
LEK. SIROV.	God. XXXV	Broj 35.	Str. 103 – 111	Beograd 2015.
LEK. SIROV.	Vol. XXXV	No. 35.	Pp. 103 – 111	Belgrade 2015.

Originalni naučni rad – Original scientific paper *Rukopis primljen: 21.5.2015.*
UDC: 615.322:582; 615.277 *Prihvaćen za publikovanje: 26.5.2015.*
COBISS.SR-ID 220247052

**NE-TUMOR/TUMOR IC₅₀ ODNOS KAO PARAMETAR ZA PROCENU
ANTITUMORSKE *IN VITRO* AKTIVNOSTI VRSTA RODOVA
*PLANTAGO, ALLIUM I TUBER***

Dragana Četojević-Simin¹, Ivana Beara², Nataša Simin²

¹ Institut za onkologiju Vojvodine, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Dr Golmana 4, 21204 Sremska Kamenica, Srbija

² Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Srbija

IZVOD

Cilj ovog rada bilo je uvođenje parametra za preciznu procenu efikasnosti *in vitro* antitumorske aktivnosti ekstrakata vrsta *Plantago altissima*, *P. lanceolata*, *P. reniformis*, *Allium flavum*, *A. cepa*, *Tuber aestivum* i *T. magnatum*. Za određivanje uticaja ekstrakata na rast ćelija korišćene su humane tumorske ćelijske linije HeLa, MCF7 i HT-29, kao i linija humanih zdravih ćelija MRC-5. Intenzitet ćelijskog rasta određen je merenjem ukupne količine proteina kolorimetrijskim sulforodamin B (SRB) testom. Prema NT/T IC₅₀ parametru najveću efikasnost u antitumorskom delovanju pokazali vodeni ekstrakti crnog i belog tartufa prema adenokarcinomu dojke sa izuzetno visokim vrednostima NT/T odnosa (NT/T=200-500). Efikasnost određenih matanolnih ekstrakata tartufa je bila visoka (NT/T=21,33-70): dok je efikasnost ekstrakata svih vrsta roda *Plantago* bila umerena (NT/T=3,24-4,27) prema adenokarcinomu dojke i karcinomu grlića materice. Najmanje efikasni bili su ekstrakti nadzemnog dela *A. flavum* ispoljili snažnije citotoksično delovanje prema zdravim ćelijama nego prema adenokarcinomu debelog creva (NT/T=0,23) i karcinomu cerviksa (NT/T=0,75). Veoma visoke NT/T vrednosti koje su dobijeni delovanjem vodenih ekstrakata crnog i belog tartufa preporučuju njihovu upotrebu u antitumorskoj terapiji, u proizvodnji nutraceutika i suplemenata u ishrani.

Ključne reči: Antitumorska aktivnost, *in vitro*, prirodni proizvodi, *Plantagosp.*, *Allium sp.*, *Tuber sp.*

UVOD

Prirodni proizvodi su priznati u farmaceutskoj industriji po velikoj strukturnoj raznolikosti i širokom opsegu farmakološkog dejstva [1]. U objavljenim bazama podataka prirodnih proizvoda prisutno je oko 40% hemijskih struktura koje su nepoznate sintetskoj hemiji [2]. Ranijim istraživanjima aktivnih komponenti biljaka i mikroorganizama otkrivena su mnoga korisna organska jedinjenja kao što su aspirin, penicilin i taxol [3]. Od ukupnog broja odobrenih lekova, 80% antibiotika i antitumorskih lekova je izvedeno iz prirodnih proizvoda [2] dok je približno 30% antitumorskih agensa dobijeno iz prirodnih proizvoda ili su njihovi derivati [4]. Ispitivanje ekstrakata prirodnih proizvoda je efektan metod za identifikaciju organizama koji proizvode potencijalno korisne supstance. Ukupni doprinos prirodnih proizvoda u terapiji različitih oboljenja je veliki i oni će sigurno i u budućnosti biti izvor kompleksnih hemijskih jedinjenja.

