

Effect of bilberries paste on experimental malignant tumor growth

*С.П.Залеток, С.Б.Осипенко, О.А.Орловський, О.В.Карнаушенко,
А.В.Вербіненко, О.О.Кленов, С.В.Гоголь*

¹*R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS
Ukraine, Kyiv;*

²*НВПІІ “Інститут “ТЕКМАШ”, м. Херсон*

В останній час спостерігається зростання кількості досліджень щодо протипухлинних властивостей сполук рослинного походження, зокрема таких як поліфеноли зеленого чаю і червоного винограду, сої та ін. Було виявлено суттєвий антиканцерогенний та протипухлинний ефекти біофлавоноїдів зеленого чаю, резвератролу червоного винограду, геністеїну і даїдзеїну сої та досліджені молекулярні механізми їх протипухлинної дії. Зокрема нами було показано, що екстракт зеленого чаю та продукти з сої суттєво гальмують ріст перещеплених пухлин [1 – 4] та досліджено деякі молекулярні механізми їх дії [5, 6].

До рослин, що містять широкий спектр біологічно-активних речовин, належить і чорниця (*Vaccinium myrtillus L.*). Плоди чорниці звичайної містять вуглеводи (глюкозу, сахарозу, фруктозу, пектини), органічні кислоти (лимонну, молочну, яблучну, янтарну, щавелеву), вітаміни (А, В, С, РР), флавоноїди (гіперин, кверцетин, астрагалін), антоціани (дельфінідин, мальвідин, ідаїн, міртилін), феноли, мінеральні речовини макро- та мікроелементи (залізо, марганець, селен, кобальт, мідь, золото, срібло, цинк), багато дубильних речовин, рутину. Завдяки цьому плоди чорниці мають антиоксидантні, антисептичні, в'язучі, протизапальні, сечогінні, жовчогінні, спазмолітичні, гіпоглікемічні властивості. Чорницю широко використовують в народній медицині. Про її цілющі властивості знали ще кілька тисячоліть тому в Китаї, Єгипті, Греції, Римі.

Плоди та листя чорниці здавна використовують при проносах, кровотечах, анемії, гастриті, гепатиті, набряках, гіпертонічній хворобі, атеросклерозі, ревматизмі, артриті, подагрі, псоріазі, цукровому діабеті, анемії, лейкозі, ангіні, бронхіті, циститі, уретриті, шлункових і кишкових коліках, захворюваннях очей, цукровому діабеті і інших патологіях.

В літературі також є повідомлення про протипухлинні властивості чорниці та біофлавоноїдів, що входять до її складу. Так, показано, що включення до дієти експериментальних тварин птеростилбену, біофлавоноїда з плодів чорниці пригнічують β -catenin/p65 downstream сигнальні шляхи і канцерогенез кишкового у щурів [7]. Подібні дані були отримані і на мишах. Mutanen M. et al; Cooke D. et al. показали, що freeze-dried чорниця і суміш антоціанів з чорниці знижують частоту утворення інтестинальних аденом у *Apc(Min)* мишей (генетична модель сімейного аденоматозного поліпозу людини) [8, 9]. На думку авторів цих досліджень, отримані результати свідчать, що чорниця та її складові можуть стати новим ефективним засобом профілактики раку кишкового – одного з найбільш поширених онкологічних захворювань. *Thomasset S. et al.* проведено пілотні дослідження щодо впливу споживання міртоціану, антоціан-збагаченого екстракту чорниці, на проліферацію пухлинних клітин у пацієнтів з колоректальним раком (критерієм слугувала експресія Ki-67). Авторами було виявлено, що споживання міртоціану на протязі 7 діб перед проведенням операції призводить до зниження проліферації пухлинних клітин [10].

Дослідженнями інших авторів було показано, що екстракт з чорниці пригнічує ріст клітин лейкемії. Так, при вивченні дії екстракту чорниці на ріст лінії HL60 клітин лейкемії людини *in vitro*, Katsube N. *I in.* виявили, що екстракт чорниц пригнічує ріст HL60 клітин шляхом індукції апоптозу [11].

