi da biram ono što želim i budem ono što jesam dok me vi s ljubavlju pratite.*

*Također, želim da se zahvalim svojoj sestri koja je oduvijek ujedno i moj oslonac i prijatelj. Sve je lakše i ljepše kad imamo jedna drugu.*

*Veliko hvala i mojim dragim prijateljicama s fakulteta koje su obojile ponekad sive i teške studentske dane. Zadužile ste me za najvedrije i najbistrije uspomene iz studentskog života.*

*Naposljetku, zahvaljujem se svojoj mentorici, profesorici Vedrani Čikeš Čulić koja me nagradila dodatnim znanjem i vještinama te me s nesebičnom pomoći i strpljenjem dopratila do kraja mog studentskog puta.*

## SADRŽAJ:

### 1. UVOD

1.1. TUMORI .....	1
1.1.1. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI .....	2
1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA RAKA .....	3
1.2. RAK VRATA MATERNICE .....	4
1.2.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA .....	4
1.2.2. KLINIČKA SLIKA .....	4
1.2.3. KLASIFIKACIJA I PATOHISTOLOGIJA .....	5
1.2.4. PREVENCIJA I LIJEČENJE .....	6
1.3. RAK JAJNIKA .....	8
1.3.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA .....	8
1.3.2. KLINIČKA SLIKA .....	8
1.3.3. KLASIFIKACIJA I PATOHISTOLOGIJA .....	9
1.3.4. PREVENCIJA I LIJEČENJE .....	10
1.4. PORODICA <i>BRASSICACEAE</i> .....	12
1.4.1. LJEKOVITA SVOJSTVA .....	12
1.5. PRAVA JERIHONSKA RUŽA (lat. <i>Anastatica hierochuntica</i> ) .....	13
1.5.1. KARAKTERISTIKE .....	13
1.6. SEKUNDARNI METABOLITI PORODICE <i>BRASSICACEAE</i> .....	14
1.6.1. GLUKOZINOLATI .....	14
1.6.2. IZOTIOCIJANATI .....	14
1.6.3. FENOLNI SPOJEVI .....	15
1.6.4. FLAVONOIDI .....	16
1.7. PORODICA <i>SELAGINELLACEAE</i> .....	17
1.7.1. LJEKOVITA SVOJSTVA .....	17
1.8. LAŽNA JERIHONSKA RUŽA (lat. <i>Selaginella lepidophylla</i> ) .....	18
1.8.1. KARAKTERISTIKE .....	18
1.9. SEKUDARNI METABOLITI PORODICE <i>SELAGINELLACEAE</i> .....	19
1.9.1. BIFLAVONOIDI .....	19
1.9.2. PRIRODNI PIGMENTI: SELAGINELINI .....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	21
3. MATERIJALI I METODE .....	23
3.1. STANIČNE LINIJE .....	24
3.1.1. SiHa .....	24
3.1.2. SK-OV-3 .....	25
3.2. METODE IZOLACIJE .....	26

3.2.1. EKSTRAKCIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA .....	26
3.2.2. HIDRODESTILACIJA .....	26
3.3. POSTUPAK .....	27
3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA).....	29
3.5. STATISTIČKA ANALIZA .....	30
4. REZULTATI.....	31
4.1. STANIČNA LINIJA SiHa .....	32
4.1.1. EKSTRAKT PRAVE JERIHONSKE RUŽE, NADZEMNI DIO (AUTOLIZA). 32	
4.1.2. EKSTRAKT PRAVE JERIHONSKE RUŽE (CLEVINGER DESTILACIJA)... 33	
4.1.3. EKSTRAKT LAŽNE JERIHONSKE RUŽE (CLEVINGER DESTILACIJA)... 35	
4.2. STANIČNA LINIJA SK-OV-3.....	37
4.2.1. EKSTRAKT PRAVE JERIHONSKE RUŽE, NADZEMNI DIO (AUTOLIZA). 37	
4.2.2. EKSTRAKT PRAVE JERIHONSKE RUŽE (CLEVINGER DESTILACIJA)... 38	
4.2.3. EKSTRAKT LAŽNE JERIHONSKE RUŽE (CLEVINGER DESTILACIJA)... 39	
5. RASPRAVA.....	41
6. ZAKLJUČAK .....	47
7. LITERATURA.....	50
8. SAŽETAK.....	55
9. SUMMARY .....	58
10. ŽIVOTOPIS .....	61

## **1.UVOD**

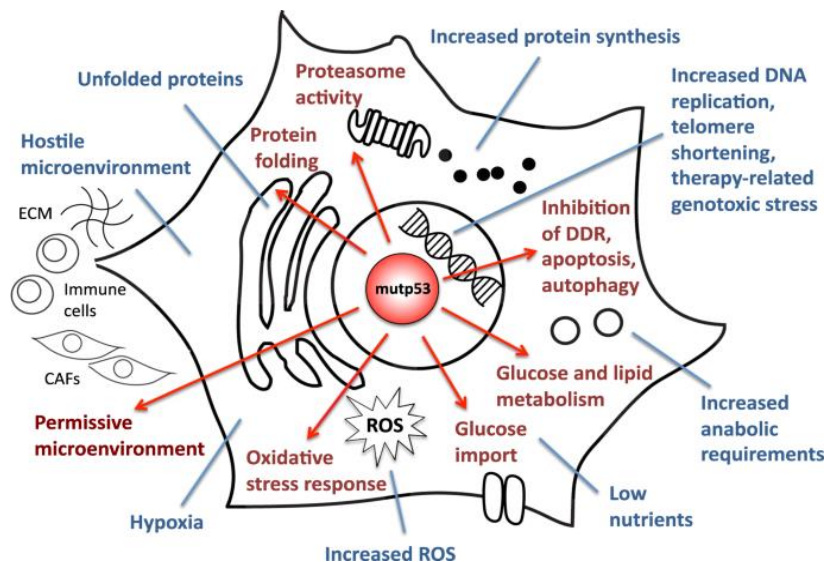


## 1.1. TUMORI

Tumori, neoplazme ili novotvorine su izrazi za patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica (1). Prvi korak nastanka raka je inicijacija tumora u kojoj dolazi do mutacije u jednoj stanici koja započinje proces abnormalne proliferacije, a kao posljedica dolazi do prekomjernog rasta monoklonske populacije tumorskih stanica. Drugi korak je progresija koja uključuje dodatne mutacije u tumorskim stanicama. Zdrave stanice imaju mogućnost proliferacije ovisnu o gustoći, dok je proliferacija stanica raka neovisna o gustoći. Ne dolazi do inhibicije proliferacije nakon postizanja određenog stupnja gustoće stanica pa stanice raka nastavljaju rasti jedna preko druge u više slojeva. U većini slučajeva stanice raka proizvode vlastite faktore rasta (autokrini stimulacija rasta) pa su stanice raka manje ovisne o faktorima rasta iz fizioloških, normalnih izvora. Zbog smanjenog broja adhezijskih molekula na staničnoj površini, stanice raka slabije adheriraju, a također su manje ograničene interakcijom s okolnim tkivom što uvelike olakšava širenje tumora. Stanice raka luče faktore koji stimuliraju stvaranje novih krvnih žila (angiogeneza). Tim procesom se tumor opskrbljuje kisikom i hranjivim tvarima što potiče njegov rast i daljnje širenje. Za tumorske stanice je specifičan izostanak normalne diferencijacije. Umjesto da nastave s normalnim programom sazrijevanja, stanice raka ostaju zaustavljene u ranoj fazi diferencijacije što odgovara stalnoj aktivnoj proliferaciji. Također, u mnogim stanicama raka ne dolazi do programirane stanične smrti (apoptoza) što značajno utječe na nastanak tumora te preživljavanje i rast metastaza (2). Po kliničkoj klasifikaciji tumore svrstavamo u dvije skupine: dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne). Dobroćudni tumori rastu polagano i ograničeno na organ u kojem su nastali. Maligni tumori rastu mnogo brže, razaraju normalno tkivo organa u kojem su nastali te se tjelesnim tekućinama šire u druge dijelove tijela tj. metastaziraju. Maligno oboljenje je opasno zdravstveno stanje koje najčešće rezultira sistemskim simptomima, gubitkom tjelesne mase te smrću (1).

### 1.1.1. ONKOGENI I TUMORSUPRESORSKI GENI

Onkogeni je naziv za gene koji imaju centralnu ulogu u nastanku raka. Potekli su od normalnih staničnih gena, protoonkogeni, koji su zaduženi za prijenos signala u stanici, a kontroliraju staničnu proliferaciju i diferencijaciju (3). Onkogeni koji se najčešće susreću u ljudskim tumorima su tri vrlo srodna člana porodice gena ras (rasH, rasK, rasN) i primjer su točkaste mutacije. Nema ih u zdravim stanicama, a nastaju zbog mutacija koje se događaju tijekom razvoja tumora i za posljedicu potiču nekontroliranu proliferaciju stanica. Mnoge tumorske stanice imaju poremećenu građu kromosoma što uključuje translokacije, duplikacije i delecije. Primjer takvog onkogeni je c-myc koji nastaje zbog pogreške u translokaciji. Proces translokacije često dovodi do poremećaja u kodirajućem redosljedu baza što za posljedicu ima nastanak nenormalnih genskih produkata. Primjer je fuzija protoonkogeni abl s genom bcr što dovodi do stvaranja nenormalnog fuzijskog proteina Bcr/Abl u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji (2). S druge strane, tumorsupresorski geni imaju suprotnu ulogu. Oni zaustavljaju rast tumora. RB-1 je prvi identificirani tumorsupresorski gen, a njegova delecija i mutacija dovode do raznih karcinoma. Gen P53 je najvažniji tumorsupresorski gen i njegova mutacija je prisutna kod velikog broja ljudskih karcinoma (Slika 1). Njegov protein ima ključnu ulogu u regulaciji mitotičkog ciklusa, kao što je kontrola prelaska iz G1 u S fazu i popravak oštećene DNA (4). Tumorsupresorski geni INK4 i PTEN vrlo su često mutirani kod tumora pluća, prostate i melanoma. Drugi tumorsupresorski geni kao APC, Smad2 i Smad4 često su inaktivirani u raku debelog crijeva. Procjenjuje se da je 10% slučajeva raka dojke uzrokovano mutacijom tumorsupresorskih gena BRCA1 i BRCA2 (2).



**Slika 1.** Posljedice mutacija p53

Preuzeto s: <https://www.nature.com/articles/s41418-018-0246-9>

Datum pristupa: 9.3.2022.

### 1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA RAKA

Rak dojke je najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest u Europskoj uniji. Slijede rak debelog i završnog crijeva, rak prostate i rak pluća. Najčešći uzroci smrti su rak pluća, a slijede rak debelog i završnog crijeva, dojke i rak gušterače. U usporedbi s drugim zemljama, Hrvatska je po ukupnoj incidenciji raka na razini prosjeka EU (15. ukupno; 14. u muškaraca i 19. u žena), dok smo po smrtnosti od raka na 5. mjestu ukupno (iza Slovačke, Poljske, Cipra i Mađarske). Najčešći novodijagnosticirani rak u Hrvatskoj 2020. godine je rak debelog i završnog crijeva te potom rak pluća i rak dojke. Vodeći zloćudni uzroci smrti su rak pluća, rak debelog i završnog crijeva i rak dojke (5).

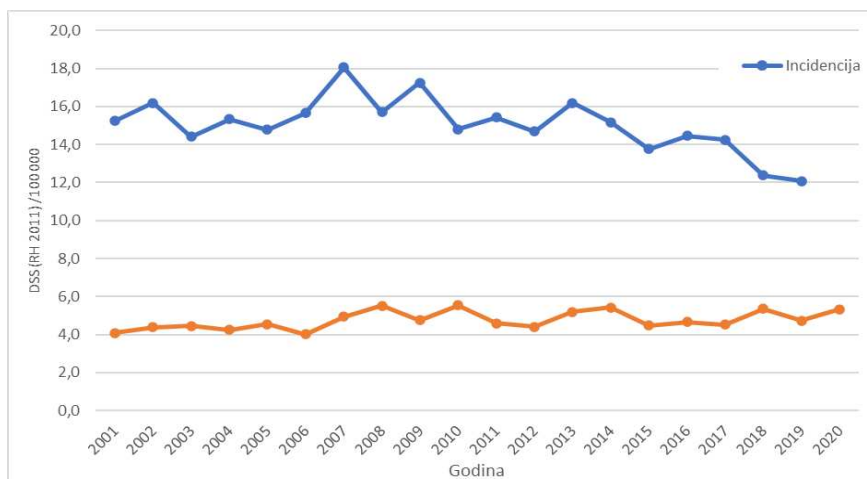
## **1.2. RAK VRATA MATERNICE**

### **1.2.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA**

Rak vrata maternice ili cerviksa je četvrti najčešći rak među ženskom svjetskom populacijom. Procjenjuje se da je u 2020. godini 604 000 žena oboljelo od ove bolesti, a 342 000 žena umrlo (6). U Hrvatskoj je prema posljednjim dostupnim podacima Registra za rak u 2019. godini dijagnosticirano 268 slučajeva raka vrata maternice. Javlja se u nešto mlađoj dobi nego druga sijela raka – u 2019. je trećina novooboljelih žena bila mlađa od 50 godina, a prosječna dob prilikom dijagnoze je bila 57 godina. Prema podacima o smrtnosti, u 2020. godini od raka vrata maternice u Hrvatskoj je umrlo 126 žena, od kojih je 37% bilo mlađe od 60 godina (Slika 2). Kao i ostale razvijene zemlje, u Hrvatskoj u zadnjih nekoliko godina bilježimo pad incidencije raka vrata maternice, međutim stopa mortaliteta ostaje stabilna (7).. Velika većina raka vrata maternice (više od 95%) uzrokovana je humanim papiloma virusom (HPV). Dva tipa humanog papiloma virusa, tip 16 i tip 18, odgovorna su za gotovo 50% teških oboljenja. HPV se uglavnom prenosi spolnim kontaktom i većina ljudi se zarazi HPV-om ubrzo nakon početka spolne aktivnosti, a više od 90% njih naposljetku preboli infekciju. Potrebno je 15 do 20 godina da se rak vrata maternice razvije kod žena s normalnim imunološkim sustavom, a kod žena s oslabljenim imunitetom može trajati kraće, 5 do 10 godina (6).

### **1.2.2. KLINIČKA SLIKA**

Žene s ranim rakom vrata maternice obično nemaju simptome. Simptomi često ne počinju sve dok rak ne postane veći i ne preraste u obližnje tkivo. Kada se to dogodi, najčešći simptomi su abnormalna vaginalna krvarenja kao što su krvarenja nakon vaginalnog spolnog odnosa, krvarenja nakon menopauze ili između mjesečnica. Može se pojaviti bol na području zdjelice i tijekom spolnog odnosa kojeg prati neuobičajen iscjedak iz rodnice. Ukoliko je bolest uznapredovala, često je i oticanje nogu, problemi s mokrenjem ili pražnjenjem crijeva te krv u mokraći (8).