Allium flavum je vrsta divljeg luka koja je karakteristična za južnu, centralnu i istočnu Evropu [5]. Karakteriše ga blaži ukus i miris od tradicionalnog crnog luka *Allium cepa*. U regionu Balkana koristi se kao začin i povće [6]. *Plantago altissima* i *P. lanceolata* su široko zastupljene vrste bokvice koje se tradicionalno koriste u narodnoj medicini i ishrani [7], dok je *P. reniformis* endemična vrsta za područje jugoistočne Evrope i nalazi se u Srbiji, Crnoj Gori, Bosni i Hercegovini, Grčkoj i Albaniji [8]. *Tuber aestivum* se nalazi širom Evrope, sa izuzetkom severa Skandinavije i Baltičkih zemalja [9], dok je prisustvo *T. magnatum* zabeleženo u Italiji, Hrvatskoj i Mađarskoj [10]. U Srbiji je dokazano prisustvo dvanaest vrsta tartufa uključujući i vrste *T. aestivum* i *T. magnatum* [11].

Cilj ovog rada bilo je uvođenje parametra za preciznu procenu *in vitro* efikasnosti antitumorske aktivnih komponenti vrsta *Plantago altissima*, *P. lanceolata*, *P. reniformis*, *Allium flavum*, *A. cepa*, *Tuber aestivum* i *T. magnatum*.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal

Biljni materijal korišćen za istraživanja u ovom radu, sakupljen je 2009. godine na području Republike Srbije sa lokaliteta Vršački breg, Dimitrovgrad i Babušnica (*Allium flavum* L.): sela Neradin, Fruška Gora (*Allium cepa* L.): sa lokaliteta Novi Sad (*Plantago altissima* L.) i Fruška Gora (*Plantago lanceolata* L.). Biljni material vrste *Plantago reniformis* G. Beck sakupljen je sa lokaliteta Visitor, Republika Crna Gora. Materijal je uzet sa originalnih staništa u fenofazi cvetanja, determinisan i deponovan u herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Republika Srbija (BUNS Herbarium).

Plodonosna tela jestivih gljiva vrsta *Tuber aestivum* Vittad. i *Tuber magnatum* Pico sakupljena su u zapadnom delu Republike Srbije uz pomoć dresiranih pasa i identifikovana upotrebom odgovarajućih taksonomskih ključeva [9, 12].

Priprema ekstrakata

Odmerena masa osušenog i samlevenog biljnog materijala macerirana je 70% ili 80% (v/v) metanolom (~8 mL MeOH po 1 g mase) utoku 72 časa na sobnoj temperaturi uz mućkanje. Fino isečena plodonosna tela tartufa ekstrahovana su maceracijom vodom ili 80% (v/v) metanolom u toku 72 h i Soxhlet ekstrakcijom vodom ili 80% (v/v) metanolom u toku 5h (~10 mL ekstragensa po 1 g mase) na sobnoj temperaturi uz mućkanje. Nakon ceđenja preko Büchner-ovog levka ekstrakti su upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturama manjim od 45 °C da bi se izbegla degradacija termolabilnih prirodnih proizvoda, a zatim dodatno sušeni u vakuum-eksikatoru, na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

Suvi ostatak je zatim rastvoren u DMSO, pri čemu su napravljeni i osnovni rastvori koncentracije 100-300 mg mL⁻¹, koji su korišćeni za ispitivanje antiproliferativne aktivnosti. Svi ekstrakti, razblaženi su 9 mgmL⁻¹ NaCl do željenih koncentracija i sterilisani filtracijom kroz 0,22 µm membranske mikrofiltre (Sartorius, Germany).

Kulture ćelijskih linija

Za određivanje uticaja ekstrakata na rast ćelija korišćene su humane tumorske ćelijske linije HeLa (epitelni karcinom cerviksa, ECACC93021013): MCF7 (adenokarcinom dojke, ECACC 86012803): HT-29 (adenokarcinom debelog creva, ECACC 91072201): kao i linija humanih zdravih ćelija MRC-5 (fetalni fibroblasti pluća, ECACC84101801). Ćelije su gajene u DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) medijumu sa dodatkom 100 µLmL⁻¹ FBS, 100 µgmL⁻¹ streptomicina i 100 IUmL⁻¹ penicilina, u flaskovima od 25 cm² u (Corning, New York, USA): na 37 °C u atmosferi od 95 % vazduha i 5 % CO₂ pri visokoj relativnoj vlažnosti. Ćelije su presađivane dva puta nedeljno upotrebom 1 mg mL⁻¹ tripsina sa 0.4 mgmL⁻¹ EDTA i tretirane u logaritamskoj fazi rasta.