Ashutosh K. et al. виявлено, що урсолова кислота (один з компонентів чорниці) пригнічує як конститутивну, так і інтерлейкін-індуковану активацію STAT3 в клітинах multiple myeloma, пригнічення залежало від дози та тривалості дії урсолової кислоти. Урсолова кислота down-регулює експресію продуктів генів, що регулюються STAT3, наприклад, таких як циклін D1, Bcl-2, Bcl-xL, сурвівін, Mcl-1, і VEGF. Урсолова кислота пригнічує також проліферацію і індукує апоптоз і акумуляцію клітин в G1-G0 фазі клітинного циклу. На думку авторів, ці результати свідчать про те, що урсолова кислота є новим блокатором активації STAT3 і, потенціально, може мати значення для профілактики і лікування множинної мієломної хвороби і інших видів ракових пухлин [12]. На думку *Shishir Shishodia i in.*, механізмами антиканцерогенної та протипухлинної дії урсолової кислоти можуть також бути пригнічення активації фактора транскрипції NF- κ B (який

відіграє важливу роль при канцерогенезі та пухлинному рості) і зниження експресії NF-κB- залежних генів, що беруть участь в процесах проліферації. В своїх дослідженнях ці автори показали, що урсолова кислота пригнічує активацію NF-κB (p50/p65) та його зв'язування з ДНК [13].

Було також продемонстровано, що антоціан- збагачена суміш, екстрагована з чорниці та винограду пригнічують кіназну активність рецептора тирозин кінази в карциномі вульви людини і в клітинах ендотелію аорти свині [14].

Метою нашої роботи було дослідити вплив чорничної пасти (*нового вітчизняного продукту, виготовленого за допомогою розробленої співробітниками НВПІ “Інститут “ТЕКМАШ” оригінальної новітньої вітчизняної технології та обладнання [15, 16, 17, 18, 19]*) на ріст перещеплених пухлин (карцинома Герена, резистентна до дії цисплатину, карцинома легені Льюїс (3LL), лімфолейкоз L1210 і карцинома Ерліха) у експериментальних тварин та вплив чорничної пасти на канцеролітичну активність сироватки крові.

Матеріали та методи

Попередній скринінг продукту. З метою з'ясування перспективності застосування чорничної пасти у складі спеціалізованих дієт для профілактики онкологічних захворювань, досліджували вплив споживання чорничної пасти на канцеролітичну активність сироватки крові здорових тварин (мишей та щурів). Дослідження проводили за розробленими нами методами [20, 21].

Штами пухлин та тварини. Для дослідження використовували штами перещеплюваних експериментальних пухлин двох видів тварин (щурів та мишей) і різного органного та гістологічного походження, а саме:

- *карциному Герена* щурів, яка походить зі спонтанної карциноми матки, але її ріст не залежить від естрогенів, тому пухлини однаково успішно перещеплюються самцям і самицям нелінійних щурів; пухлини перещеплювали, вводячи підшкірно по 0,5 мл 30%-ної суспензії дрібних шматочків пухлинної тканини на тварину; в дослідах використовували нелінійних самиць з середньою масою тіла 170г.

- *карциному легені Льюїс* (синоніми – LLC, 3LL) мишей лінії C57Bl/6; для дослідів використовували самців з середньою масою тіла 17г; пухлини перещеплювали, вводячи у м'яз гомілки 5×10^5 пухлинних клітин в 0.2 мл ізотонічного розчину; суспензію пухлинних клітин для перещеплення одержували без трипсинізації, шляхом прочавлювання пухлинної тканини через тонку металеву сітку з подальшим фільтруванням через нейлонову сітку;
- *карциному Ерліха мишей*, яка походить зі спонтанної карциноми молочної залози, але за багато десятиріч перещеплення втратила майже всі ознаки гістологічної диференціації, включно аж до основних антигенів тканинної сумісності (H2-антигенів), завдяки чому однаково успішно перещеплюється самцям та самицям мишей практично будь-якої лінії або нелінійним і здатна рости в асцитній формі при перещепленні в черевну порожнину; для дослідів використовували нелінійних самців з середньою масою тіла 33г; пухлини перещеплювали, вводячи в черевну порожнину 3×10^5 пухлинних клітин;
- *лімфолейкоз L1210* мишей лінії DBA2 (перещеплюється мишам будь-якої статі лінії DBA2 або гібридам F1 (C57Bl/6 \times DBA2) (скорочене позначення - BDF1); для дослідів використовували самиць лінії DBA2; пухлини перещеплювали, вводячи в черевну порожнину 2×10^5 пухлинних клітин.