**Slika 2.** Trend incidencije i mortaliteta raka vrata maternice u Hrvatskoj, 2001.-2020.

Preuzeto s:

<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/rak-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/> Datum pristupa: 10.3.2022.

### 1.2.3. KLASIFIKACIJA I PATOHISTOLOGIJA

CIN (cervikalna intraepitelna neoplazija) se stupnjuje kao 1 (blaga cervikalna displazija), 2 (umjerena displazija) ili 3 (teška displazija i karcinom in situ). Nije vjerojatno da će se CIN 3 spontano povući. Ako se ne liječi, može tijekom mjeseci ili godina, probiti bazalnu membranu i postati invazivni karcinom. Oko 80 do 85% svih oblika raka vrata maternice su karcinomi pločastih stanica, a većina ostalih su adenokarcinomi. Sarkomi i neuroendokrini karcinomi malih stanica su rijetki. Invazivni rak vrata maternice širi se neposredno u okolna tkiva ili limfnim žilama u limfne čvorove. Moguć je i hematogeni rasap (9). Liječnici određuju stadij raka procjenom tumora i je li se rak proširio na druge dijelove tijela. Određivanje stadija bolesti se temelji na rezultatima fizikalnog pregleda, slikovnih skeniranja i biopsija. Stadij I znači da se rak proširio iz sluznice cerviksa u dublje tkivo, ali se još uvijek nalazi samo u maternici. Faza II označava da se rak proširio izvan maternice na obližnja područja, poput rodnice ili tkiva u blizini cerviksa, ali je još uvijek unutar zdjelice. U fazi III tumor zahvaća donju trećinu rodnice te se proširio se na zid zdjelice, uzrokuje bubrežne probleme i zahvaća regionalne limfne čvorove. Stadij IVA znači da se rak proširio na mokraćni mjehur ili rektum, ali se nije proširio na druge dijelove tijela. U stadiju IVB rak se proširio na ostale dijelove tijela. Prva tri stadija tumora imaju podtipove koji поближе označavaju vrstu tumora (10).

#### 1.2.4. PREVENCIJA I LIJEČENJE

Rak vrata maternice može se spriječiti redovitim ginekološkim pregledima, Papa testovima i HPV testovima pomoću kojih se lako pronalaze prekancerozne promjene. Također se može spriječiti cijepljenjem protiv HPV-a (11). U Hrvatskoj je cijepljenje protiv HPV-a dio redovnog kalendara cijepljenja za učenike i učenicice 8. razreda osnovne škole, a ovisno o dostupnosti i za sve druge osobe mlađe od 25 godina. Cijepljenje ne uklanja u potpunosti rizik od zaraze i nastanka raka niti djeluje protiv svih tipova virusa HPV-a, stoga je potrebno redovito obavljati ginekološke preglede koji uključuju bris vrata maternice (12). Liječenje se sastoji od nekoliko mogućih metoda: kirurškog odstranjivanja, zračenja, kemoterapije, imunoterapije, ciljane terapije te njihovim kombiniranjem (13). Premaligni oblici bolesti liječe se minimalno invazivnim kirurškim zahvatima različitim tehnikama: strujom, kirurškim nožem ili laserom, pri čemu se odstranjuje dio vrata maternice u obliku stošca (konusa) (14).. Zahvati konizacije izvođeni kirurškim nožem obično se koriste kada je potrebno napraviti veće odstranjenje tkiva iz bilo kojeg razloga, a najčešće kod ponavljajućih konizacija.. Trahelektomija je zahvat kojim se odstranjuje dio vrata maternice koji se nalazi u rodnici, vrlo često se kombinira s laparoskopskim zahvatom odstranjenja limfnih čvorova zdjelice (14). Histerektomija je naziv za zahvat uklanjanja maternice i cerviksa (13). Bilateralna salpingooforektomija je operacija uklanjanja oba jajovoda i oba jajnika, a radi se istodobno s histerektomijom. Eksenteracija označava operaciju kojom se uklanjanja maternica, rodnica, donji dio debelog crijeva, rektuma ili mokraćnog mjehura. Eksenteracija se rijetko preporučuje, a najčešće se koristi kod nekih ljudi čiji se rak vratio nakon liječenja zračenjem (13). Terapije zračenjem obično se sastoji od određenog broja tretmana koji se daju tijekom određenog vremenskog razdoblja. Nuspojave od terapije zračenjem mogu uključivati umor, blage kožne reakcije, uznemireni želudac i usporeno pražnjenje crijeva koje su prolaznog karaktera i povlače se nakon prestanka terapije. Kemoterapija je uporaba lijekova za uništavanje stanica raka sprečavanjem stanica raka da rastu, dijele se i stvaraju više stanica. Nuspojave kemoterapije su mučnina, povraćanje, povišena temperatura, bolovi, različite alergijske reakcije, uništavanje krvnih stanica te sklonosti infekcijama ili slabokrvnost i krvarenja. Gubitak kose je česta nuspojava, premda svi citostatici ne uzrokuju ispadanje kose, a treba uzeti u obzir da su sve navedene nuspojave prolazne (14). Imunoterapija, također nazvana biološka terapija, osmišljena je za jačanje prirodne obrane tijela u borbi protiv raka (13).

Inhibitor imunološke kontrolne točke pembrolizumab koristi se za liječenje raka vrata maternice koji se ponovio ili proširio na druge dijelove tijela tijekom ili nakon liječenja kemoterapijom. Neke stanice raka eksprimiraju protein PD-L1, koji se veže na protein PD-1 na T stanicama. T stanice su stanice imunološkog sustava koje ubijaju određene druge stanice, poput stanica raka. Kada se vežu proteini PD-1 i PD-L1, T stanica ne napada stanicu raka. Pembrolizumab je PD-1 inhibitor, tako da blokira vezanje između PD-1 i PD-L1, što omogućuje T stanicama da pronađu i napadnu stanice raka. Uobičajene nuspojave imunoterapije uključuju kožne reakcije, simptome slične gripi, proljev i promjene tjelesne težine (13). Ciljana terapija je tretman koji cilja na specifične gene raka, proteine ili tkivnu okolinu koja doprinosi rastu i preživljavanju raka. Tisotumab vedotin je vrsta ciljane terapije koja se naziva konjugat protutijelo-lijek koji djeluje tako da se veže na mete na stanicama raka, a zatim otpušta malu količinu lijeka protiv raka izravno u tumorske stanice. Terapija zračenjem ili operacija općenito se koristi za tumor u ranoj fazi i pokazali su se jednako učinkoviti. Kemozračenje (kombinacija kemoterapije i terapije zračenjem) općenito se koristi za žene s većim tumorom, tumorom u uznapredovalom stadiju koji se nalazi samo u zdjelici te ako postoji visok rizik da se rak ponovno vrati ili ako se rak prošio. Kombinacija kemoterapije, imunoterapije, kirurškog zahvata i ciljane terapije može se koristiti za liječenje metastatskih novotvorina (13).

## **1.3. RAK JAJNIKA**

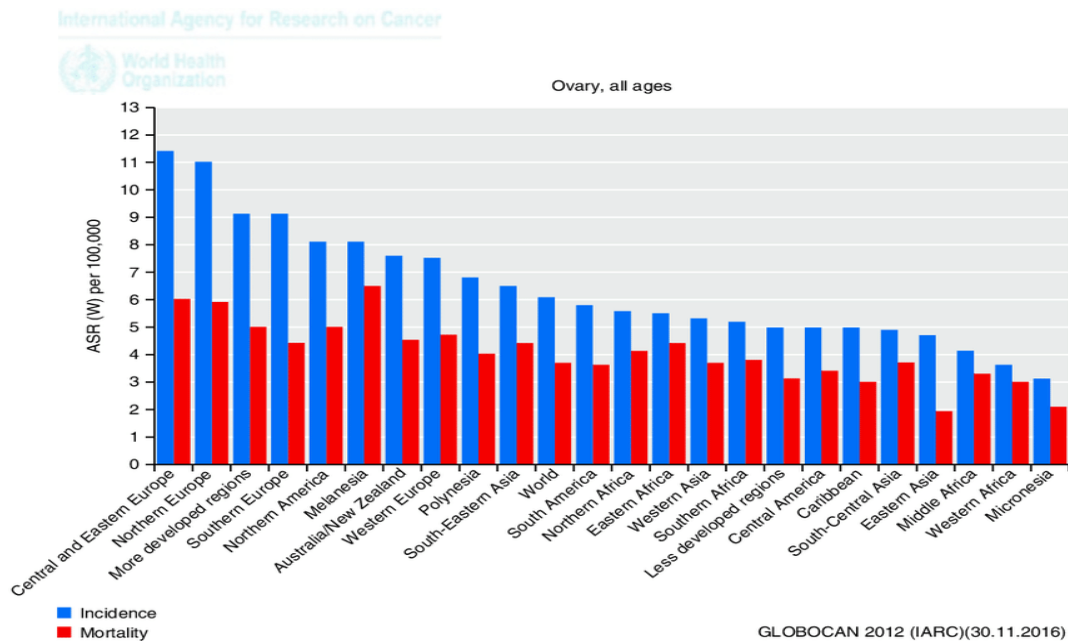
### **1.3.1. ETIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA**

Rak jajnika nalazi se na petom mjestu u broju smrtnih slučajeva od raka među ženama (16). Ovo je jedan od najsmrtonosnijih vrsta raka u žena. Rak jajnika se godišnje dijagnosticira kod gotovo 240000 žena diljem svijeta, a odgovoran je za više od 150000 smrtnih slučajeva svake godine (Slika 3) (15). Ova se bolest uglavnom razvija u starijih žena, što potkrepljuje činjenica da otprilike polovica žena kojima je dijagnosticiran rak jajnika ima 63 godine ili više (16). Prema statističkim podacima od raka jajnika u Hrvatskoj godišnje obolijeva između 400 i 500 žena, dok svake godine umire preko 300 žena. Rak jajnika najčešće se javlja kod nerotkinja, a drugi rizični čimbenici uključuju ranu dob menarhe, kasnu menopauzu te neuzimanje oralne kontracepcije. Zaključuje se da je potisnuta ovulacija zapravo zaštitni čimbenik. Jedna od hipoteza je pretpostavka neprekidne ovulacije, prema kojoj stalni popravak epitela do kojeg dolazi nakon svakog ovulacijskog ciklusa zapravo povećava vjerojatnost spontane mutacije stanica epitela jajnika i posljedični nastanak zloćudnih promjena (15).

### **1.3.2. KLINIČKA SLIKA**

Veća je vjerojatnost da će žena imati simptome ako se bolest proširila, ali može ih uzrokovati i rak jajnika u ranoj fazi. Najčešći simptomi su nadutost, bol u zdjelici ili abdomenu, problemi s prehranom i brzim osjećajem sitosti, urinarni simptomi (hitnost i učestalost mokrenja). Također se može pojaviti kronični umor, nadražen želudac, bol u leđima, konstipacija, promjene u menstrualnom ciklusu te oticanje trbuha s gubitkom težine (17).





**Slika 3.** Incidencija i smrtnost raka jajnika u različitim djelovima svijeta

Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/Incidence-and-mortality-age-standardized-rate-of-ovarian-cancer-according-to-United\\_fig21\\_318039723](https://www.researchgate.net/figure/Incidence-and-mortality-age-standardized-rate-of-ovarian-cancer-according-to-United_fig21_318039723) Datum pristupa: 12.3.2022.

### 1.3.3. KLASIFIKACIJA I PATOHISTOLOGIJA

Rak jajnika je histološki raznovrstan. Barem 80% potječe od epitela. 75% tih karcinoma su serozni cistadenokarcinomi dok ostatak obuhvaća mucinozne, endometrioidne, svijetlostanične, karcinome prijelaznog epitela, neklasificirane karcinome i Brennerov tumor. Preostalih 20% raka jajnika potječe iz primarnih zametnih stanica jajnika ili iz stanica strome i spolnog tračka ili su metastaze u jajnik (najčešće iz dojke i probavnog sustava). Rak zametnih stanica obično se razvija u žena mlađih od 30 god. Stromalni rak (rak strome–spolnog tračka) obuhvaća granulosa–teka stanične tumore i Sertoli–Leydig stanične tumore (18). Stadij raka jajnika kreće se od stadija I (1) do IV (4). U pravilu, što je broj manji, rak se manje proširio. Veći broj, kao što je stadij IV, znači da se rak više proširio (19). Stadij I označava tumor ograničen na jajnike. U stadiju II tumor zahvaća jedan ili oba jajnika uz širenje na zdjelicu ili metastaze. Tijekom stadija III postoje histološki potvrđene metastaze u peritoneumu izvan zdjelice, metastaze na površini jetre, zahvaćeni retroperitonealni ili inguinalni limfni čvorovi ili tumor ograničen na malu zdjelicu, ali s histološki potvrđenim širenjem na tanko crijevo. Za stadij IV su specifične udaljene metastaze, uključujući i metastaze u parenhimu jetre (18).

### 1.3.4. PREVENCIJA I LIJEČENJE

Istraživanja su pokazala da određeni čimbenici mogu smanjiti rizik od razvoja raka jajnika. Uzimanje kontracepcijskih pilula tri ili više godina smanjuje šanse za razvoj raka jajnika za 30% do 50%. Trudnoća i dojenje imaju pozitivan učinak u sprječavanju razvoja ove bolesti. Ženama s visokorizičnim genetskim mutacijama kao što su BRCA1 i BRCA2 preporuča se uklanjanje jajnika i jajovoda nakon rođenja djece kako bi se prevenirao nastanak raka jajnika i dojke (20). Kirurško odstranjivanje tumora je čest način liječenja. U ovisnosti o vrsti karcinoma i mjestu gdje se nalazi, provodi se salpingooforektomija (uklanjanje jajnika i jajovoda), histerektomija (odstranjivanje ženina maternice i, ukoliko je potrebno, okolnog tkiva), limfadenektomija (uklanjanje limfnih čvorova u zdjelici i paraortalnim područjima), omentektomija (uklanja tankog tkiva koje prekriva želudac i crijeva) te citoreduktivna kirurgija (metoda koja se koristi za žene s metastatskim rakom, a cilj joj je ukloniti što je moguće više tumorskog tkiva što može uključivati uklanjanje tkiva iz obližnjih organa, kao što su slezena, jetra i dio tankog crijeva ili debelog crijeva) (21). Bolesnicama se može dati kemoterapija prije ili nakon operacije ili kao primarna opcija liječenja.

