

Katarzyna Chojnacka<sup>1</sup>, Katarzyna Owczarek<sup>1</sup>, Miłosz Caban<sup>1</sup>, Jakub Fichna<sup>1</sup>,  
Dorota Sosnowska<sup>2</sup>, Małgorzata Redzyna<sup>2</sup>, \*Urszula Lewandowska<sup>1</sup>

## Wpływ ekstraktów z liści kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) na wzrost ludzkich komórek jelita

### The impact of extracts from cranberrybush leaves (*Viburnum opulus* L.) on the growth of human colon cells

<sup>1</sup>Zakład Biochemii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna

<sup>2</sup>Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. inż. Stanisław Bielecki

---

#### SUMMARY

**Introduction.** Cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) is a plant rich in phenols. Chlorogenic acid is a main compound responsible for its antioxidant activity. This plant also has antibacterial and anti-inflammatory properties, for this reason it is used for prevention, as well as for the treatment of many diseases, mainly those of the genitourinary tract, but also of the heart or lungs. So far, there are few studies that suggest *V. opulus* has anti-cancer activity and could become a supplement in such therapies.

**Aim.** The aim of the study was to assess and compare the effect of both leaf extract (ELK) and phenol-rich leaf extract from cranberrybush (FELK) on the growth of colon cancer and normal colon cells.

**Material and methods.** The HPLC method allowed to estimate the chemical composition of ELK and FELK. In addition, two colon cancer cell lines HT29 and SW480 were used, as well as normal epithelial cells CCD841CoN. The cells were treated with various concentrations of *V. opulus* extracts. The cell viability was assessed by MTT test after 24 h, 48 h and 72 h, respectively.

**Results.** ELK and FELK-extracts had moderate effect on the inhibition of HT29 cell growth. The cell viability of SW480 was much more pronounced after ELK and FELK treatment. The FELK extract inhibited the growth of HT29 and SW480 more significantly compared to ELK. The growth of CCD841CoN cells was higher after FELK treatment than ELK.

**Conclusions.** The purified leaf extract of *V. opulus* (FELK) was richer in phenolic compounds than the unpurified ELK, more significantly inhibited the growth of HT29 and SW480 colon cancer cells as well as had a more gentle influence on the growth of normal epithelial CCD841CoN colon cells.

---

**Keywords:** *Viburnum opulus*, phenol-rich extracts, colon cancer cells, MTT

---

#### STRESZCZENIE

**Wstęp.** Kalina koralowa (*Viburnum opulus* L.) jest rośliną bogatą w związki fenolowe. Za jej przeciwutleniające działanie odpowiedzialny jest głównie kwas chlorogenowy. Roślina ta wykazuje również właściwości przeciwbakteryjne oraz przeciwzapalne, dzięki temu jest wykorzystywana w zapobieganiu, a także w leczeniu wielu chorób, głównie układu moczowo-płciowego, ale również serca i płuc. Jest niewiele badań, które sugerują, iż *V. opulus* posiada działanie przeciwnowotworowe i mogłaby stać się uzupełnieniem tego typu terapii.

**Cel pracy.** Celem badań była ocena i porównanie wpływu ekstraktu z liści kaliny (ELK) oraz fenolowego ekstraktu z liści kaliny (FELK) na wzrost nowotworowych i prawidłowych komórek jelita.

**Materiał i metody.** Metoda HPLC pozwoliła na ocenę składu chemicznego ELK i FELK. Ponadto wykorzystano dwie linie komórkowe raka jelita grubego HT29 i SW480, a także prawidłowe komórki nabłonkowe CCD841CoN. Komórki traktowane były różnymi stężeniami ekstraktów z *V. opulus*. Przy zastosowaniu testu MTT oceniano żywotność komórek odpowiednio po 24, 48 i 72 godz.

**Wyniki.** Ekstrakty ELK oraz FELK wykazywały umiarkowany wpływ na hamowanie wzrostu komórek HT29. W przypadku linii SW480 efekt hamowania żywotności komórek był dużo wyraźniejszy. Ekstrakt FELK znacznie silniej hamował wzrost komórek nowotworowych HT29 i SW480 w porównaniu do ELK. Wzrost prawidłowych komórek CCD841CoN był wyższy po traktowaniu ich FELK niż ELK.