Годівля тварин. Кормову суміш готували, додаючи чорничну пасту до подрібненого стандартного комбікорму в пропорції 1,7 г пасти на 80 г комбікорму. Такою сумішшю тварин дослідних груп годували в терапевтичному режимі, тобто з моменту перещеплення пухлин до забою або загибелі тварин. Тварини контрольних груп споживали лише стандартний комбікорм.

Критерії оцінки впливу та статистична обробка результатів Результати повномасштабних онкологічних дослідів з солідними пухлинами (карциномою Герена та карциномою Льюїс) оцінювали за динамікою об'єму пухлин, середньою масою пухлин на момент забою тварин та середньою тривалістю життя (СТЖ) тварин після перещеплення пухлин (останнє – в тих групах тварин, де забій не проводили). В дослідях з асцитними пухлинами (карциномою Ерліха та лімфолейкозом L1210) замість середнього об'єму та маси пухлин застосовували критерій середньої кількості пухлинних клітин на тварину. Кількість пухлинних

клітин підраховували після їх вимивання з черевної порожнини ізотонічним розчином натрію хлориду. Статистичну обробку результатів проводили за t-критерієм Ст'юдента.

Результати та обговорення

Прескринінгові досліді

Вплив споживання чорничної пасти на канцеролітичну активність сироватки крові експериментальних тварин. Результати дослідження канцеролітичної активності сироваток крові здорових тварин наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив споживання чорничної пасти на канцеролітичну активність сироватки крові здорових тварин.

Вид, лінія та група тварин	Канцеролітичний індекс, % до контролю
Щурі нелінійні, контроль; (n=5)	Умовний нуль \pm 5
Щурі нелінійні, дослід (+ чорнична паста); (n=5)	+19 \pm 4*
Миші C57Bl/6, контроль; (n=7)	Умовний нуль \pm 3
Миші C57Bl/6, дослід (+ чорнична паста); (n=7)	+55 \pm 9*

* – *Difference between control and experimental group is significant (P<0.05).*

Як видно з таблиці, годівля тварин комбікормом з додаванням чорничної пасти в обох дослідіх призводила до значного підвищення канцеролітичного індексу, причому для мишей це підвищення було напрочуд великим (такі величини канцеролітичного індексу нам вдавалося одержувати лише тричі впродовж 13-річної

практики роботи з цією реакцією). Це дало змогу зробити безсумнівний висновок, що випробувана чорнична паста є дуже перспективним продуктом для подальших онкологічних досліджень. Цей попередній висновок було в подальшому підтверджено результатами повномасштабних онкологічних експериментів.

Онкологічні експерименти

Вплив споживання чорничної пасти на ріст карциноми Герена у щурів.

Додавання чорничної пасти до кормового раціону експериментальних тварин з перещепленою *карциномою Герена* призводить до значного гальмування росту пухлин, про що свідчать як дані щодо динаміки росту пухлин (рис.1), так і дані щодо маси видалених (в кінці експерименту) пухлин у досліджуваних тварин (таблиця 2). Індекс гальмування росту карциноми Герена при споживанні тваринами чорничної пасти становив 49,2 %.