Neoadjuvantna kemoterapija je ona koja se daje prije operacije. Radi se kako bi se smanjila veličina tumora prije operacije. Adjuvantna kemoterapija je ona koja se daje nakon operacije kako bi se uništio preostali karcinom. U oba slučaja se tretmani obično sastoje od karboplatina koji se daje intravenozno s paklitakselom ili drugim lijekovima. U tipičnom ciklusu liječenja treba davati ove lijekove svaka 3 tjedna. Ciljana terapija je tretman koji cilja na specifične gene raka, proteine ili tkivnu okolinu koja doprinosi rastu i preživljavanju raka. Oko 20% ovih tumora ima mutacije u BRCA genima koji su normalno uključeni u popravak DNK. PARP inhibitori (niraparib, olaparib) blokiraju enzim uključen u popravak oštećene DNK. Blokiranjem ovog enzima manja je vjerojatnost da će se DNK unutar stanica raka popraviti, što će dovesti do smrti stanice i mogućeg usporavanja ili zaustavljanja rasta tumora. Lijekovi koji se nazivaju inhibitori angiogeneze (bevacizumab) blokiraju djelovanje proteina koji se naziva vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF). VEGF potiče angiogenezu. Pokazalo se da ovi lijekovi povećavaju odgovor raka na liječenje i odgađaju vrijeme potrebno da se rak vrati, a sve metodom "izgladnjivanja" tumora (21). Pembrolizumab i dostarlimab su vrsta imunoterapije koja se naziva inhibitori imunološke kontrolne točke. Djeluju tako što zaustavljaju sposobnost stanica raka da zaustave aktivaciju imunološkog sustava što pomaže imunološkom sustavu da uništi stanice raka.

Obično se koriste za liječenje metastatskih tumora koji se ne mogu operirati. Hormonska terapija može se koristiti za liječenje nekih seroznih tumora niskog stupnja ako se vrate ili se ponovno pojave. To uključuje tamoksifen i inhibitore aromataze kao što su letrozol, anastrozol i eksemestan. Hormonska terapija se također koristi za liječenje stromalnih tumora kao što su recidivirajući tumori granulosa stanica. Terapija zračenjem se ne koristi kao prvi tretman za tumor jajnika. Može se koristiti za liječenje nekih osoba s rakom jajnika nakon kemoterapije, za liječenje malog, lokaliziranog rekurentnog raka te može biti opcija za rak jajnika koji se proširio na druge dijelove tijela (21).

Većina slučajeva raka jajnika je epitelni karcinom. Od toga je velika većina serozni karcinom visokog stupnja (HGSC). Liječenje ranog stadija, HGSC karcinom jajnika često uključuje operaciju i pomoćnu kemoterapiju dok liječenje uznapredovalog HGSC-a uključuje operaciju s adjuvantnom kemoterapijom i/ili ciljanom terapijom, neoadjuvantnu kemoterapiju nakon koje slijedi kirurški zahvat ili samo kemoterapiju ako operacija nije moguća. Prvi tretman za tumore zametnih stanica jajnika obično je kirurški. Liječnici mogu preporučiti pomoćnu kemoterapiju nakon operacije koja se obično sastoji od kombinacije bleomicina, cisplatina i etopozida.

Stromalni tumori su rijedak oblik raka jajnika. Za stromalni tumor u stadiju I, liječenje se obično sastoji samo od operacije. Za visokorizične tumore u ranoj fazi ili III ili IV bolest, liječnici često razmatraju kombiniranu kemoterapiju. Liječenje metastatskog raka uključuju eksperimentalne kombinacije kemoterapije, ciljane terapije i imunoterapije (21).

## **1.4. PORODICA *BRASSICACEAE***

Kupusnjače (lat.*Brassicaceae*) su jedna od najraznovrsnijih biljnih obitelji, a sastoji se od 321 roda i preko 3660 vrsta (22). Uključuje gospodarski važne jestive uljarice i povrće (23). Neki predstavnici ove obitelji su kupus, brokula, prokulice, kelj, hren, rotkvica i bijela gorušica, biljke koje sesvakodnevno naširoko koriste. Brojne vrste se uzgajaju kao ukrasne biljke, a neki članovi obitelji smatraju se invazivnim vrstama u regijama izvan njihovog izvornog područja. Obično su to jednogodišnje ili dvogodišnje biljke, ali mogu biti i trajnice. Listovi su uglavnom jednostavni i naizmjenično raspoređeni. Cvjetovi su križni s četiri latice i četiri čašice; biljke se iz tog razloga obično nazivaju "cruciferes" ili "cruciferous". Cvjetovi su obično bijeli, žuti ili boje lavande i karakteriziraju ih četiri duga i dva kratka prašnika (24).

### **1.4.1. LJEKOVITA SVOJSTVA**

Sekundarni metaboliti zaslužni su za ljekovita svojstva. Prehrana bogata biljkama iz ove porodice pokazala je pozitivan učinak na kontrolu i pojavnost različitih bolesti poput raka, hipertenzije, dijabetesa, kronične upale i oksidativnog stresa. Najbolje su istraženi glukozinolati i njihovi produkti razgradnje, izotiocijanati i indoli. Predstavnici ove porodice obiluju fenolnim spojevima i karotenoidima te manje proučavanim fitoaleksinima, terpenima, fitosteroidima i tokoferolima. Izotiocijanati su najkarakterističniji spojevi koji se smatraju odgovornima za njihov specifičan okus (25).

## 1.5. PRAVA JERIHONSKA RUŽA(lat.*Anastatica hierochuntica*)

### 1.5.1. KARAKTERISTIKE

Jerihonska ruža, također nazvana biljka uskrsnuća, poznata je po svojoj sposobnosti da preživi isušivanje. Razlikujemo pravu i lažnu predstavnicu ove vrste. Prava jerihonska ruža (*Anastatica hierochuntica*) porijeklom je iz zapadne Azije i jedina je vrsta iz roda *Anastatica*, iz obitelji *Brassicaceae* (26). To je pustinjska ljekovita biljka koja raste u raznim regijama diljem svijeta, posebno u arapskim zemljama (npr. Saudijska Arabija, Egipat, Oman, Libija, Irak), kao i u nekim azijskim, europskim i afričkim zemljama (27). Ova mala, siva biljka u sušnoj sezoni savija svoje grane i mahune sa sjemenkama prema unutra tvoreći kuglu koja se otvara tek kada je navlažena. Tako začahurena može preživjeti godinama, premda je vjetar ponekad iščupa iz korijena. Ako se i dalje ukorijeni kad je navlažena, širi se u zelenu biljku široku čak 30 cm i donosi sitne bijele cvjetove (Slika 4) (26). Prava jerihonska ruža ima pozitivne učinke na olakšavanje porođaja i smanjenje krvarenja iz maternice. Koristi se u liječenju astme, respiratornih bolesti, dizenterije, prehlade, groznice i glavobolje. Također se upotrebljava u borbi protiv konjuktivitisa i steriliteta. Kemijski sastojci *A. hierochuntica* istraženi su zbog različitih farmakološki važnih svojstava uključujući antimikrobnu, protuupalnu, hipolipidemijsku, hipoglikemijsku, hepatoprotektivnu i gastroprotektivnu aktivnost korištenjem *in vitro* i *in vivo* studija (28). *A. hierochuntica* sadrži značajne količine minerala, kao što su Mg, Ca, Mn, Fe, Cu i Zn (29). Osim toga, novi bioaktivni spojevi kao što su anastatin A i B i hijerokini A, B i C identificirani su u biljci. Anastatin A i B, koreliraju sa snažnim hepatoprotektivnim učincima inhibiranjem citotoksičnosti izazvane D-galaktozaminom u primarno kultiviranim hepatocitima miša (30). Studije vezane uz antikancerogeno djelovanje *A. hierochuntica* ograničene su na njegovu antimelanogene i djelovanje protiv raka vrata maternice korištenjem metanolnog ekstrakta cijele biljke (28).



**Slika 4.** Prava jerihonska ruža

Preuzeto s: <https://plantsam.com/anastatica-hierochuntica/>

Datum pristupa: 20.3.2022.

## **1.6. SEKUNDARNI METABOLITI PORODICE *BRASSICACEAE***

### **1.6.1. GLUKOZINOLATI**

Glukozinolati (GLS) su glavna skupina biljnih metabolita koji se isključivo mogu naći u porodici krstašica (35). Sastav i sadržajglukozinolata ovisi o genotipu, klimi i uvjetima kultivacije (gnojidba, vrijeme berbe i položaj biljke). Pri oštećenju biljnog tkiva dolazi do hidrolize glukozinolata pomoću enzima mirozinaze te nastaju izotiocijanati, tiocijanati, nitrili, goitrin i epitionitril (36). Kemijska konformacija GSL sadrži ostatak  $\beta$ -D-tioglukozida vezan na (Z) -N-hidroksiminosulfatni ester. Oni se mogu podijeliti u tri klase: alifatski, aromatski i indolični glukozinolati izvedeni iz aminokiselina metionina, fenilalanina i triptofana (37). Ta indukcija traje neko vrijeme pa je za razliku od antioksidansa koji imaju kratko djelovanje, zaštitni učinak izotiocijanata znatno duži (35).

### **1.6.2. IZOTIOCIJANATI**

Izotiocijanati (ITC) su bioaktivni produkti nastali enzimatskom hidrolizom glukozinolata (GLS) enzimom mirozinaza. Najzastupljeniji su sekundarni metaboliti u redu krstašica. Ukoliko dođe do oštećenja biljnog tkiva, mirozinaza dolazi u kontakt s glukozinolatima, hidrolizira ih, što rezultira nastajanjem ITC-a.

Opća kemijska formula ITC-a je  $R-N=C=S$ . Oni su spojevi jakog okusa i arome, hlapljivi su i nastaju pri neutralnom Ph (38). Pokazali su preventivnu aktivnost protiv brojnih kroničnih bolesti kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, dijabetes i neurodegenerativne bolesti (37). Mehanizam djelovanja temelji se na interakciji s proteinima uključenim u proces popravka DNK-a, inhibiranju staničnog ciklusa i induciranju apoptoze stanica. Također, inhibiraju NF- $\kappa$ B (nuklearni faktor-*kappa*B) koji ima ulogu u procesu upale i imunološkog odgovora, a smatra se glavnim faktorom migracije tumorskih stanica (39). Inhibiraju i aktivnost pojedinih enzima iz obitelji citokrom P450 koji su uključeni u proces karcinogeneze. Induciraju enzime kao što su GST, UDP-glukuronil transferaza (UGT), NQO1 i glutamatcistein ligaza (GCL) koji sudjeluju u zaštiti stanica od oštećenja DNK uzrokovanog karcinogenima i reaktivnim kisikovim spojevima (40). Dokazano je njihovo protuupalno i imunomodulatorno djelovanje različitim mehanizmima inhibicije VEGF (vaskularni endotelni faktor rasta) i proupalnih citokina (41). Inhibiraju proces angiogeneze utjecajem na faktore inducirane hipoksijom (HIF) koji sudjeluju u kontroli samog procesa (42).

### 1.6.3. FENOLNI SPOJEVI

Kupusnjače su bogate fenolnim spojevima. Sintetiziraju se kao sekundarni metaboliti u biljkama iz aminokiseline fenilalanina pomoću enzima fenilalanil-amonij-liaze. Struktura im se sastoji od aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnih skupina. Neke od njihovih uloga su privlačenje kukaca, oprašivanje, obrambeni mehanizam protiv insekata, gljivica, virusa i bakterija i oponašanje fitohormona. Istraživanjima je potvrđen njihov povoljan terapijski učinak kao što je protuupalno, antimikrobno, antialergijsko, antitumorsko i, najznačajnije, antioksidativno djelovanje. Zahvaljujući njihovom antioksidativnom djelovanju, imaju protektivno djelovanje na brojne organe te bitnu ulogu u bolestima povezanih s oksidacijskim stresom kao što su upalne bolesti, rak, ateroskleroza te neurodegenerativne, Alzheimerova i Parkinsonova bolest (43). Značajna je i njihova antibakterijska aktivnost, posebice derivata kvercetina i kempferola, koji su efikasno inhibirali rast nekih gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. Izorhamnetin, izoliran iz lista gorušice, pokazao je i značajno hipoglikemijsko djelovanje te vazodilatacijske sposobnosti, stoga i potencijalnu kardioprotektivnu ulogu. Spomenuta tri spoja ostvaruju i protuupalno djelovanje na aktivirane makrofage (43).

#### 1.6.4. FLAVONOIDI

Flavonoidi su sekundarni metaboliti koji se uglavnom sastoje od benzopiranskog prstena, a koji ima fenolne ili polifenolne skupine na različitim pozicijama. Najčešće se nalaze u voću, začinskom bilju, stabljikama, žitaricama, orašastim plodovima, povrću, cvijeću i sjemenkama. Prisutnost bioaktivnih fitokemijskih sastojaka prisutnih u različitim dijelovima ovih biljaka daje im ljekovitu vrijednost i biološko djelovanje. Većina flavonoida je široko prihvaćena kao terapijska sredstva. Flavonoidi se koriste u prirodnim bojama, u kozmetici i proizvodima za njegu kože u sredstvima protiv bora. Ipak, najizraženije primjene ovih polifenola su u području medicine. Flavonoidi se intenzivno koriste kao antikancerogena, antimikrobna, antivirusna, antiangiogena, antimalarijska, antioksidativna, neuroprotektivna, antitumorska i antiproliferativna sredstva. Ekstrakt kore jabuke bogat flavonoidima inhibira acetilkolinesterazu (ACE) *in vitro* i učinkovito je antihipertenzivno sredstvo. Također, sprječava kardiometaboličke poremećaje i pokazuje bolje očuvanje kognitivnih performansi sa starenjem (45). Novi skeletni flavonoidi, anastatini A i B, izolirani su iz metanolnog ekstrakta egipatske ljekovite, cijele biljke *Anastatica hierochuntica*. Njihove flavanonske strukture koje imaju benzofuranski dio određene su na temelju kemijskih i fizikalno-kemijskih dokaza. Utvrđeno je da anastatini A i B pokazuju hepatoprotektivne učinke na citotoksičnost izazvanu d-galaktozaminom u primarno uzgojenim mišjim hepatocitima i njihova je aktivnost bila jače od aktivnosti srodnih flavonoida i komercijalnog silibina (30).



## 1.7. PORODICASELAGINELLACEAE

*Selaginellaceae* su uglavnom rasprostranjene u tropskim i toplim krajevima diljem svijeta. Gospodarski značaj uključuje uzgojno ukrasno bilje i lokalno ljekovito bilje. *Selaginellaceae* su uspravne do ležeće biljke s dihotomno razgranatim stabljikama koje ponekad tvore planarni sustav grana (32). Prilagođene su tropskim krajevima svojim površinskim sastavom (prisutnošću voska) i sposobnošću izbojaka koje omogućuju da se smotaju tijekom suše. Rod *Selaginella* podijeljen je u sedam podrodova, a jedna od najpoznatijih predstavnica je *Selaginella lepidophylla* (obično nazvana lažna ruža iz Jerihona) (31).