Suspenzije ćelija, gustine 3–5×10³ ćelija po otvoru, u 180 µL DMEM medijuma sa 50 mg mL⁻¹ FBS dodate su u mikrotitar ploče sa 96 otvora (Sarstedt, Newton, USA) i preinkubirane 24 h na 37 °C. U svaki otvor dodato je po 20 µL ekstrakta (serija duplih razblaženja u 9 mg mL⁻¹ NaCl) do postizanja željene finalne koncentracije (0,0039-1 mgmL⁻¹). U kontrole je umesto uzorka dodavana ekvivalentna zapremina rastvarača. Koncentracija DMSO u ćelijskoj kulturi bila je ≤ 5 µL mL⁻¹. Posle dodavanja uzoraka, ploče su inkubirane 48 h na 37 °C, što je adekvatno vremenu od 2–3 generacije ćelija u kontroli. Svi tretmani su ispitani u osam ponavljanja (n=8).

Sulforodamin B (SRB) TEST

Intenzitet ćelijskog rasta određen je merenjem ukupne količine proteina kolorimetrijskim sulforodamin B (SRB) testom [13]. Sulforodamin B je fluorescentna anjonska boja koja se u blago kiselj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina dajući izrazito stabilne konjugate koji fluoresciraju jarko crveno. Nakon vezivanja proteina i ispiranja viška boje, dodatkom slabe baze (TRIS) SRB se kvantitativno ekstrahuje iz ćelije i određuje ćelijski rast.

Ćelije u mikrotitar pločama su fiksirane 0,5 gmL⁻¹ trihlorsirćetnom kiselinom (TCA) u toku 1 h na 4 °C, isprane automatski četiri puta (Wellwash 4, Lab systems; Helsinki, Finland) destilovanom vodom i osušene. Nakon toga su bojene 4 mg mL⁻¹ SRB u 10 mL L⁻¹ sirćetnoj kiselini (75 µL/otvoru) u toku 30 min na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim isprane automatski četiri puta 10 mL L⁻¹ sirćetnom kiselinom da bi se uklonio višak boje. SRB boja je ekstrahovana iz ćelija dodatkom 10 mmol L⁻¹ tris [hidroksimetil] amino metanom (TRIS) (200 µL / otvoru).

Određivanje anti proliferativne aktivnosti, IC₅₀ vrednosti i NT/T odnosa

Absorbanca dobijenog rastvora merena je na 540 nm (specifična talasna dužina za SRB) i 620 nm (referentna talasna dužina za uklanjanje apsorbance pozadine) pomoću fotometra (Multiscan Ascent, Labsystems; Helsinki, Finland). Efekat inhibicije ćelijskog rasta (anti proliferativna aktivnost) je izražen kao procenat od kontrole i računat prema formuli

$$K_{[\%]} = (A_u/A_k) \times 100$$

gde su K procenat od kontrole, A_u absorbanca uzorka, A_k absorbanca kontrole. IC₅₀ vrednost (koncentracija ekstrakta/standarda pri kojoj inhibicija ćelijskog rasta iznosi 50 %) očitana je iz krivih zavisnosti ćelijskog rasta od finalne koncentracije ekstrakta dobijenih polinomskom regresionom analizom (software ORIGIN 8.0, OriginLab, USA). Ne-tumor/tumor odnos je izračunat za svaki ekstrakt korišćenjem IC₅₀ vrednosti dobijenih za ne-tumorsku i tumorsku ćelijsku liniju prema formuli NT/T = IC₅₀ ne-tumorske ćelijske linije/ IC₅₀ tumorske ćelijske linije. Vrednosti NT/T iznad 1 odgovaraju većoj inhibiciji rasta tumorske ćelijske linije u odnosu na ćelijsku liniju izvedenu od zdravog tkiva [14].