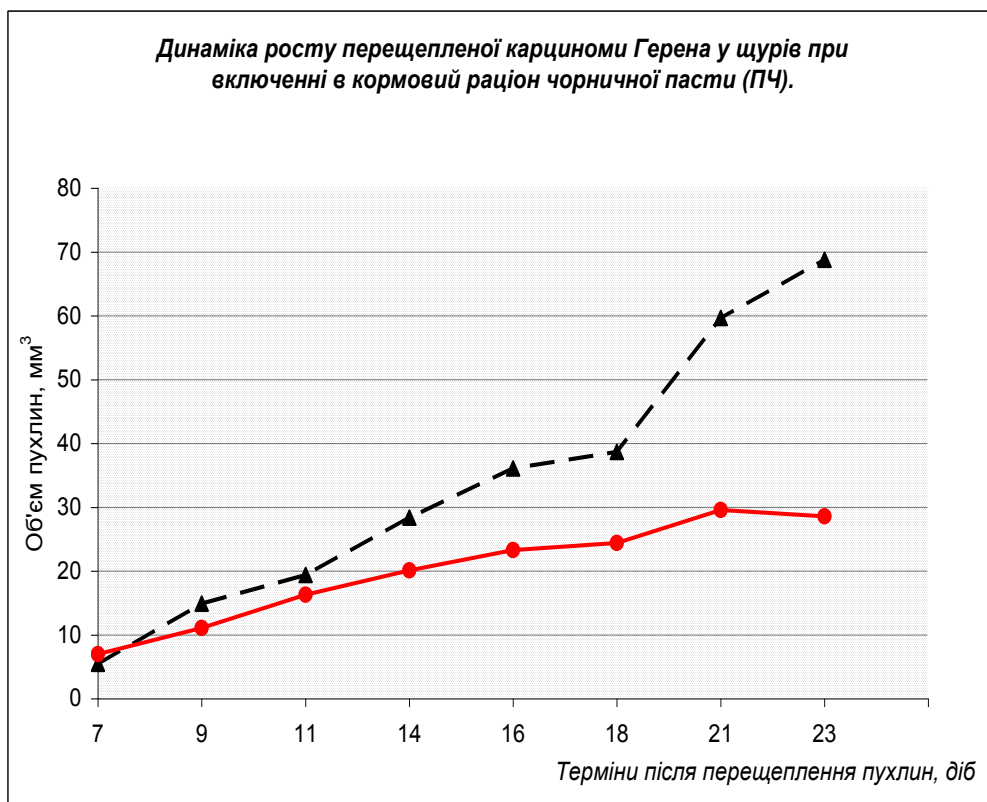


Рис. 1. Динаміка росту перещепленої карциноми Герена у щурів при включенні в кормовий раціон тварин чорничної пасти (чорна крива – об'єми пухлин у тварин, що споживали стандартний комбікорм ($n = 11$); червона крива - об'єми

пухлин у тварин, яким додавали до стандартного комбікорму чорничну пасту; $n = 10$).

Таблиця 2

Вплив споживання чорничної пасти на ріст перещепленої карциноми Герена у щурів.

Група тварин	Середня маса пухлин (г, $M \pm m$)
Контроль ($n = 11$)	35.8 ± 6.9
Тварини, що споживали чорничну пасту ($n = 10$)	$18.2 \pm 7.1^{**}$

** – $0.05 < P < 0,1$

Вплив споживання чорничної пасти на розвиток карциноми легені Льюїс у мишей та виживаність досліджуваних тварин.

При дослідженні впливу споживання чорничної пасти на ріст *карциноми легені Льюїс* у мишей було виявлено, що додавання до кормового раціону чорничної пасти також призводить до гальмування росту пухлин, але ступінь гальмування росту була менша, порівняно з такою у тварин з карциномою Герена (Рис. 2). Разом з тим, середня тривалість життя тварин з перещепленою карциномою Льюїс, які споживали чорничну пасту суттєво збільшувалась, порівняно з тривалістю життя тварин, які перебували на стандартному кормовому раціоні (таблиця 3).