### 1.7.1. LJEKOVITA SVOJSTVA

Kemijsko istraživanje Selaginele rezultiralo je identifikacijom različitih novih spojeva kao što su flavonoidi, lignani, alkaloidi i terpenoidi. Ovi spojevi su pokazali širok raspon bioloških aktivnosti uključujući antioksidativne, antidijabetičke, antikancerogene i antimikrobne učinke. Grupa jedinstvenih spojeva pod nazivom selaginelini, koji posjeduju funkcionalne skupine p-kinon metida i alkinilfenola, također je identificirana iz različitih vrsta *Selaginella*. Selaginelini su pretežno obojeni spojevi. Drugi i treći članovi ove zanimljive klase spojeva, selaginelini A i B, izolirani su iz *S. tamariscina*. Ovi spojevi imaju antioksidativni potencijal i citotoksično djelovanje na ljudske stanice karcinoma vrata maternice. Do danas je prijavljeno više od 60 analoga selaginelina i selaginpulvilina za koje se pokazalo da imaju različite biološke aktivnosti kao što su citotoksičnost, inhibicijska aktivnost fosfodiesteraze-4 (PDE4), protein tirozin fosfataza 1B (PTP1B) inhibitorna aktivnost, antimikrobna aktivnost i antidijabetička aktivnost. Derivati selaginelina pokazali su antimikrobno djelovanje protiv *Staphylococcus aureus* i antifungalno djelovanje na *Candida albicans* (31).

## 1.8. LAŽNA JERIHONSKA RUŽA (lat. *Selaginella lepidophylla*)

### 1.8.1. KARAKTERISTIKE

Lažna jerihonska ružaporijeklom je iz pustinje Chihuahuan u Americi i Meksiku i član je obitelji šiljastih mahovina (*Selaginellaceae*). Za suhog vremena njezine se stabljike uvijaju u čvrstu kuglu i biljka ulazi u razdoblje mirovanja (26). Ovo je poikilohidrična biljka koja ima sposobnost preživjeti ekstremnu dehidraciju i uskrsnuti nakon dugog razdoblja bez vode (Slika 5). Ovu sposobnost podupire velika koncentracija trehaloze koja pomaže u zaštiti nekih proteina i membrana tijekom suše (31). Za razliku od prave jerihonske ruže, *S. lepidophylla* može oživjeti u prisutnosti vlage čak i ako joj je korijenje poremećeno. Biljka je zelene boje i izgleda paprati, razmnožava se sporama, a često se prodaje kao kuriozitet (26). Tradicionalno se koristi za liječenje groznice, žutice, poremećaja jetre, ciroze, proljeva, kolecistitisa, upale grla, kašlja, bolesti pluća, pospješuje cirkulaciju, uklanja zastoj krvi i zaustavlja vanjsko krvarenje nakon traume i nakon odvajanja pupkovine. *Selaginella lepidophylla* pokazuje *in vitro* antimikrobno, antivirusno, antidiijabetičko, antimutageno, protuupalno djelovanje te spazmolitički i antikancerogeni potencijal zbog visokog sadržaja različitih fitokemikalija kao što su flavonoidi, fenilpropanoidi, steroidi, pigmenti, kisikov heterocikl, lignani, kumarini, kvinoidi, kromoni, benzenoidi, ugljikohidrati i alkaloidi (33). *S. lepidophylla* potiče diurezu, a glavne komponente izolirane iz biljke uključuju biflavonoide. Te bi komponente mogle potvrditi njegovu upotrebu kao antihipertenzivnog lijeka (34).



**Slika 5.** Lažna jerihonska ruža

Preuzeto s: <https://guatemala.inaturalist.org/taxa/168764-Selaginella-lepidophylla> Datum pristupa: 21.3.2022.

## **1.9. SEKUDARNI METABOLITI PORODICESELAGINELLACEAE**

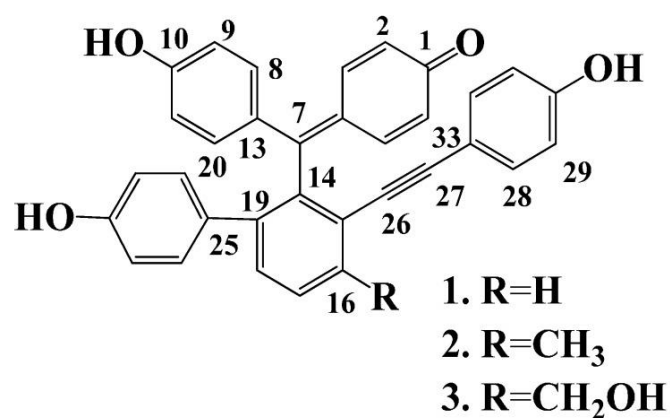
### **1.9.1. BIFLAVONOIDI**

Biflavonoidi, kao članovi obitelji flavonoida, sastoje se od dva monoflavonoida povezana izravnom vezom ili linearnom poveznicom. Istraživanje fitokemijskih sastojaka *S. tamariscina* otkrilo je da je ona bogat izvor biflavonoida (npr. amentoflavona, hinokiflavona, izokriptomerina, sumaflavona itd.). Poznato je da biflavonoidi izolirani iz *S. tamariscina* pokazuju različite biološke aktivnosti koje uključuju protuupalno, antialergijsko, antitumorsko, antioksidativno, antidijabetičko, antivirusno i antikancerogeno djelovanje te osteogenezu (47). Amentoflavon je dobro poznati biflavonoid koji se javlja u mnogim prirodnim biljkama. Pronađeno je preko 120 biljaka koje sadrže ovu bioaktivnu komponentu kao što su biljne porodice *Selaginellaceae*, *Cupressaceae*, *Euphorbiaceae*, *Podocarpaceae* i *Calophyllaceae*. S razvojem moderne farmakologije sve je više dokaza potkrijepilo mnoge bioaktivnosti amentoflavona uključujući antioksidacijsko, protuupalno, antitumorsko, antivirusno, te antigljivično djelovanje, te terapijsko djelovanje na središnji živčani sustav i kardiovaskularni sustav itd. Svojim dobrim farmakološkim svojstvima i visokim sadržajem amentoflavon je čak i naveden kao kemijski marker *Selaginellae* (46).

Provedenim istraživanjem je utvrđeno da amentoflavon značajno inhibira rast hepatocelularnog tumora, aktivaciju ERK/NF-κB (ekstracelularna signalno regulirana kinaza, nuklearni faktor-kappaB) i ekspresiju proteina povezanih s progresijom tumora (48).

### 1.9.2. PRIRODNI PIGMENTI: SELAGINELINI

U posljednjih pet godina, više od 10 selaginelina (novih pigmenata s jedinstvenim para-kinon metidom i alkinilfenol ugljičnim skeletom) izolirano je iz nekoliko vrsta *Selaginellae* u Kini (Slika 6). Derivati selaginelina do sada su pronađeni samo u rodu *Selaginellae*. Citotoksične aktivnosti tri selaginelina: selaginelin O, selaginelin M i selaginelin procijenjene su pomoću stanica humanog karcinoma vrata maternice (HeLa). Primjetno je da su svi ovi selaginelini pokazali značajnu citotoksičnu aktivnost (49).



**Slika 6.** Strukture derivata selaginelina iz *S. tamariscina*

Preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6331899/>

Datum pristupa: 24.3.2022.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje ekstrakata biljne vrste *Anastatica hierochuntica* (prava jerihonska ruža) dobivenih različitim postupcima; autolizom i hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru te ekstrakta biljne vrste *Selaginella lepidophylla* (lažna jerihonska ruža) na stanične linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom. Hipoteza o potencijalno citotoksičnom djelovanju ispitivana je na staničnim linijama karcinoma vrata maternice (SiHa) i karcinoma jajnika (SK-OV-3).

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

### 3.1. STANIČNE LINIJE

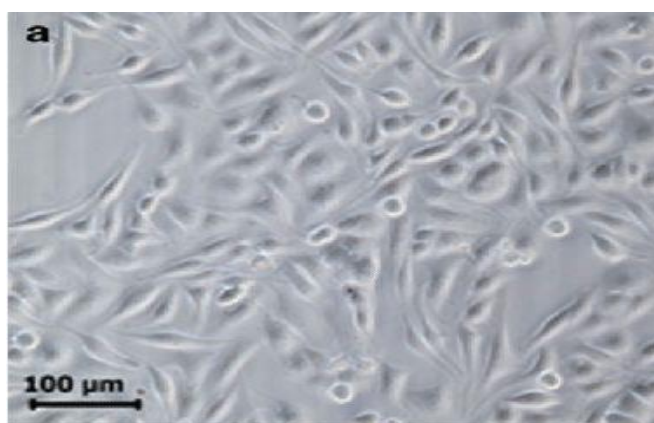
Citotoksična aktivnost ekstrakata provodila se *in vitro* na humanim staničnim linijama karcinoma vrata maternice (SiHa) te karcinoma jajnika (SK-OV-3). Karakteristike navedenih staničnih linija prikazane su u tablicama 1 i 2.

#### 3.1.1. SiHa

**Tablica 1.** Karakteristike stanične linije karcinoma vrata maternice SiHa

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-35> Datum pristupa: 25.3.2022

<b>ORGANIZAM</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>TIP STANICA</b>	epitelne
<b>MORFOLOGIJA</b>	epitelna
<b>TKIVO</b>	maternica; cerviks
<b>BOLEST</b>	karcinom pločastih stanica
<b>UVJETI ČUVANJA</b>	parna faza tekućeg dušika
<b>TIP RASTA</b>	adherentan
<b>KARIOTIP</b>	hipertriploidan do poliploidan



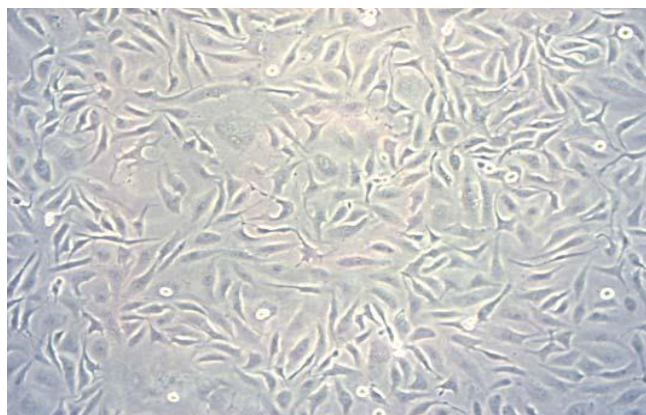
**Slika 7.** Stanična linija SiHa

Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-SiHa-cells-a-before-treatment-and-b-d-after-incubated-with\\_fig5\\_225977369](https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-SiHa-cells-a-before-treatment-and-b-d-after-incubated-with_fig5_225977369)

Datum pristupa: 25.3.2022.



### 3.1.2. SK-OV-3



**Slika 8.** Stanična linija SK-OV-3

Preuzeto s: <https://www.mybiosource.com/cell-line/skov-3-rfp/168508>

Datum pristupa: 25.3.2022.

**Tablica 2.** Karakteristike stanične linije karcinoma jajnika SK-OV-3

Preuzeto s: <https://www.atcc.org/products/htb-77> Datum pristupa: 25.3.2022.

---

<b>ORGANIZAM</b>	<i>Homo sapiens</i> , čovjek
<b>TIP STANICA</b>	epitelne
<b>MORFOLOGIJA</b>	epitelna
<b>TKIVO</b>	jajnik; ascites
<b>BOLEST</b>	adenokarcinom
<b>UVJETI ČUVANJA</b>	parna faza tekućeg dušika
<b>TIP RASTA</b>	adherentan
<b>KARIOTIP</b>	hipodiploidan

---

## **3.2. METODE IZOLACIJE**

### **3.2.1. EKSTRAKCIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

Prije ekstrakcije, uzorci su stavljani na autolizu. Uzorci odgovarajućih masa su stavljani u tikvice u koje je dodana mala količina destilirane vode i alikvot otopine enzima mirozinaze kako bi se potaknula razgradnja glukozinolata i u svaki uzorak je dodano po 10 mL organskog otapala (diklormetan). Uzorci u tikvici, omotani parafilmom, su stavljani na tresilicu oko 10 minuta. Po završetku, sadržaj tikvica je profiltriran preko cjediljke (ovisno o finoći materijala) i filter papira u lijevak za odjeljivanje. Sadržaj lijevka za odjeljivanje je izmućkan, a donji sloj je, nakon odvajanja, odliven u čašu u koju je stavljen bezvodni natrijev sulfat za adsorpciju zaostale vode. Biljni materijal se dodatno ispiri s malom količinom diklormetana, a postupak odjeljivanja se ponavlja. Odvojeni ekstrakti se spremaju u bočice koje se čuvaju u hladnjaku do analize.

### **3.2.2. HIDRODESTILACIJA**

Hidrodestilacija je konvencionalna metoda koja koristi vodu ili paru za ekstrakciju bioaktivnih spojeva, uglavnom eteričnih ulja. Ova tehnika se redovito izvodi putem instalacije prepoznate kao Clevenger aparat ili jednostavna destilacija parom. U Clevenger aparatu, hidratizirani uzorak se zagrijava kako bi se isparili hlapljivi sastojci, dok se u pristupu destilacije vodenom parom para propušta kroz sloj uzorka. U obje metodologije postižu se dva sloja (vodeni i bogati uljem), a ulje se može dalje odvajati putem lijevka za odvajanje. Ova tehnika ne zahtijeva upotrebu organskih otapala. Hidrodestilacija uključuje tri glavna fizikalno-kemijska procesa: hidrodifuziju, hidrolizu i toplinsku razgradnju (50). Aparat se u osnovi sastoji od tri dijela: tikvice s okruglim dnom, u koju se stavlja materijal koji sadrži hlapljivo ulje i određena količina vode; separator, u kojem se ulje automatski odvajaz destilata u graduiranoj cijevi, čime se omogućuje izravno očitavanje količina ulja; i prikladan kondenzator (Slika 9) (51). Hidrodestilacija biljnog materijala se odvijala u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata. Kao trap korištena je smjesa organskih otapala pentana i dietiletera u omjeru 3:1 (6 mL+2 mL). Eterično ulje dobiveno nakon destilacije je odvojeno od vodenog sloja pomoću propipete te je posušeno bezvodnim natrijevim sulfatom usvrhu uklanjanja viška vode. Zatim je eterično ulje prebačeno u prethodno odvagano bočicu i spremljeno u zamrzivač do analize na GC-MS-u.



**Slika 9.** Hidrodestilacija u aparaturi po Clevengeru

Preuzeto s: <http://docplayer.rs/201486895-Hlapljivi-spojevi-smilja.html> Datum pristupa: 27.3.2022.