REZULTATI I DISKUSIJA

Antiproliferativni efekat pojedinih ekstrakata ispitivanih vrsta bio je najizraženiji prema ćelijama adenocarcinoma dojke (MCF7) i gliča materice (HeLa) (IC₅₀=0,002-0,10 mg/ml): dok je prema adenokarcinomu debelog creva većinom bio umeren (IC₅₀=0,40-0,59 mg/ml) (Tabela 1).

Tabela 1. Antitumorska *in vitro* aktivnost vrsta rodova *Plantago*, *Allium* i *Tuber*
Table 1. *In vitro* antitumor activity of *Plantago*, *Allium* and *Tuber* species

Vrsta	Postupak ekstrakcije Ekstragens	Deo biljke Ekstrakt	IC ₅₀ (mg/ml)						Referenca	NT/T* HeLa	NT/T* MCF7	NT/T* HI-T29	
			HeLa	MCF7	HI-T29	MRC-5	MCF7	HI-T29					
<i>Plantago altissima</i>	80% metanol	Nadzemni deo	0,26	0,25	0,51	0,92	3,54	3,68	2,3	(16)	3,24	3,94	1,38
<i>Plantago lanceolata</i>			0,17	0,14	0,40	0,55	1,75	4,27	0,77				
<i>Plantago reniformis</i>			0,44	0,18	>1	0,77	1,57	1,1	1,38				
<i>Allium flavum</i>	70% metanol	Cela biljka	0,07	0,10	0,08	0,11	0,75	1,5	0,23	(18)	>1,39	1	1
<i>Allium cepa</i>		Nadzemni deo	0,04	0,02	0,13	0,03	>33,34	>500	1				
		Cela biljka	0,72	>1	>1	>1	1	>200	1				
<i>Tuber aestivum</i> - Crnitaruf	Maceracija/voda	WM	0,03	0,002	>1	>1	32	21,33	1,18	(19)	52	26	1,04
	Soxhlet/ voda	WS	>1	0,005	>1	>1	1	>333,34	1				
	Maceracija/metanol	MM	0,02	0,03	0,54	0,64	1	>333,34	1				
<i>Tuber magnatum</i> - Belitaruf	Soxhlet/metanol	MS	0,01	0,02	0,50	0,52	1,10	0,93	0,93	0,82	70	1,07	
	Maceracija/voda	WM	>1	0,003	>1	>1	0,82	70	1,07				
	Soxhlet/ voda	WS	>1	0,003	>1	>1	0,82	70	1,07				
	Maceracija/metanol	MM	0,38	0,45	0,46	0,42	0,82	70	1,07				
	Soxhlet/metanol	MS	0,77	0,009	0,59	0,63	0,82	70	1,07				

*Ne-tumor/tumor IC₅₀odnos

Najveću *in vitro* antitumorsku aktivnost prema adenokarcinomu dojke pokazali su vodeni ekstrakti WM crnog (*T. aestivum*) i WM i WS belog tartufa (*T. magnatum*) koji su dostigli IC_{50} vrednosti pri izuzetno niskim koncentracijama ($IC_{50}=0,002-0,005$ mg/ml) koje su u nivou aktivnosti citotoksičnih lekova. Izuzetnu antitumorsku aktivnost pokazali su i ekstrakti cele biljke i nadzemnih delova vrste *Allium flavum* prema svim ispitanim ćelijskim linijama ($IC_{50}=0,02-0,11$ mg/ml). Ekstrakt gajene vrste *Allium cepa* pokazao je značajno nižu *in vitro* antitumorsku aktivnost ($IC_{50}\geq 0,72$ mg/ml) od samonikle vrste *A. flavum*. Ekstrakt vrste *A. cepa* pokazao je i nižu antiinflamatornu aktivnost u odnosu na *A. flavum*, dok im je antioksidativna aktivnost bila uporediva [15]. Navedene razlike u aktivnosti mogu se pripisati velikom broju biološki aktivnih jedinjenja koja se po pravilu nalaze kod samoniklih vrsta, što ih i čini izuzetno atraktivnim kandidatima za dobijanje novih lekova, nutraceutika i suplemenata u ishrani. Kod vrste *A. flavum* dokazano je prisustvo velikog broja fenolnih kiselina i drugih fenola, koji su najverovatnije nosioci njihove visoke *in vitro* antitumorske aktivnosti [15].