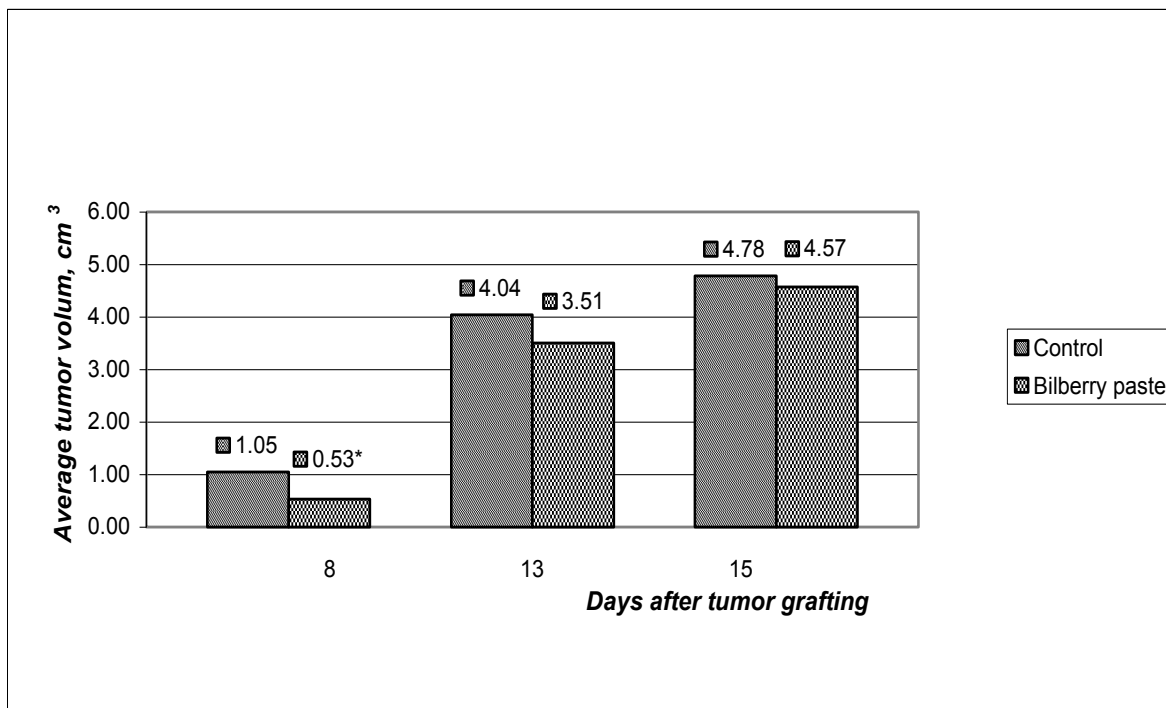


Рис. 2. Вплив споживання чорничної пасти на ріст перещепленої карциноми легені Льюїс у мишей (контрольні тварини; $n = 10$; тварини, яким додавали до стандартного комбікорму чорничну пасту; $n = 10$). * – різниця між контрольною та дослідною групами статистично значуща ($P < 0,05$).

Таблиця 3

Вплив споживання чорничної пасти на виживаність мишей з карциномою Льюїс; $M \pm m$.

Група тварин	Середня тривалість життя, діб
Контрольні тварини; $n = 13$	19.1 ± 1.0
Тварини, які споживали стандартний комбікорм + чорнична паста; $n = 10$	$23,3 \pm 1.2^*$

* - різниця між контрольною та дослідною групами статистично значуща ($P < 0,02$).

Таким чином, хоча середній об'єм пухлин у тварин з карциномою Льюїс, які споживали чорничну пасту, був достовірно меншим, ніж у контрольній групі, лише на ранніх стадіях пухлинного росту, все ж СТЖ тварин з карциномою Льюїс, які споживали чорничну пасту збільшилась на 4,2 доби (або на 22% порівняно з контрольними тваринами).

Вплив споживання чорничної пасти на виживаність мишей з перещепленим лімфолейкозом L1210. При дослідженні впливу споживання

чорничної пасти на виживаність мишей з перещепленим *лімфолейкозом L1210* було виявлено хоч і невелике, але високодостовірне ($P < 0,001$) збільшення середньої тривалості досліджуваних тварин (таблиця 4).

Таблиця 4

Вплив споживання чорничної пасти на виживаність мишей з лімфолейкозом L1210; $M \pm m$.

Група тварин	Середня тривалість життя, діб
Контрольні тварини; $n = 21$	$9,0 \pm 0.1$
Дослідні тварини; $n = 17$	$9,9 \pm 0.1^*$

* - різниця між контрольною та дослідною групами статистично значуща ($P < 0,001$).

Вплив споживання чорничної пасти на виживаність мишей з перещепленою карциномою Ерліха.

При дослідженні впливу споживання чорничної пасти на ріст *асцитної карциноми Ерліха* у мишей було виявлено, що у тварин, які споживали з стандартним комбікормом чорничну пасту, кількість пухлинних клітин в асцитній рідині була меншою (на 12,9%), ніж у контрольних тварин з карциномою Ерліха, яким до стандартного комбікорму чорничної пасти не додавали (Рис. 4). Також у тварин, які споживали чорничну пасту було виявлено деяке зменшення об'єму асцитної рідини, в порівнянні з контрольними тваринами (3,6 мл і 4,0 мл, відповідно). За статистичною достовірністю, ці ефекти знаходилися на рівні вираженої тенденції ($0,05 < P < 0,1$).