### 3.3. POSTUPAK

Stanice su kupljene od ATCC (LGC standardi). Stanične linije raka (stanična linija humanog raka vrata maternice SiHa i stanična linija humanog raka jajnika SK-OV-3) uzgajane su u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub> na 37°C, u Dulbeccovom modificiranom Eagleovom mediju (DMEM Euroclone, Milano, Italija) koji sadrži 4,5 g/L glukoze, 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 1% antibiotika (Penicilin Streptomycin, EuroClone, Milano, Italija). Stanice u mediju ostavimo preko noći kako bi se uhvatile za podlogu. Adherirane stanice na podlozi, nakon uklanjanja DMEM-a i ispiranja PBS-om (*phosphate buffer saline*, hrv. puferirana otopina fosfatnih soli), tretiraju se tripsinom, proteolitičkim enzimom koji omogućava odvajanje stanica od podloge te njihovo presađivanje. Potom slijedi brojanje stanica pomoću Bürker - Türkove komorice pri čemu se 10 µL stanica pomiješa s 90 µL Trypan Blue boje koja selektivno boja mrtve stanice te tako omogućava razlikovanje i brojanje živih stanica koje nisu obojane zbog sačuvanog integriteta stanične membrane (Slika 10).

U komoricu prenesemo pripravljenu staničnu suspenziju te pomoću mikroskopa izbrojimo žive stanice unutar pet kvadratića, a konačan broj izračunamo po formuli:  $N \times 10 \times 10^4$  stanica/mL (N= broj živih stanica u kvadratićima, 10= faktor razrjeđenja,  $10^4$  =volumen komorice). Jednak broj stanica presađuje se u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za podlogu. Nakon toga se različitim staničnim linijama na četiri različite ploče s jažicama dodaju određena razrjeđenja vodenih ekstrakata lista, stabljike i korijena prave jerihonske ruže (dobivene različitim metodama; autolizom i hidrodestilacijom po Clevengeru) i vodeni ekstrakt lažne jerihonske ruže u koncentracijama od 1  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  i 100  $\mu\text{g/mL}$  te ostave u inkubatoru tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice, koje sadrže samo medij, predstavljaju kontrolu.



**Slika 10.** Bürker - Türkova komorica

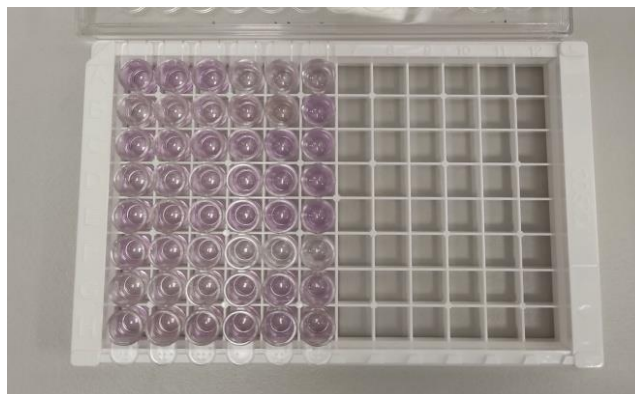
Preuzeto s: <https://market.mikro-polo.si/vsi-izdelki/izdelek.aspx/i783251>

Datum pristupa: 27.3.2022.

### 3.4. TEST CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI (MTT METODA)

MTT metodom mjerimo preživljenje i proliferaciju stanica. Žuti tetrazolin MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) se reducira u mitohondrijima metabolički aktivnih stanica. MTT testom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica tretiranih određenim ekstraktima biljaka s obzirom da metabolički neaktivne stanice ne vežu MTT. Metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan, dok mrtve stanice gube tu sposobnost. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Nakon dodatka otopine MTT-a, stanice se inkubiraju na 37°C 2 sata. Ljubičasti formazan koji nastaje u stanici se mjeri spektrofotometrijski. Nakon uklanjanja medija, novonastali formazan je potrebno otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid) kako bi se mogla očitati njegova apsorbancija na 570 nm (Slika 11). Pločice su zatim inkubirane 10 min na 37°C uz treskanje.

Citotoksična aktivnost ispitivanih uzoraka prave i lažne jerihonske ruže se iskazuje omjerom izmjerenih apsorbancija stanica tretiranih uzorcima vodenih ekstrakata jerihonske ruže te apsorbancije onih koje nisu tretirane (kontrolne skupine).



**Slika 11.** Ljubičasto obojenje nakon otapanja formazana DMSO-om

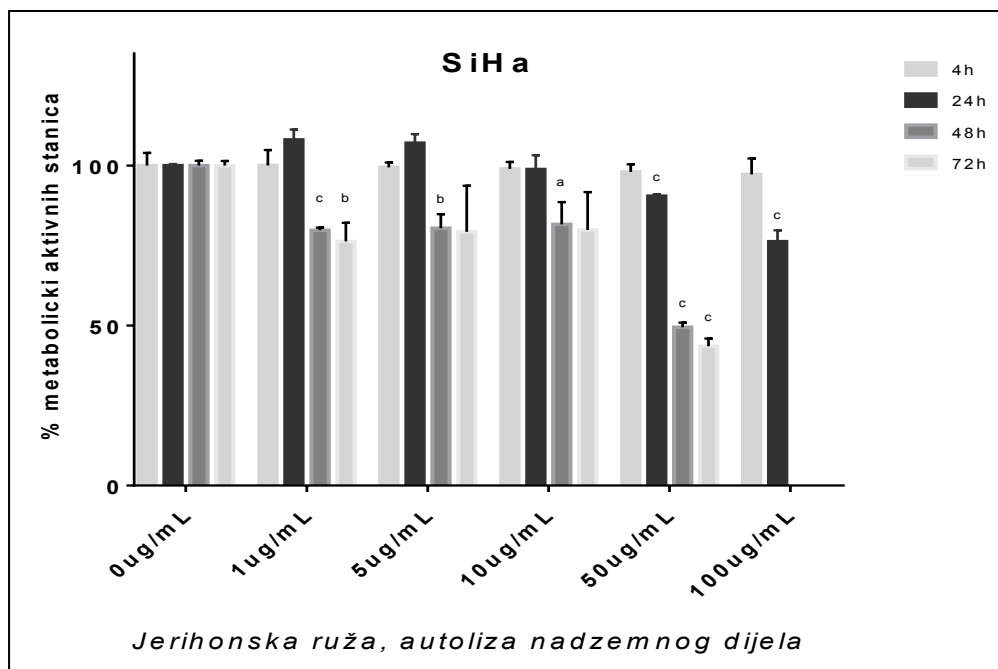
### **3.5. STATISTIČKA ANALIZA**

Izmjerene su apsorbancije kontrolnih (stanice karcinoma u mediju) te ispitivanih skupina (stanice tretirane ekstraktima prave i lažne jerihonske ruže). Izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija kontrolnih i ispitivanih skupina nakon 4, 24, 48 i 72 sata te vrijednosti omjera između srednjih vrijednosti ispitivanih i kontrolnih skupina za svaku koncentraciju korištenih ekstrakata nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Dobiveni rezultati su prikazani grafički te statistički analizirani u programu GraphPadPrism v.7.0.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. STANIČNA LINIJA SiHa

### 4.1.1. EKSTRAKT PRAVE JERIHONSKE RUŽE, NADZEMNI DIO (AUTOLIZA)



	4 h	24 h	48 h	72 h
<b>IC 50 (µg/mL)</b>	ND	ND	41,16	33,06

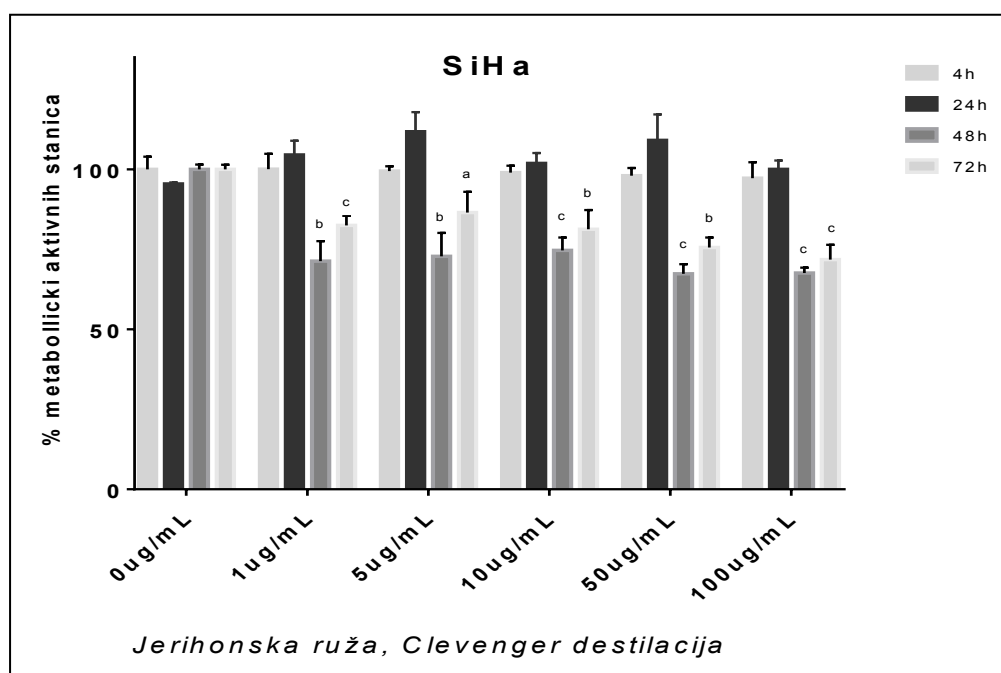
**Slika 12.** Citotoksična aktivnost ekstrakta prave jerihonske ruže, nadzemni dio (autoliza) (IC<sub>50</sub>=koncentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- $P < 0,05$ , b-  $P < 0,01$ , c-  $P < 0,001$ )

Tretiranjem stanica ekstraktom nadzemnog dijela prave jerihonske ruže dobivene autolizom pri koncentracijama 1, 5 i 10 µg/mL opažena je značajna citotoksična aktivnost nakon 48 i 72 sata. Veće koncentracije od 50 i 100 µg/mL pokazale su još bolje rezultate.



Opažena je značajna citotoksična aktivnost nakon 24, 48 i 72 sata. Iako zbog nedovoljne količine ekstrakta nismo mogli utvrditi točnu citotoksičnu aktivnost pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nakon 48 i 72 sata, po dobivenim rezultatima bi se moglo zaključiti da najveća koncentracija (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) u najdužem intervalu mjerenja (72 h) ima najznačajniju citotoksičnu aktivnost. IC50 vrijednost se nije mogla odrediti za vremenske intervale od 4 i 24 sata. IC50 nakon 48 sati iznosi 41,16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a nakon 72 sata 33,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Slika 12).

#### 4.1.2. EKSTRAKT PRAVE JERIHONSKE RUŽE (CLEVINGER DESTILACIJA)

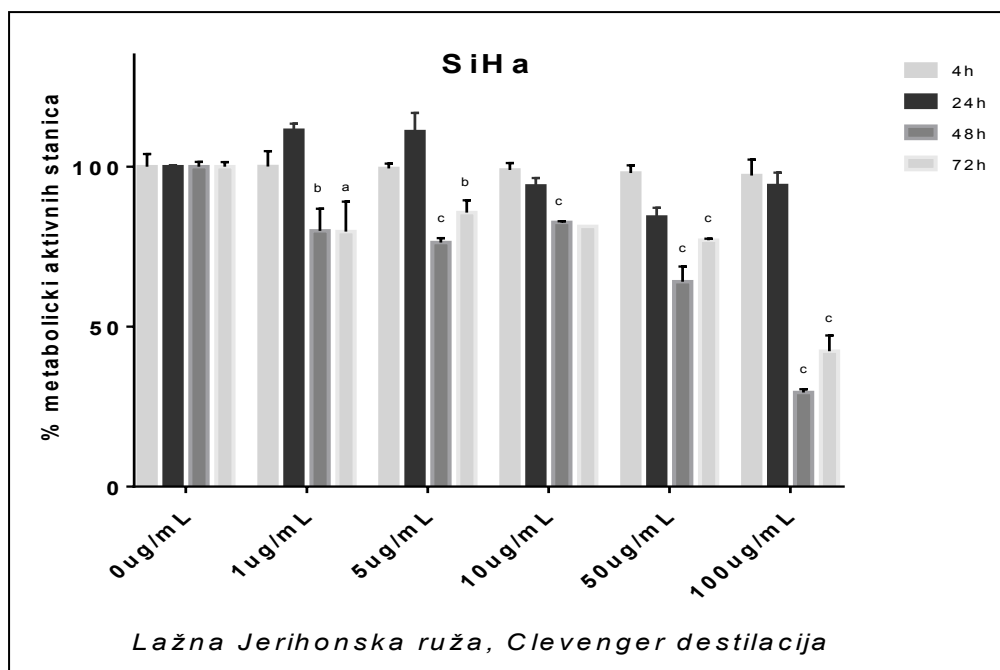


	4 h	24 h	48 h	72 h
IC 50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ND	ND	ND	ND

**Slika 13.** Citotoksična aktivnost ekstrakta prave jerihonske ruže (Clevenger destilacija)(IC50=koncentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika:a-  $P < 0,05$ , b-  $P < 0,01$ , c-  $P < 0,001$ )

Značajna citotoksična aktivnost ekstrakta prave jerihonske ruže (Clevenger destilacija) uočena je pri koncentracijama od 1, 5 i 10  $\mu\text{g/mL}$  nakon 48 i 72 sata. Još bolje citotoksično djelovanje je zapaženo pri većim koncentracijama od 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$  u intervalima od 48 i 72 sata. Zanimljivo je primijetiti da su pri svim koncentracijama najbolji rezultati postignuti 48 sati nakon tretiranja stanica. To se može objasniti fenomenom da su stanice nakon 48 sati potrošile veći dio aktivnog citotoksičnog spoja pa se nakon izvjesnog intervala trebalo stanicama nadodati još ekstrakta kako bi se citotoksično djelovanje nastavilo povećavati. Najbolji citotoksični učinak je uočen pri najvećoj koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$  nakon 48 sati. Niti jedna koncentracija u niti jednom vremenskom intervalu nije uzrokovala smanjenje broja živih stanica na 50 % pa se  $\text{IC}_{50}$  vrijednost nije mogla odrediti (Slika 13).