**Wnioski.** Ekstrakt oczyszczony FELK, bogatszy w związki fenolowe od nieoczyszczonego ELK, znacznie lepiej hamował wzrost komórek raka jelita grubego HT29 i SW480, a jednocześnie łagodniej działał na prawidłowe komórki nabłonkowe jelita CCD841CoN.

---

**Słowa kluczowe:** *Viburnum opulus*, ekstrakty bogate w związki fenolowe, komórki nowotworowe jelita, MTT

---

Praca finansowana z grantu Młodzi UMed 502-03/1-156-04/502-14-362-18 oraz z działalności statutowej Zakładu Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (503/1-156-04/503-01).

## Wstęp

Nowotwory są drugą co do częstości przyczyną zgonów na świecie i pomimo iż w ostatnich latach wskaźniki zapadalności i śmiertelności słabną, to nadal zapobieganie i leczenie stanowią poważny problem. Rak jelita grubego odpowiada za około 9% wszystkich zgonów i jest to trzeci najczęściej diagnozowany nowotwór (1-3).

Istnieje wiele czynników warunkujących rozwój raka jelita grubego, wśród nich wyróżnić można: wiek, dietę, palenie tytoniu, stany zapalne jelita, obecność zespołu metabolicznego, występowanie polipów w jelicie grubym oraz czynniki genetyczne. Bieżące dane pokazują również, iż odsetek zachorowań oraz zgonów na raka jelita grubego obniżył się w przeciągu ostatniej dekady o 3%, co jest głównie wynikiem wdrożenia badań przesiewowych, szerszego wykorzystania technik endoskopowych, chirurgicznych oraz chemioterapii (1). Niemniej jednak chemioterapia często wiąże się z szeregiem skutków ubocznych, dlatego też wiele badań skupia się na poszukiwaniu nowych metod leczenia. W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie metodami fitoterapeutycznymi, które mogłyby stać się uzupełnieniem leczenia konwencjonalnego.

Liczne badania pokazują, że związki pochodzenia roślinnego, w tym polifenole, terpenoidy oraz alkaloidy, wykazują potencjał leczniczy i skutecznie regulują mechanizmy komórkowe odpowiedzialne za procesy karcynogenezy (4). Do tej pory dobrze poznano antynowotworową aktywność pojedynczych związków polifenolowych, takich jak: resweratrol występujący w winogronach, galusan epigallokatechiny (EGCG) w zielonej herbacie, kurkumina czy genisteina (5, 6). Przyjmowanie naturalnych ekstraktów roślinnych bogatych w związki polifenolowe niesie za sobą także korzystne skutki, co zostało niejednokrotnie potwierdzone w testach *in vitro* oraz *in vivo* (7-10).

Wiele badań wskazuje, że spożywanie pokarmów bogatych w substancje przeciwutleniające obniża ryzyko rozwoju wielu chorób (11, 12). Istnieje wiele prac, które dowodzą, że dieta bogata w polifenole reguluje niekorzystny poziom reaktywnych form tlenu (RFT) (13, 14). Polifenole ze względu na swoje właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne skutecznie zmniejszają ryzyko wystąpienia wielu chorób, w tym naczyniowo-sercowych, cukrzycy, alergii i nowotworów, wykazują także działanie przeciwgrzybicze oraz wzmacniają odporność (15, 16). Rosnące w ostatnich latach zainteresowanie naturalnymi składnikami żywności stało się istotnym czynnikiem rozwoju badań koncentrujących się na mniej znanych roślinach.

Wiele gatunków roślin jagodowych, w tym kalina koralowa (*Viburnum opulus* L.) z rodziny Przewiertniowatych, okazuje się być wartościowym źródłem bioaktywnych związków (17, 18). Roślina ta występuje w Europie, Azji Północnej, Azji Południowej oraz centralnej części Rosji. Owoce kaliny są jadalne i wykorzystywane w medycynie ludowej, przemyśle spożywczym oraz farmaceutycznym. Stosuje się je w leczeniu chorób serca, płuc, nerek, cukrzycy, problemów trawiennych, a także kaszlu czy przeziębienia (19).