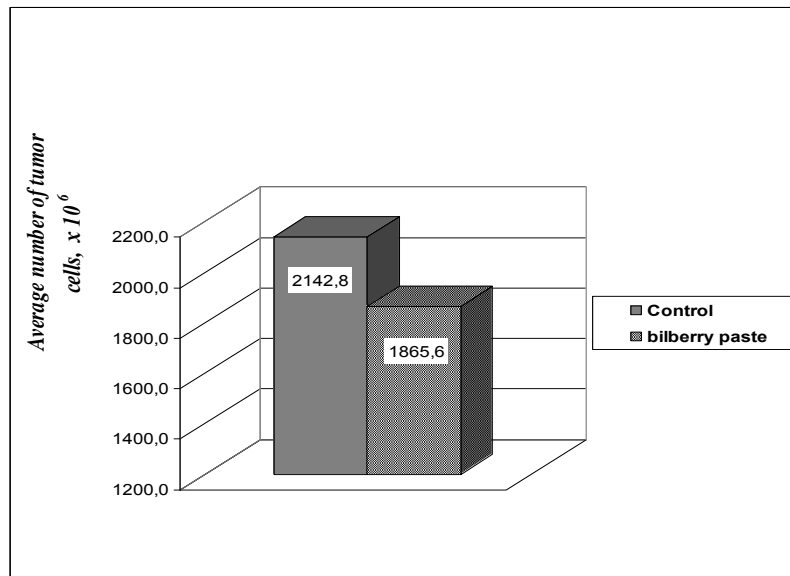


Рис. 3. Вплив споживання чорничної пасти на ріст асцитної карциноми Ерліха у мишей (контрольні тварини; $n = 10$; тварини, яким до стандартного комбікорму додавали чорничну пасту; $n = 10$).

Таким чином, дані проведеної роботи свідчать про перспективність подальшого дослідження чорничної пасти з метою її застосування для профілактики раку та використання у лікувальному харчуванні онкологічних хворих.

References

1. *Zaletok S.P., Orlovsky O.A., Gogol S.V., Samoilenko O.O., Gulua L., Kvesitadze G.I.* Effect of plant bioconcentrates based on Georgian tea per se and in combination with Cisplatin on growth of rat Walker W-256 carcinosarcoma and Guerin's carcinoma //Lik. sprava (Vrach. Delo). – 2006. – N8. – P.89-93 (in Ukr.).
2. *Zaletok S.P., Orlovsky O.A., Gogol S.V., Klenov O.A., Samoilenko O.A., Anysimova Yu.M., Borovsky V.R., Chekhun V.F.* Effect of a soybean product on growth of grafted tumors in rats //Lik. sprava (Vrach. Delo). – 2006. – N7. – P. 48-55 (in Ukr.).
3. *Zaletok S.P., Gulua L.K., Orlovsky A.A., Samoilenko E.A., Klenov O.A., Chehun V.F., Mchedishvily N., Omyadze N., Aboutidze M., Houtsidze T.* Study of green tea extract effect on on growth of grafted tumors, on hematologic and biochemical parameters of tumor-bearing animals // Subtropicheskiye culturey. – 2008. – N1. – C.256-258 (in Russ.).
4. *Klenov O.A., Zaletok S.P., Orlovsky A.A., Gogol S.V., Burlaka D.P.* Перспективи застосування соєвих продуктів у лікувальному харчуванні онкологічних хворих //Oncologiya. – 2009. – Vol.11, N3. – P.232-236.
5. *Glavin O.A., P.M.Mikhailenko, S.P.Zaletok, L.Gulua.* Effects of biocomposites from green tea and black tea on endogenous synthesis, metabolism and genotoxic effects of carcinogenic N-nitrosodimethylamine //Exp. Oncol. – 2008. – Vol.30, N4. – P.306-314.
6. *Zaletok S.P. I, Orlovsky A.A.I, Gogol S.V.I, Samoilenko E.A.I, Klenov O.A.I, Malitska I.V.I, Gulua L.* Influence of plant polyphenols on metabolism of polyamines and expression of proteins, products of some oncogenes in experimental tumors //Укр. журнал клін. і лаб. медицини. – 2009. – Vol.4, N3. – P.96-101.
7. *Paul S., Decastro A., Lee H.J., Smolarek A.K., So J.Y., Simi B., Wang C.X., Zhou R., Rimando A.M., Suh N.* Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the {beta}-catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats //Carcinogenesis. 2010 Jan 8.
8. *Mutanen M., Pajari A.M., Paivarinta E., Misikangas M., Rajakangas J., Marttinen M., Oikarinen S.* Berries as chemopreventive dietary constituents--a mechanistic