Međutim, iako su ekstrakti vrste *Allium flavum* jedini pokazali značajno antiproliferativno delovanje prema ćelijama adenocarcinoma debelog creva (HT-29): njihovo delovanje je bilo izuzetno citotoksično ($IC_{50}=0,03-0,11$) i prema ćelijskoj liniji izvedenoj od zdravog tkiva (MRC-5). Sa druge strane vodeni ekstrakti crnog i belog tartufa pored izuzetnog antitumorskog delovanja prema ćelijama adenocarcinoma dojke i karcinoma grlića materice nisu pokazali citotoksično delovanje prema ćelijama zdravog tkiva u ispitivanom opsegu koncentracija ($IC_{50}>1$).

Parametar IC_{50} ima značajnu ulogu u definisanju aktivnosti smešai supstanci i poređenju njihove aktivnosti [19]. Međutim, uvođenjem NT/T IC_{50} parametra dobija se precizan podatak o efikasnosti ispitivanih ekstrakata prilikom delovanja na tumorsko i zdravo tkivo jer vrednosti NT/T iznad 1 odgovaraju većoj inhibiciji rasta tumorske ćelijske linije u odnosu na ćelijsku liniju izvedenu od zdravog tkiva. Tako su prema ovom parametru najveću efikasnost u antitumorskom delovanju pokazali vodeni ekstrakti crnog i belog tartufa prema adenokarcinomu dojke sa izuzetno visokim vrednostima NT/T odnosa (NT/T=200-500). Efikasnost određenih matanolnih ekstrakata tartufa je bila visoka (NT/T=21,33-70): dok je efikasnost svih vrsta roda *Plantago* bila umerena (3,24-4,27) prema adenokarcinomu dojke i karcinomu grlića materice. Najmanje efikasni ekstrakti imali su vrednosti niže od 1, jer su ekstrakti nadzemnog dela *A. flavum* ispoljili snažnije citotoksično delovanje prema zdravim ćelijama nego prema adenokarcinomu debelog creva (NT/T=0,23) i karcinomu cerviksa (NT/T=0,75).

ZAKLJUČAK

Uvođenjem NT/T IC₅₀ parametra dobija se precizan podatak o efikasnosti *in vitro* antitumorskog delovanja ispitivanih ekstrakata prilikom delovanja na tumorsko i zdravo tkivo. Efikasnost vodenih ekstrakata crnog i belog tartufa prema adenokarcinomu dojke bila je izuzetno visoka. Efikasnost određenih matanolnih ekstrakata tartufa je bila visoka, dok je efikasnost svih vrsta roda *Plantago* bila umerena prema adenokarcinomu dojke i karcinomu grlića materice. Najmanje efikasni su bili ekstrakti nadzemnog dela *A. flavum* koji su ispoljili snažnije citotoksično delovanje prema zdravim ćelijama nego prema adenokarcinomu debelog creva i karcinomu cerviksa.

Veoma visoki ne-tumor/tumor IC₅₀ odnosi koji su dobijeni delovanjem vodenih ekstrakata crnog i belog tartufa preporučuju njihovu upotrebu u antitumorskoj terapiji, u proizvodnji nutraceutika i suplemenata u ishrani.

ZAHVALNICA

Rad predstavlja deo rezultata istraživanja u okviru Projekta OI 172058, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

1. R.W. Strohl (2000): The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, **2**:39-41.
2. A. Harvey (2000): Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products, *Drug Discovery Today*, **7**: 294-300.
3. A.M. Burja, B. Banaigs, E. Abou-Mansour, J.G. Burgess and P.C. Wright (2001): Marine cyanobacteria- a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, **57**: 9347-9377.
4. G.M. Cragg, D.J. Newman, R.B. Weiss (1997): Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Semin Oncol*, **24**:156.
5. G. Anackov (2009): Taxonomy and chorology of genus *Allium* L. 1754 (Amaryllidales, Alliaceae) in Serbia. University of Novi Sad.
6. Lj.Grljic (1986): Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb: August Cesarec.