Wiele prac pokazuje związek między właściwościami leczniczymi *V. opulus* a zawartością polifenoli, kwasów fenolowych, w tym kwasu chloronowego, flawonoidów, antocyjanów oraz kwasów organicznych, takich jak kwas askorbinowy oraz kwas jabłkowy (10, 11, 13, 14). Ponadto badania *in vitro* potwierdziły, iż ekstrakt z *V. opulus* wykazuje działanie przeciwutleniające (18, 20-22). Inne prace, prowadzone na wielu bakteriach i grzybach chorobotwórczych dla człowieka, dowiodły przeciwdrobnoustrojowej aktywności *V. opulus* (23). W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* odnotowano także przeciwzapalny potencjał ekstraktu z kaliny, pod wpływem którego obniżeniu uległy poziomy prozapalnych cytokin oraz zahamowane zostały procesy zapalne związane z tworzeniem się obrzęków (24). Ekstrakt z *V. opulus* wydaje się być również cenny ze względu na łagodzenie uszkodzeń układu rozrodczego, co zostało wykazane w badaniach prowadzonych na szczurach (25, 26). Celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy związki fenolowe występujące w ekstraktach z liści *V. opulus* mają wpływ na przeżywalność komórek nowotworowych gruczolakoraka jelita grubego HT-29 i SW480 oraz prawidłowych nabłonkowych komórek jelita CCD841CoN.

## Cel pracy

Celem badań była ocena i porównanie wpływu dwóch ekstraktów (nieoczyszczonego – ELK i oczyszczonego – FELK) pozyskanych z liści kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) na żywotność komórek nowotworowych jelita SW480 i HT-29 oraz prawidłowych komórek nabłonka jelita CCD841CoN.

## Materiał i metody

### Odczynniki

W eksperymentach wykorzystano bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu (MTT) oraz odczynnik Folina-Ciocalteu, a także galusan (-)epigallokatechiny (EGCG), antybiotyki (penicylina i streptomycyna), trypsynę, roztwór PBS, płodową surowicę bydlęcą (FBS), L-glutaminę

i podłoża hodowlane (DMEM, EMEM, RPMI-1640) zakupione w firmie Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA). Natomiast pozostałe użyte w badaniach odczynniki chemiczne pochodziły z firmy POCH S.A. (Polska).

### **Materiał roślinny**

Liście kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) pochodziły z Leśnego Zakładu Doświadczalnego SGGW Arboretum w Rogowie.

### **Otrzymywanie ekstraktu z liści kaliny**

Rozdrobnione wysuszone liście homogenizowano przy prędkości 20 000 obr./min przez 1 min w 70% wodnym roztworze metanolu (1:10, w/v), a następnie prowadzono proces ekstrakcji przez 30 min z zastosowaniem mieszadła magnetycznego. Następnie mieszaninę wirowano (10 min, 5000 obr./min), a otrzymany osad ponownie ekstrahowano przez 30 min z użyciem 100% metanolu w stosunku 1:5 (w/v). Uzyskane ekstrakty połączone i zagęszczono celem usunięcia metanolu. Wodne ekstrakty odłuszczone, stosując 7-10-krotną ekstrakcję dichlorometanem (1:1, v/v), a po odparowaniu pozostałości dichlorometanu liofilizowano. Liofilizaty (ELK) do czasu analizy przechowywano w temperaturze 4°C.

### **Oczyszczanie ekstraktu z liści kaliny**

Oczyszczanie związków polifenolowych prowadzono metodą SPE (Solid Phase Extraction) na kolumnkach Sep-Pak C18 z zastosowaniem 12-pozycyjnego próżniowego zestawu do SPE firmy BioAnalytic (27). Na aktywowane metanolem i wodą destylowaną (po 40 ml) kolumnki Sep-Pak C18 (Waters, 10 g) nanoszono nieoczyszczony ekstrakt polifenolowy w ilości 0,5-1 g/10 ml wody. Złóże przemywano wodą destylowaną (100 ml) celem usunięcia związków niepolifenolowych, takich jak cukry i kwasy organiczne, a zaadsorbowane związki fenolowe wymywano 100 ml metanolu. Otrzymany eluat, po dodaniu 30 ml wody, zatężano na wyparce próżniowej, a otrzymaną wodną próbę liofilizowano. Liofilizat (FELK) przechowywano do czasu analizy w temperaturze 4°C.