- approach with the ApcMin/+ mouse //Asia Pac. J. Clin. Nutr. – 2008. – Vol.17, Suppl. 1. – P.123-5.
9. *Cooke D., Schwarz M., Boocock D., Winterhalter P., Steward WP., Gescher A.J., Marczylo T.H.* Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis--relationship with tissue anthocyanin levels //Int. J. Cancer. –2006. – Vol.119, N9. – P.2213-20.
 10. *Thomasset S., Berry D.P., Cai H., West K., Marczylo T.H., Marsden D., Brown K., Dennison A., Garcea G., Miller A., Hemingway D., Steward W.P., Gescher A.J.* Pilot study of oral anthocyanins for colorectal cancer chemoprevention //Cancer Prev. Res. (Phila Pa). – 2009. – Vol.2, N7. – P. 625-33.
 11. *Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K., Kobori M.* Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins //J.Agric. Food Chem. –2003. – Vol.51, N1. – P.68-75.
 12. *Ashutosh K. Pathak, Manisha Bhutani, Asha S. Nair, Kwang Seok Ahn, Arup Chakraborty, Humam Kadara, Sushovan Guha, Gautam Sethi and Bharat B. Aggarwal.* Ursolic Acid Inhibits STAT3 Activation Pathway Leading to Suppression of Proliferation and Chemosensitization of Human Multiple Myeloma Cells //Mol. Cancer Res. – 2007. – Vol.5, N9. – P. 943–55.
 13. *Shishir Shishodia, Sekhar Majumdar, Sanjeev Banerjee and Bharat B. Aggarwal.* Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor-B Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of IKK Kinase and p65 Phosphorylation. Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D11 //Cancer Res. – 2003. – Vol. 63. – P.4375-4383.
 14. *Teller N., Thiele W., Marczylo T.H., Gescher A.J., Boettler U., Sleeman J., Marko D.* Suppression of the kinase activity of receptor tyrosine kinases by anthocyanin-rich mixtures extracted from bilberries and grapes //J. Agric. Food Chem. – 2009. – Vol.57, N8. – P.3094-101.
 15. **Осипенко С.Б. «Способ диспергирования семян растений и устройство для его осуществления». США. Американский ПАТЕНТ № US 7,428,797 В2 от 30.09.2008г. Приоритет от 23.12.2002 в Украине № 2002120436.**

16. Осипенко С.Б. «Способ диспергирования семян растений и устройство для его осуществления». Приоритет от 23.12.2002 в Украине № 2002120436. Канада. Заявка № 2511744 с датой международной подачи 18.12.2003.
17. Осипенко С.Б. «Способ диспергирования семян растений и устройство для его осуществления». Евразийский патент №007199. Приоритет от 23.12.2002 в Украине № 200500843.
18. Осипенко С.Б. « Жидкая черника, способ и устройство для ее получения ». Временная американская заявка № 61289415. Приоритет с 23.12.2009.
19. www.tekmash.ca
20. Orlovsky O.A., Chekhun V.F. Cancerolys-reaction-using method for integral evaluation of non-specific resistance of an organism as to malignant tumors. – Pat. of Ukraine No 45210. – privilege 26.10.2009. – Bul. № 20/2009.
21. Orlovsky O.A., Zaletok S.P., Klenov O.O., Samoilenko O.A., Chekhun V.F. A method to screen the foods for their anti-tumor activity. – Application for a patent of Ukraine. – privilege 02.11.2009.