#### 4.1.3. EKSTRAKT LAŽNE JERIHONSKE RUŽE (CLEVINGER DESTILACIJA)



	4 h	24 h	48 h	72 h
<b>IC 50 (µg/mL)</b>	ND	ND	54,33	95,79

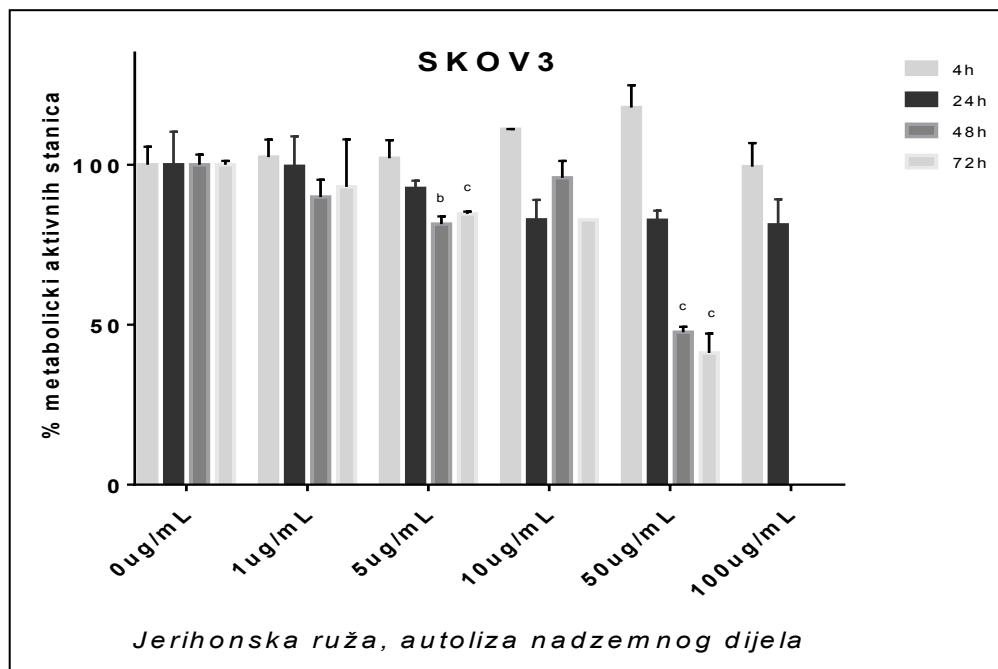
**Slika 14.** Citotoksična aktivnost ekstrakta lažne jerihonske ruže (Clevenger destilacija) (IC<sub>50</sub>=koncentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- P <0,05, b- P <0,01, c- P <0,001)

Ekstrakt lažne jerihonske ruže (Clevenger destilacija) pokazuje značajnu citotoksičnu aktivnost u koncentracijama od 1, 5 i 10 µg/mL nakon 48 i 72 sata. Pri većim koncentracijama od 50 i 100 µg/mL uočena je još bolja citotoksična aktivnost nakon 48 i 72 sata. Treba uočiti da su pri tretiranju stanica koncentracijama od 5, 50 i 100 µg/mL najbolji rezultati izmjereni nakon 48 sati.

To se, kao i kod djelovanja ekstrakta prave jerihonske ruže, može objasniti fenomenom da su stanice nakon 48 sati potrošile veći dio aktivnog citotoksičnog spoja pa se nakon izvjesnog intervala trebalo stanicama nadodati još ekstrakta kako bi se citotoksično djelovanje nastavilo povećavati. Najveće citotoksično djelovanje uočeno je pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$  u vremenskom intervalu od 48 sati. IC50 vrijednost se nije mogla odrediti za vremenske intervale od 4 i 24 sata. IC50 nakon 48 sati iznosi 54,33  $\mu\text{g/mL}$ , a nakon 72 sata 95,79  $\mu\text{g/mL}$  (Slika 14).

## 4.2. STANIČNA LINIJA SK-OV-3

### 4.2.1. EKSTRAKT PRAVE JERIHONSKE RUŽE, NADZEMNI DIO (AUTOLIZA)



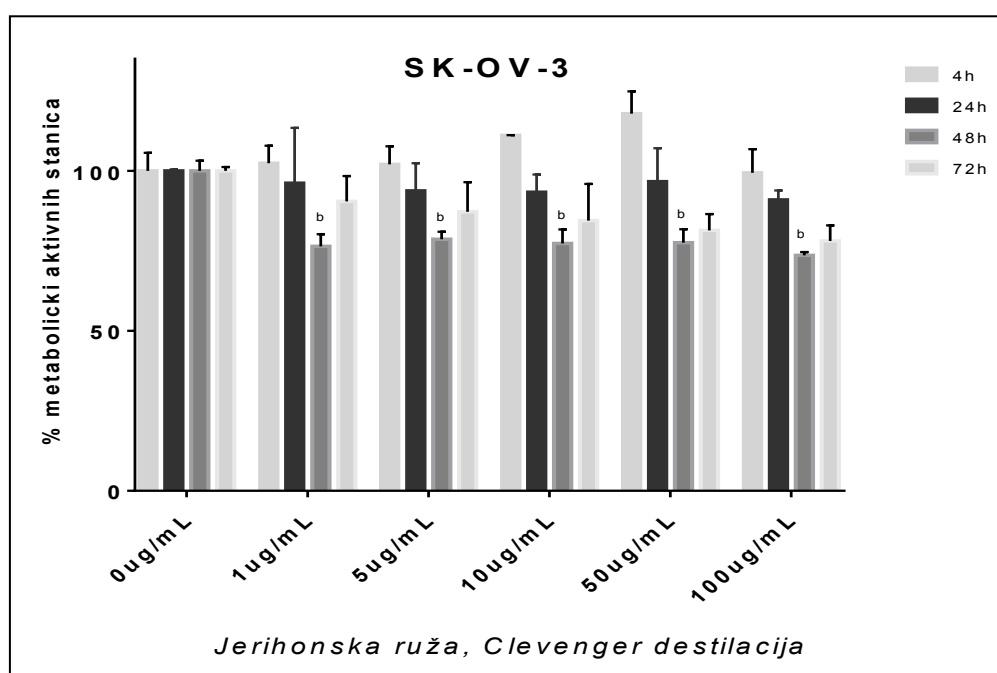
	4 h	24 h	48 h	72 h
IC 50 (µg/mL)	ND	ND	47,9	34,55

**Slika 15.** Citotoksična aktivnost ekstrakta prave jerihonske ruže, nadzemni dio (autoliza) (IC<sub>50</sub>=koncentracija ekstrakta koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- P <0,05, b- P <0,01, c- P <0,001)

Tretiranjem stanica raka ekstraktom prave jerihonske ruže dobivene autolizom zapažena je značajna citotoksična aktivnost. Pri najnižoj koncentraciji od 1 µg/mL uočena je najmanja, dok je pri većim koncentracijama od 5 i 10 µg/mL uočena veća citotoksična aktivnost, a osobito izražena nakon 48 i 72 sata.

Iako se zbog nedovoljne količine ekstrakt nije sa sigurnošću mogla utvrditi citotoksična aktivnost pri koncentraciji od 100 µg/mL nakon 48 i 72 sata, može se zaključiti da bi najbolji rezultat bio postignut tretiranjem stanica najvećim koncentracijama od 50 i 100 µg/mL nakon 48 i 72 sata. Može se zaključiti da se najbolja citotoksična aktivnost postiže pri najvećoj koncentraciji (100 µg/mL) u najdužem vremenskom intervalu (72 sata). IC50 vrijednost se nije mogla odrediti za vremenske intervale od 4 i 24 sata. IC50 nakon 48 sati iznosi 47,9 µg/mL, a nakon 72 sata 34,55 µg/mL (Slika 15).

#### 4.2.2. EKSTRAKT PRAVE JERIHONSKE RUŽE (CLEVINGER DESTILACIJA)

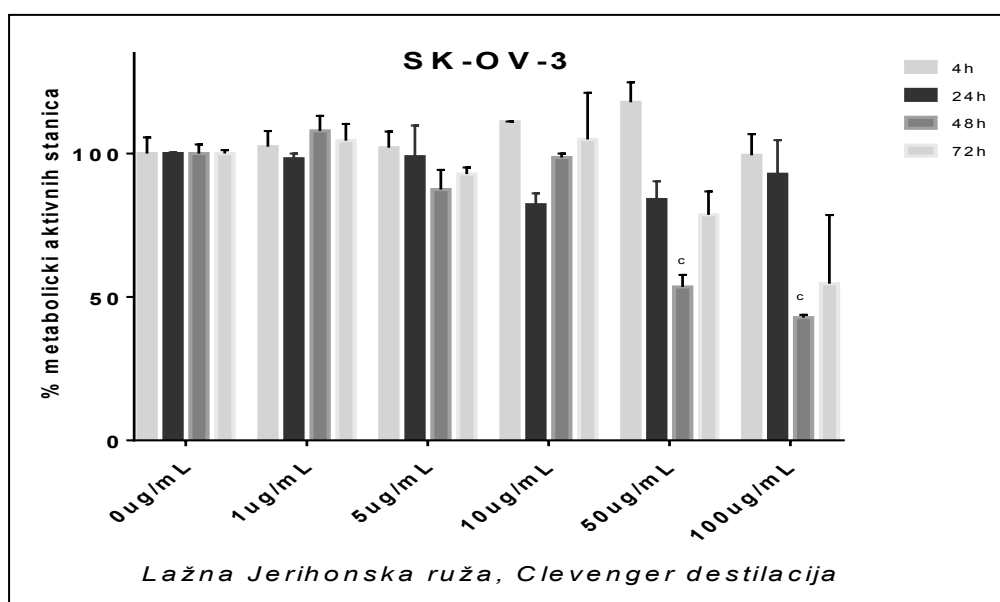


	4 h	24 h	48 h	72 h
IC 50 (µg/mL)	ND	ND	ND	ND

**Slika 16.** Citotoksična aktivnost ekstrakta prave jerihonske ruže (Clevenger destilacija) (IC50=koncentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a- P <0,05, b- P <0,01, c- P <0,001)

Značajna citotoksična aktivnost uočena je tretiranjem stanica raka jajnika ekstraktom u koncentracijama od 1, 5, 10, 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$ . Iako se citotoksično djelovanje očituje nakon 24, 48 i 72 sata, najizraženije je nakon 48 sati pri svim koncentracijama. To se može objasniti fenomenom da su stanice nakon 48 sati potrošile veći dio aktivnog citotoksičnog spoja pa se nakon izvjesnog intervala trebalo stanicama nadodati još ekstrakta kako bi se citotoksično djelovanje nastavilo povećavati. Može se primjetiti da citotoksična aktivnost doseže svoj vrhunac pri najnižoj koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$  nakon 48 sati te se ne uvećava povećanjem koncentracije. Niti jedna koncentracija u niti jednom vremenskom intervalu nije uzrokovala smanjenje broja živih stanica na 50 % pa se IC50 vrijednost nije mogla odrediti (Slika 16).

#### 4.2.3. EKSTRAKT LAŽNE JERIHONSKE RUŽE (CLEVENGER DESTILACIJA)



	4 h	24 h	48 h	72 h
IC 50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	ND	ND	71,01	ND

**Slika 17.** Citotoksična aktivnost ekstrakta lažne jerihonske ruže (Clevenger destilacija) (IC50=koncentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%, ND=ne može se odrediti, statistički značajna razlika: a-  $P < 0,05$ , b-  $P < 0,01$ , c-  $P < 0,001$ )

Ekstrakt lažne jerihonske ruže iskazuje citotoksično djelovanje u svim koncentracijama (1, 5, 10, 50 100 µg/mL) nakon 24, 48 i 72 sata. Najbolji rezultati postignuti su pri najvišim koncentracijama od 50 i 100 µg/mL u intervalu od 48 sati. To se može objasniti fenomenom da su stanice nakon 48 sati potrošile veći dio aktivnog citotoksičnog spoja pa se nakon izvjesnog intervala trebalo stanicama nadodati još ekstrakta kako bi se citotoksično djelovanje nastavilo povećavati. Pri koncentracijama od 1 i 10 µg/mL uočena je bolja citotoksična aktivnost nakon 24 sata nego nakon dužih intervala od 48 i 72 sata što se može objasniti već spomenutim fenomenom. IC50 vrijednost se nije mogla odrediti za vremenske intervale od 4, 24 i 72 sata. IC50 nakon 48 sati iznosi 71,01 µg/mL (Slika 17).



## **5. RASPRAVA**

Rak vrata maternice ili cerviksa je četvrti najčešći rak među ženskom svjetskom populacijom. Terapija zračenjem ili operacija općenito se koristi za tumor u ranoj fazi i pokazali su se jednako učinkoviti. Kemozračenje općenito se koristi za žene s većim tumorom, tumorom u uznapredovalom stadiju koji se nalazi samo u zdjelici te ako postoji visok rizik da se rak ponovno vrati ili ako se rak prošio (13).

Rak jajnika nalazi se na petom mjestu u broju smrtnih slučajeva od raka među ženama. Ovo je jedan od najsmrtonosnijih vrsta raka u žena (16). Liječenje se sastoji od nekoliko mogućih metoda: kirurškog odstranjivanja, kemoterapije, imunoterapije, ciljne terapije, hormonske terapije te njihovog kombiniranja.

Jerihonska ruža, također nazvana biljka uskršnuća, poznata je po svojoj sposobnosti da preživi isušivanje (26). To je pustinjska ljekovita biljka koja raste u raznim regijama diljem svijeta, posebno u arapskim zemljama, kao i u nekim azijskim, europskim i afričkim zemljama (27).

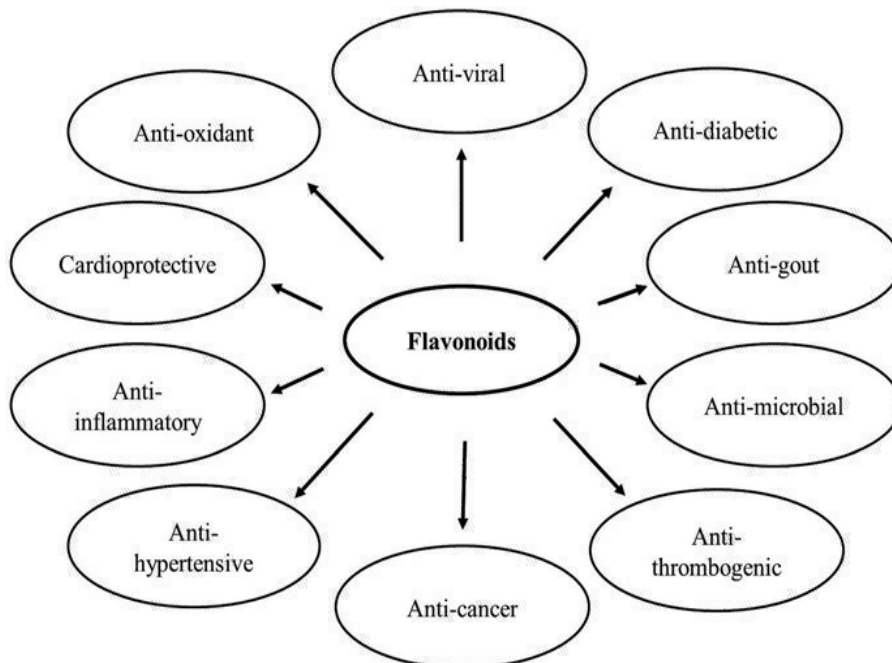
*A. hierochuntica* sadrži značajne količine minerala, kao što su Mg, Ca, Mn, Fe, Cu i Zn (29). Koristi se u liječenju astme, respiratornih bolesti, dizenterije, prehlade, groznice i glavobolje te u borbi protiv konjuktivitisa i steriliteta. Kemijski sastojci *A. hierochuntica* istraženi su zbog različitih farmakološki važnih svojstava uključujući antimikrobnu, protuupalnu, hipolipidemijsku, hipoglikemijsku, hepatoprotektivnu i gastroprotektivnu aktivnost (28).