7. N. Rønsted, H.Franzyk, P. Mølgaard, J. W. Jaroszewski, S. R. Jensen (2003): Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Systematics and Evolution*, **242**: 63-82.
8. S. Redžić (2006): Wild edible plants and their traditional use in the human nutrition in Bosnia–Herzegovina, *Ecology of Food and Nutrition*, **45**: 189–232.
9. A. Ceruti, A. Fontana, C. Nosenzo (2003): *Le Specie Europee del genere Tuber - Una Revisione Storica*. Torino: Museo Regionale de Scienze Naturali.
10. I. R. Hall, G. T. Brown, A. Zambonelli (2007): *Taming the truffle: The history, lore, and science of the ultimate mushroom*. Portland: Timber Press.
11. Ž. Marjanović, T. Grebenc, M. Marković, A. Glišić, M. Milenković (2010): Ecological specificities and molecular diversity of truffles (genus *Tuber*) originating from mid-west of the Balkan Peninsula. *Sydowia*, **62**: 67–87.
12. A. Montecchi & M. Sarasini (2000): *Funghi ipogei d'Europa*. Trento–Vicenza: Associazione Micologi ca Bresadola – Fondazione centro Studi Micologici.
13. P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, **82**: 1107–1112.
14. D.D. Četojević-Simin, A.S. Velićanski, D.D. Cvetković, S.L. Markov, G.S. Četković, Tumbas V.T. Šaponjac, J.J. Vulić, J.M. Čanadanović-Brune, S.M. Djilas (2015): Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chemistry*, **166**: 407–413.
15. N. Simin, D. Orcic, D. Cetojevic-Simin, N. Mimica-Dukic, G. Anackov, I. Beara, D. Mitic-Culafic, B. Bozin (2013): Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). *LWT - Food Science and Technology*, **54**(1): 139-146.
16. D. D. Četojević-Simin, S.J. Armačić, D.V. Šojić, B.F. Abramović (2013): Toxicity assessment of metoprolol and its photodegradation mixtures obtained by using different type of TiO₂ catalysts in the mammalian cell lines. *Science of the Total Environment*, **463-464**: 968-974.

**NON-TUMOR/TUMOR IC₅₀ RATIO AS PARAMETER FOR
EVALUATION OF *IN VITRO* ANTITUMOR ACTIVITY
OF THE *PLANTAGO*, *ALLIUM* AND *TUBER* SPECIES**

Dragana Četojević-Simin¹, Ivana Beara², Nataša Simin²

¹Oncology Institute of Vojvodina, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Dr Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, Serbia.

²Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia.

SUMMARY

The goal of this work was to introduce the parameter for the precise evaluation of *in vitro* anti-tumor activity of *Plantago altissima*, *P. lanceolata*, *P. reniformis*, *Allium flavum*, *A. cepa*, *Tuber aestivum* i *T. magnatum* extracts. For the evaluation of the cell growth human tumor cell lines HeLa, MCF7 and HT-29 were used, as well as cell line derived from the healthy tissue (MRC-5). The cell growth was evaluated using colorimetric sulforhodamine B (SRB) assay. NT/T IC₅₀ parameter gives precise information on the *in vitro* anti-tumor efficiency of evaluated extracts. The highest efficiency was achieved using water extracts of black and white truffle towards breast adenocarcinoma, reaching extremely high NT/T values (NT/T=200-500). The efficiency of several methanolic extracts of truffles was high (NT/T=21,33-70): while the efficiency of all *Plantago sp.* extracts was moderate (NT/T=3,24-4,27) towards breast adenocarcinoma and cervix carcinoma. The least efficient were extracts of aerial parts of *A. flavum* that have been more cytotoxic towards healthy cells than to colon adenocarcinoma (NT/T=0,23) and cervix carcinoma (NT/T=0,75). Extremely high NT/T values that were obtained using water extracts of black and white truffle recommend their use in the anti-tumor therapy and suggest their use in health prevention and in the production of nutraceuticals and food supplements.

Key words: Anti-tumor activity, *in vitro*, natural products, *Plantago sp.*, *Allium sp.*, *Tuber sp.*