Izotiocijanati, produkti hidrolize glukozinolatauslijed oštećenja biljnog tkiva, su fitokemikalije povoljnog terapijskog učinka. *In vitro* i *in vivo* istraživanja dokazala su njihov antitumorski učinak različitim mehanizmima djelovanja uključujući interakciju s proteinima uključenih u proces popravka DNK, inhibiranju staničnog ciklusa i indukciji apoptoze. Brojni proteini, kao što su enzimi biotransformacije prve i druge faze te nuklearni faktori, bivaju inducirani ili inhibirani te se posljedično ostvaruje određeni antitumorski učinak spomenutih spojeva. Značajan je i njihov protuupalni i antioksidativni potencijal različitim mehanizmima inhibicije određenih proupalnih citokina te indukcije citoprotektivnih proteina (40).

Flavonoidi su sekundarni metaboliti, a najčešće se nalaze u voću, začinskom bilju, stabljikama, žitaricama, orašastim plodovima, povrću, cvijeću i sjemenkama. Flavonoidi se intenzivno koriste kao antikancerogena, antimikrobna, antivirusna, antiangiogena, antimalarijska, antioksidativna, neuroprotektivna, antitumorska i antiproliferativna sredstva (Slika 18) (45).

Većina bioaktivnosti je povezana sa sposobnošću modulacije broja stanica uključenih u signalizacijsku kaskadu. Brojna randomizirano kontrolirana ispitivanja pokazala su povoljno djelovanje konzumacije flavonoida na kardiovaskularni sustav te na kontrolu glukoze. Ograničen broj opservacijskih ispitivanja ukazuju i na potencijalno antitumorsko djelovanje, pri čemu se smatra da povećan unos izoflavona iz soje može biti povezan sa smanjenim rizikom obolijevanja od karcinoma dojke kod postmenopauzalnih žena i karcinoma prostate kod muškaraca (54).

U prijašnjem istraživanju, etanolni i vodeni ekstrakti dijelova biljke *A. hierochuntica* (sjeme, stabljika, list) ispitani su na njihovu sposobnost inhibiranja proliferacije MCF-7 stanica karcinoma dojke. Izloženost stanica rastućim koncentracijama metanolnih i vodenih ekstrakata rezultirala je smanjenjem vitalnosti stanica na način ovisan o dozi. Ovi rezultati sugeriraju da liječenje *A. hierochuntica* može potisnuti napredovanje staničnog ciklusa smanjujući ekspresiju ciklina D1 i E i inducirati apoptozu preko p53 i p21. To bi moglo biti zbog bogatog izvora fenola i flavonoida za koje se naširoko navodi da su inhibitori ciklina (28).



**Slika 18.** Različiti mehanizmi djelovanja flavonoida

Preuzeto s: [https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-multifarious-biological-activities-of-flavonoids\\_fig1\\_333272825](https://www.researchgate.net/figure/Illustration-of-multifarious-biological-activities-of-flavonoids_fig1_333272825) Datum pristupa: 30.3.2022.

Porodica *Selaginellaceae* je uglavnom rasprostranjena u tropskim i toplim krajevima diljem svijeta. Gospodarski značaj uključuje uzgojno ukrasno bilje i lokalno ljekovito bilje (32).

Kemijsko istraživanje Selaginele rezultiralo je identifikacijom različitih novih spojeva kao što su flavonoidi, lignani, alkaloidi i terpenoidi, koji su pokazali širok raspon bioloških aktivnosti, uključujući antioksidativne, antidijabetičke, antikancerogene i antimikrobne učinke (31).

Lažna jerihonska ruža porijeklom je iz pustinje Chihuahuan u SAD-u i Meksiku i član je obitelji *Selaginellaceae* (26). Ovo je poikilohidrična biljka koja ima sposobnost preživjeti ekstremnu dehidraciju i uskrsnuti nakon dugog razdoblja bez vode (31). *Selaginella lepidophylla* pokazuje in vitro antimikrobno, antivirusno, antidijabetičko, antimutageno, protuupalno djelovanje te spazmolitički i antikancerogeni potencijal zbog visokog sadržaja različitih fitokemikalija kao što su flavonoidi, fenilpropanoidi, steroidi, pigmenti, kisikov heterocikl, lignani, kumarini, kvinoidi, kromoni, benzenoidi, ugljikohidrati i alkaloidi (33).

Biflavonoidi su sekundarni metaboliti, a svrstavaju se u flavonoide. Poznato je da biflavonoidi izolirani iz *S. tamariscina* pokazuju različite biološke aktivnosti koje uključuju protuupalno, antialergijsko, antitumorsko, antioksidativno, antidijabetičko, antivirusno i antikancerogeno djelovanje te osteogenezu (47). Pokazalo se da biflavonoid amentoflavon posjeduje zanimljiva svojstva, uključujući antioksidativno djelovanje, inhibiciju ciklooksigenaze, inducibilnu sintazu dušikovog oksida i fosfolipaze A2, te inhibiciju degranulacije i oslobađanja arahidoijske kiseline iz neutrofila (55).

U posljednjih pet godina, više od 10 selaginelina (novih pigmenata s jedinstvenim para-kinon metidom i alkinilfenol ugljičnim skeletom) izolirano je iz nekoliko vrsta Selaginele (49).

Citotoksične aktivnosti tri selaginelina: selaginelin O (1), selaginelin M (2) i selaginelin (3) procijenjene su pomoću stanica humanog karcinoma vrata maternice (HeLa). Primjetno je da su svi ovi selaginelini pokazali značajnu citotoksičnost. Selaginelin O (1), novi selaginelin s formilnom skupinom, pokazao je najveću inhibitornu aktivnost, s IC50 vrijednošću od 26,4  $\mu$ M (49).

Također, rezultatima prijašnjih istraživanja sa ekstraktima biljaka *S. labordei*, *Selaginella tamariscina* i *Selaginella uncinata* utvrđeno je njihovo antiproliferacijsko djelovanje na stanice Bel-7402 hepatocelularnog karcinoma i na stanice HeLa cervikalnog karcinoma. Ekstrakt vrste *Selaginella moellendorffii* pokazao je umjerenu antiproliferacijsku aktivnost na iste stanične linije. Dokazano je da je induciranje stanične apoptoze preko kaspaze-3 jedan od antitumorskih mehanizama (56).

U ovom istraživanju korišteni su ekstrakti nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobiveni različitim metodama; autolizom i Clevenger destilacijom i ekstrakt lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) dobiven Clevenger destilacijom. Ispitivan je njihov potencijalan citotoksičan učinak na stanične linije humanih tumora vrata maternice (SiHa) i jajnika (SK-OV-3). *In vitro* istraživanjem na obe stanične linije uočen je značajan utjecaj koncentracije ekstrakata i vremena inkubacije na citotoksičnu aktivnost, pri čemu su koncentracije od 50 i 100 µg/mL nakon 72 sata inkubacije najdjelotvornije u ostvarivanju citotoksičnog učinka.

Kod ekstrakta nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobivenog Clevenger destilacijom i ekstrakt lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) dobivenog Clevenger destilacijom uočena je najbolja citotoksična aktivnost na obe stanične linije nakon 48 sati što se objašnjava time da su stanice nakon izvjesnog razdoblja potrošile veći dio aktivnog citotoksičnog spoja.

Ukoliko bi se nakon 48 sati stanice tretirale dodatnom količinom ispitivanog ekstrakta, mogao bi se očekivati porast citotoksičnog odgovora nakon 72 sata. Na staničnoj liniji karcinoma jajnika (SK-OV-3) koja je tretirana ekstraktom nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobivenog Clevenger destilacijom uočen je vrhunac citotoksične aktivnosti pri najnižoj koncentraciji (1 µg/mL) nakon 48 sati i nije se uvećavao povećanjem koncentracije ekstrakta ni produženjem vremenskog intervala.

Tretiranjem staničnih linija je uočena značajna citotoksična aktivnost sva tri ekstrakta, ali se za ekstrakt nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobivenog Clevenger destilacijom nije mogla utvrditi IC50 (koncentracija ekstrakata koja inhibira rast stanica za 50%) za nijedan mjereni vremenski interval (4 h, 24 h, 48 h, 72 h). Različite metode dobivanja ekstrakta iz prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) odredile su razliku u njihovoj citotoksičnoj aktivnosti. Ekstrakt nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobiven autolizom i ekstrakt lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) dobiven Clevenger destilacijom pokazali su bolje citotoksično djelovanje.

Iako lažna jerihonska ruža (*Selaginella lepidophylla*) pripada drugačijoj biljnoj porodici od prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*), njezin ekstrakt je pokazao značajno citotoksično djelovanje na obe stanične linije. Već spomenuti biflavonoidi (amentoflavon) i pigmenti selaginelini mogli bi biti odgovorni za utvrđenu citotoksičnu aktivnost.

Ekstrakt nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobiven autolizom pokazao je najbolju citotoksičnu aktivnost kod obe stanične linije. To može biti produkt visoke koncentracije flavonoida i glukozinolata te njegovih produkata izotiocijanata.

*In vitro* ispitivanjem dobiveni rezultati pokazuju citotoksično djelovanje prave i lažne jerihonske ruže na stanične linije tumora vrata maternice i jajnika upotrebom različitih koncentracija njihovih ekstrakata kroz određeni period inkubacije, stoga je glavna hipoteza potvrđena te cilj ispitivanja ostvaren. Dokazana je i ovisnost citotoksične aktivnosti, odnosno postotak metabolički aktivnih stanica, o koncentraciji ispitivanih uzoraka i vremenu izlaganja. Iz svega navedenog vidljivo je da ispitivana biljka ima potencijal za daljnja biomedicinska ispitivanja u svrhu liječenja različitih bolesti, stoga su potrebna dodatna *in vitro* ispitivanja kojima bi se moglo potvrditi njeno citotoksično djelovanje i dovesti do razvoja novih antitumorskih lijekova.

## **6. ZAKLJUČAK**

- I. *In vitro* izlaganje stanica karcinoma vrata maternice (SiHa) i jajnika (SK-OV-3) ekstraktima nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobivenih različitim metodama; autolizom i Clevenger destilacijom i ekstraktom lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) dobivenog Clevenger destilacijom dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica, odnosno smanjuje se postotak metabolički aktivnih stanica.
- II. Ispitivani uzorci uglavnom pokazuju citotoksičan učinak ovisan o koncentraciji i vremenu inkubacije.
- III. U nekim slučajevima djelovanje određenih ekstrakata nije proporcionalno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije te dolazi do blagog porasta metabolički aktivnih stanica.
- IV. Djelovanje ispitivanih ekstrakata je slično na obe stanične linije. Kod svih ispitivanih ekstrakata je uočena citotoksična aktivnost na obje stanične linije.
- V. Na staničnoj liniji karcinoma jajnika (SK-OV-3) koja je tretirana ekstraktom nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobivenog Clevenger destilacijom uočen je vrhunac citotoksične aktivnosti pri najnižoj koncentraciji (1 µg/mL) nakon 48 sati i nije se uvećavao povećanjem koncentracije ekstrakta ni produženjem vremenskog intervala. Tretiranje SiHa stanične linije istim ekstraktom pokazuje najbolji citotoksični učinak pri najvećoj koncentraciji od 100 µg/mL nakon 48 sati.



- VI. Različite metode dobivanja ekstrakta iz prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) odredile su razliku u njihovoj citotoksičnoj aktivnosti. Ekstrakt nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobiven autolizom i ekstrakt lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) dobiven Clevenger destilacijom pokazali su bolje citotoksično djelovanje.
- VII. Ekstrakt nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobiven autolizom pokazao je najbolju citotoksičnu aktivnost kod obje stanične linije. Najbolja citotoksična aktivnost postignuta je pri najvećoj koncentraciji (100 µg/mL) u najdužem vremenskom intervalu (72 sata).
- VIII. Iako lažna jerihonska ruža (*Selaginella lepidophylla*) pripada drugačijoj biljnoj porodici od prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*), njezin ekstrakt je pokazao značajno citotoksično djelovanje na obe stanične linije. Najveće citotoksično djelovanje ovog ekstrakta uočeno je pri koncentraciji od 100 µg/mL u vremenskom intervalu od 48 sati.
- IX. Citotoksično djelovanje prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) i lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) je potvrđeno prema dobivenim rezultatima. Za daljnju analizu i potvrdu dobivenih rezultata potrebna su dodatna *in vitro* istraživanja, a potom i *in vivo* ispitivanja na životinjskim modelima.

## **7. LITERATURA**

1. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 149-152.
2. Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 634-635, 703, 726-732.
3. Vrdoljak E, Belac-Lovasović I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Biologija raka. U: Raič A, urednici. Klinička onkologija. 3., obnovljeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 3- 10.
4. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Novotvorine. U: Raič A, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017. str. 183-89.
5. <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/> Datum pristupa: 9.3.2022.
6. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>  
Datum pristupa: 10.3.2022.
7. <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/rak-vrata-maternice-epidemioloski-podaci/> Datum pristupa: 10.3.2022.
8. <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-symptoms.html> Datum pristupa: 10.3.2022.
9. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/ginekoloski-tumori/rak-vrata-maternice> Datum pristupa: 11.3.2022.
10. <https://www.cancer.net/cancer-types/cervical-cancer/stages> Datum pristupa: 11.3.2022.
11. <https://www.cancer.net/cancer-types/cervical-cancer/screening-and-prevention>  
Datum pristupa: 11.3.2022.
12. <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/rak-vrata-maternice-rak-kojeg-mozemo-sprijeciti/> Datum pristupa: 11.3.2022.
13. <https://www.cancer.net/cancer-types/cervical-cancer/types-treatment>  
Datum pristupa: 12.3.2022.
14. <https://necurak.hzjz.hr/za-zene/lijecenje-i-nakon-lijecenja-raka-vrata-maternice/>  
Datum pristupa: 12.3.2022.
15. <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/rak-jajnika/> Datum pristupa: 12.3.2022.
16. <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>  
Datum pristupa: 12.3.2022.
17. <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html> Datum pristupa: 13.3.2022.

18. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/ginekologija/ginekoloski-tumori/rak-jajnika> Datum pristupa: 13.3.2022.
19. <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html> Datum pristupa: 13.3.2022.
20. <https://www.cancer.net/cancer-types/ovarian-fallopian-tube-and-peritoneal-cancer/risk-factors-and-prevention> Datum pristupa: 17.3.2022.
21. <https://www.cancer.net/cancer-types/ovarian-fallopian-tube-and-peritoneal-cancer/types-treatment> Datum pristupa: 17.3.2022.
22. Al-Shehbaz I.A. (2012). A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*.61:931–954.
23. Warwick, S.I., Francis, A., Gugel, R.K. (2009). Guide to wild germplasm: *Brassica* and allied crops (tribe Brassiceae, Brassicaceae), 3rd ed (Ottawa, Canada: Agriculture Agri-Food Research).
24. <https://www.britannica.com/plant/celery-cabbage> Datum pristupa: 18.3.2022.
25. Ramirez D, Abellán-Victorio A, Beretta V, Camargo A, Moreno DA. Functional ingredients from Brassicaceae species: Overview and perspectives. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1998.
26. <https://www.britannica.com/plant/rose-of-Jericho> Datum pristupa: 18.3.2022.
27. Yusof J., Mahdy Z.A., Noor R.M. Use of complementary and alternative medicine in pregnancy and its impact on obstetric outcome. *Complement. Ther. Clin. Pract.*. 2016;25:155–163.
28. Saranya Rameshbabu, Safia A. Messaoudi, Zeyad Ibrahim Alehaideb, Mohammed Syed Ali, Anuradha Venktrmani sur. *Anastatica hierochuntica* (L.) methanolic and aqueous extracts exert antiproliferative effects through the induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Saudi Pharm J*.2020;28(8):985–993.
29. Karadaş C., Kara D. Chemometric approach to evaluate trace metal concentrations in some spices and herbs. *Food Chem*. 2012;130:196–202.
30. Yoshikawa M., Xu F., Morikawa T., Ninomiya K., Matsuda H. Anastatins A and B, new skeletal flavonoids with hepatoprotective activities from the desert plant *Anastatica hierochuntica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2003;13:1045–1049.
31. Bára Křížkovská, Rohitesh Kumar, Kateřina Řehořová, David Sýkora, Simona Dobiasová, Denisa Kučerová i sur. Comparison of Chemical Composition and Biological Activities of Eight *Selaginella* Species. *Pharmaceuticals* (Basel). 2021;14(1):16.

32. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/selaginellaceae> Datum pristupa: 21.3.2022.
33. Mohd Adnan, Arif Jamal Siddiqui, Walid Sabri Hamadou, Mitesh Patel, Syed Amir Ashraf, Arshad Jamal i sur. Phytochemistry, Bioactivities, Pharmacokinetics and Toxicity Prediction of *Selaginella repanda* with Its Anticancer Potential against Human Lung, Breast and Colorectal Carcinoma Cell Lines. *Molecules*. 2021;26(3):768.
34. Aguilar MI, Benítez WV, Colín A, Bye R, Ríos-Gómez R, Calzada F. Evaluation of the diuretic activity in two Mexican medicinal species *Selaginella nothohybrida* and *Selaginella lepidophylla* and its effects with ciclooxigenases inhibitors. *J Ethnopharmacol*. 2015;163:167–72.
35. Kapusta-Duch J, Kopeć A, Piatkowska E, Borczak B, Leszczyńska T. The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2012;63(4):389-95.
36. Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breed Sci*. 2014;64:48-59.
37. Manivannan A, Kim JH, Kim DS, Lee FS, Lee HF. Deciphering the nutraceutical potential of raphanus sativus-a comprehensive overview. *Nutrients*. 2019;11(2):402.
38. Brzović P. Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama *Lepidium* spp. (Brassicaceae) i *Moringa oleifera* (Moringaceae): diplomski rad [Diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017
39. Soundararajan P, Kim JS. Anti-Carcinogenic glucosinolates in cruciferous vegetables and their antagonistic effects on prevention of cancers. *Molecules*. 2018;23:2983.
40. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates>  
Datum pristupa: 22. 3. 2022.
41. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med*. 2012;18:337-47.
42. Cavell BE, Syed Alwi SS, Donlevy A, Packham G. Anti-angiogenic effects of dietary isothiocyanates: mechanisms of action and implications for human health. *Biochem Pharmacol*. 2011;81:327-336.
43. Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*. 2010;16:251-280.
44. Li S, Wu H, Tollefsbol TO. Combined broccoli sprouts and green tea polyphenols contribute to the prevention of estrogen receptor-negative mammary cancer via cell cycle arrest and inducing apoptosis in HER2/neu mice.. *J Nutr*. 2021;151:73-84.

45. Asad Ullah, Sidra Munir, Syed Lal Badshah, Noreen Khan, Lubna Ghani, Benjamin Gabriel Poulson i sur. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*. 2020;25(22):5243.
46. Sheng Yu, Hui Yan, Li Zhang, Mingqiu Shan, Peidong Chen, Anwei Ding i sur. A Review on the Phytochemistry, Pharmacology, and Pharmacokinetics of Amentoflavone, a Naturally-Occurring Biflavonoid. *Molecules*. 2017; 22(2):299.
47. Sun-Yup Shim, Seul-gi Lee, Mina Lee Biflavonoids Isolated from *Selaginella tamariscina* and Their Anti-Inflammatory Activities via ERK 1/2 Signaling. *Molecules*. 2018;23(4):926.
48. Kun-Ching Lee, Wei-Ting Chen, Yu-Chang Liu, Song-Sheilun. Amentoflavone Inhibits Hepatocellular Carcinoma Progression Through Blockage of ERK/NF- $\kappa$ B Activation. *In Vivo*. 2018;32(5):1097–1103.
49. Chao Yang, Yutian Shao, Kang Li, Wujiong Xia Bioactive selaginellins from *Selaginella tamariscina* (Beauv.). *Spring Beilstein J Org Chem*. 2012;8:1884–1889.
50. Kehinde Oluwakemi Fagbemi, Daniel Ayandiran Aina, Olufunmiso Olusola Olajuyigbe. Soxhlet Extraction versus Hydrodistillation Using the Clevenger Apparatus: A Comparative Study on the Extraction of a Volatile Compound from *Tamarindus indica* Seeds. *ScientificWorldJournal*. 2021;2021: 5961586.
51. Clevenger J.F. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm Assoc*. 1928;17:345–349.
52. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>  
Datum pristupa: 29.4.2022.
53. <https://www.wikiwand.com/sh/Krsta%C5%A1ice> Datum pristupa: 29.4.2022.
54. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>  
Datum pristupa: 29.4.2022.
55. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/biflavonoid> Datum pristupa: 29.4.2022.
56. Juan Li, Xiang Lei, Ke-li Chen Comparison of cytotoxic activities of extracts from *Selaginella* species. *Pharmacogn Mag*. 2014;10(40):529–535.

## **8. SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj istraživanja je ispitati potencijalno citotoksično djelovanje prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) i lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) na humanim stanicama karcinoma vrata maternice (SiHa) i jajnika (SK-OV-3). Pretpostavka je da će se broj stanica karcinoma, nakon tretiranja ekstraktima biljaka, smanjiti u odnosu na kontrolnu skupinu.

### **Materijali i metode:**

Citotoksičnost se ispitala MTT metodom kojom se određuje postotak metabolički aktivnih stanica nakon tretiranja ekstraktima nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobivenih različitim metodama; autolizom i Clevenger destilacijom i ekstraktom lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) dobivenog Clevenger destilacijom. Uzorci biljaka su pripremljeni u pet različitih koncentracija (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL), a učinak je gledan nakon 4, 24, 48 i 72 sata. Djelotvornost ekstrakata određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 570 nm.

### **Rezultati:**

Rezultati su prikazani grafički u odnosu postotka metabolički aktivnih stanica i vremena inkubacije.

Lažna jerihonska ruža (*Selaginella lepidophylla*), koja pripada drugačijoj biljnoj porodici od prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*), je neočekivano pokazala značajno citotoksično djelovanje na obje stanične linije. Najveće citotoksično djelovanje njenog ekstrakta na obje stanične linije uočeno je pri koncentraciji od 100 µg/mL u vremenskom intervalu od 48 sati.

Za SiHa liniju inhibitorna koncentracija IC<sub>50</sub> nakon 48 sati iznosi 54,33 µg/mL. Za SK-OV-3 liniju IC<sub>50</sub> vrijednost se mogla odrediti samo nakon 48 sati i iznosi 71,01 µg/mL. Može se zaključiti da je ekstrakt djelotvoran na obje stanične linije, ali ipak iskazuje bolju aktivnost na stanicama karcinoma vrata maternice (SiHa).



Na staničnoj liniji karcinoma jajnika (SK-OV-3), koja je tretirana ekstraktom nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobivenog Clevenger destilacijom, uočen je vrhunac citotoksične aktivnosti pri najnižoj koncentraciji (1 µg/mL) nakon 48 sati i nije se uvećavao povećanjem koncentracije ekstrakta ni produženjem vremenskog intervala. Tretiranje SiHa stanične linije istim ekstraktom pokazuje najbolji citotoksični učinak pri najvećoj koncentraciji od 100 µg/mL nakon 48 sati. Inhibitorna koncentracija IC<sub>50</sub> se nije mogla odrediti ni u jednom slučaju.

Ekstrakt nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobiven autolizom pokazao je najbolju citotoksičnu aktivnost na SiHa i SK-OV-3 staničnim linijama. Najbolja citotoksična aktivnost postignuta je pri najvećoj koncentraciji (100 µg/mL) u najdužem vremenskom intervalu (72 sata). Na SiHa staničnoj liniji inhibitorna koncentracija, IC<sub>50</sub>, nakon 72 sata iznosi 33,06 µg/mL. Na SK-OV-3 liniji IC<sub>50</sub> nakon 72 sata iznosi 34,55 µg/mL. Možemo zaključiti da je to značajna citotoksična aktivnost koja se gotovo podjednako iskazala na stanicama karcinom vrata maternice i jajnika.

### **Zaključci:**

*In vitro* izlaganje stanica karcinoma vrata maternice (SiHa) i jajnika (SK-OV-3) ekstraktima nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) i ekstraktom lažne jerihonske ruže (*Selaginella lepidophylla*) dovodi do smanjenja preživljenja tih stanica. Citotoksični učinak uglavnom je ovisan o vremenu inkubacije i koncentraciji. Djelovanje nije uvijek proporcionalno povećanju koncentracije i vremenu inkubacije, stoga u nekim slučajevima nakon određenog vremena dolazi do povećanja broja metabolički aktivnih stanica. Ekstrakt nadzemnog dijela prave jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*) dobiven autolizom pokazao je najbolju citotoksičnu aktivnost na obje stanične linije. Najbolja citotoksična aktivnost postignuta je pri najvećoj koncentraciji (100 µg/mL) u najdužem vremenskom intervalu (72 sata). Potencijalan citotoksičan učinak prave i lažne jerihonske ruže na stanične linije humanih karcinoma, ujedno i hipoteza ovog istraživanja, je potvrđen. Potrebna su daljnja *in vivo* ispitivanja kako bi se potvrdilo djelovanje i na životinjskim modelima.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:**

The antiproliferative action of The True Rose of Jericho (*Anastatica hierochuntica*) and The False Rose of Jericho (*Selaginella lepidophylla*) on human cancer cell lines measured by MTT method.

**Objectives:**

The aim of the research was to examine the potential cytotoxic effects of *Anastatica hierochuntica* and *Selaginella lepidophylla* on human cervical cancer cells (SiHa) and ovarian cancer cells (SK-OV-3). It is assumed that the number of cancer cells, after treatment with extracts got by different methods of isolation of the plants, will decrease, compared to the control group.

**Materials and methods:**

Cytotoxicity was examined by the MTT method, which determines the percentage of metabolically active cells after treatment with extracts of the aboveground part of The True Rose of Jericho (*Anastatica hierochuntica*) got by different methods of isolation; by autolysis and Clevenger distillation and extract of The False Rose of Jericho (*Selaginella lepidophylla*) got by Clevenger distillation. Plant samples were prepared in five different concentrations (1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL), and the effect was observed after 4, 24, 48 and 72 hours. The efficiency of the extracts was determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 570 nm.

**Results:**

The results are graphically presented in relation to the percentage of metabolically active cells and the incubation time.

The False Rose of Jericho (*Selaginella lepidophylla*), which belongs to a different plant family than The True Rose of Jericho (*Anastatica hierochuntica*), unexpectedly showed significant cytotoxic effects on both cell lines. The greatest cytotoxic effect of its extract on both cell lines was observed at a concentration of 100 µg/mL in a time interval of 48 hours. For the SiHa line, the inhibitory concentration IC<sub>50</sub> after 48 hours was 54.33 µg/mL.

For the SK-OV-3 line, the IC<sub>50</sub> value could only be determined after 48 hours and is 71.01 µg/mL. It can be concluded that the extract is effective on both cell lines, but still shows better activity on cervical cancer cells (SiHa).

At the ovarian cancer cell line (SK-OV-3) treated with the extract of the aboveground part of The True Rose of Jericho (*Anastatica hierochuntica*) got by Clevenger distillation, the peak of cytotoxic activity was observed at the lowest concentration (1 µg/mL) after 48 hours and did not increase with increasing extract concentrations or prolongation of the time interval. Treatment of the SiHa cell line with the same extract showed the best cytotoxic effect at a maximum concentration of 100 µg/mL after 48 hours. The inhibitory concentration IC<sub>50</sub> could not be determined in either case.

Autolysis extract of the aboveground part of The True Rose of Jericho (*Anastatica hierochuntica*) got by autolysis showed the best cytotoxic activity on SiHa and SK-OV-3 cell lines. The best cytotoxic activity was achieved at the highest concentration (100 µg/mL) in the longest time interval (72 hours). At the SiHa cell line, the inhibitory concentration IC<sub>50</sub> after 72 hours was 33.06 µg/mL. On the SK-OV-3 line the IC<sub>50</sub> after 72 hours is 34.55 µg/mL. We can conclude that this is a significant cytotoxic activity that was almost equally manifested in cervical and ovarian cancer cells.

## **Conclusions:**

*In vitro* exposure of cervical cancer cells (SiHa) and ovarian cancer (SK-OV-3) to the extracts of the aboveground part of The True Rose of Jericho (*Anastatica hierochuntica*) and extract of The False Rose of Jericho (*Selaginella lepidophylla*) leads to reduced survival of these cells. The cytotoxic effect is mainly dependent on incubation time and concentration. The effect is not always proportional to the increase in concentration and incubation time, so in some cases there is an increase in the number of metabolically active cells after a certain time. An autolysis extract of the aboveground part of The True Rose of Jericho (*Anastatica hierochuntica*) obtained by autolysis showed the best cytotoxic activity on both cell lines. The best cytotoxic activity was achieved at the highest concentration (100 µg/mL) in the longest time interval (72 hours). The potential cytotoxic effect of The True and The False Roses of Jericho on human cancer cell lines, as well as the hypothesis of this study, has been confirmed. Further *in vivo* studies are needed to confirm the effects in animal models as well.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Helena Marić

**Datum rođenja:**20.8.1997.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:**Sveti Martin 159, 21 312 Podstrana, Republika Hrvatska

**E-mail:**[helenamaric10020@gmail.com](mailto:helenamaric10020@gmail.com)

## **OBRAZOVANJE:**

•2012. – 2016. V. gimnazija “Vladimir Nazor“, Split

•2016. - 2022. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

## **RADNO ISKUSTVO:**

•Ožujak, 2021. – Rujan, 2021. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Bačvice

## **AKTIVNOSTI:**

•Član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA)

## **POSEBNE VJEŠTINE:**

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

**Vozačka dozvola:** B kategorija

**Strani jezici:** engleski jezik, španjolski jezik, talijanski jezik