### **Analiza związków polifenolowych**

Analizę związków polifenolowych wykonano przy użyciu chromatografu cieczowego HPLC firmy Waters, wyposażonego w detektor PDA-996 (Photodiode Array Detector) (2998), autosampler 2707, pompę gradientową 1525 oraz oprogramowanie Waters Breeze 2. Do badań zastosowano kolumnę Symmetry C18 (5 µm) (Waters) o wymiarach 250 x 4,6 mm. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min.

Dla badanych prób wykonywano widma poszczególnych pików w przedziale długości fali od 200 do 400 nm. Fazę ruchomą stanowił układ rozpuszczalników: (A) woda/kwas mrówkowy (90:10 v/v) oraz (B) woda/acetonitryl/kwas mrówkowy (40:50:10 v/v/v). Analizę związków polifenolowych prowadzono w następującym gradiencie: 0 min – 88% A, 0-26 min – 70% A, 26-40 min – 0% A, 40-43 min – 0% A, 43-48 min – 88% A, 48-50 min – 88% A (28).

Wykrywanie związków polifenolowych prowadzono przy 3 długościach fal. Zawartość flawanoli i kwasów hydroksybenzoesowych (280 nm) przeliczano na kwas galusowy, kwasów hydroksycynamonowych (320 nm) na kwas chlorogenowy, zaś flawonoli (360 nm) na kwercetynę.

### **Linie komórkowe**

Do badań wykorzystano dwie linie komórkowe gruczołakoraka jelita grubego: HT29 i SW480 oraz prawidłowe komórki jelita CCD841CoN pochodzące z American Type Culture Collection (ATCC; ref: HTB-38, CCL-228 i CRL-1790). Komórki HT29 hodowane były w podłożu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) z dodatkiem inaktywowanej 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 200 mM L-alanylo-L-glutaminy oraz 50 U/ml penicyliny i 50 µg/ml streptomycyny. Linia SW480 hodowana była w RPMI 1640 Medium z dodatkiem inaktywowanej 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 200 mM L-alanylo-L-glutaminy oraz 50 U/ml penicyliny i 50 µg/ml streptomycyny. CCD841CoN hodowane były w podłożu Eagle's Modified Eagle Medium (EMEM) z dodatkiem inaktywowanej 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 200 mM L-alanylo-L-glutaminy oraz 50 U/ml penicyliny i 50 µg/ml streptomycyny. Komórki hodowano w atmosferze CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C. Wszystkie badania zostały przeprowadzone pomiędzy 5 i 11 pasażem. Komórki wysiewano w takiej ilości, aby ich gęstość pod koniec doświadczenia nie przekraczała 80% dla kontroli. Ekstrakty testowano w zakresie stężeń od 50 do 800 µg/ml.

### **Ocena żywotności komórek**

Żywotność komórek oceniano po 24-, 48- i 72-godzinnej inkubacji z dodatkiem ELK lub FELK (0-800 µg/ml), a także bez tych ekstraktów, przy użyciu testu MTT. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano 50 lub 100 mM roztwór EGCG. Komórki SW480 i HT29 wysiewano na płytce 96-dołkowej w ilości 10 tys./dołek, a CCD841CoN w ilości 6 tys./dołek. Po 24 godz. znad komórek usuwano podłoże z 10% FBS, a następnie zawieszono je w podłożu wzbogaconym 3% FBS z dodatkiem badanych

ekstraktów. Komórki traktowano ELK lub FELK przez 24, 48 i 72 godziny. Po tym czasie do podłoża dodawano po 20  $\mu$ l 5 mg/ml roztworu MTT na dołek. Po 3 godz. inkubacji usuwano podłoże z MTT i do każdego dołka dodawano po 100  $\mu$ l 100% dimetylo-sulfotlenku (DMSO). Płytkę wstrząsano przez 15 min w temperaturze pokojowej, stosując wstrząsarkę do płytek wzorcowych (Lab-Line Instruments, USA). Gęstość optyczną (OD) mierzono czytnikiem mikro-płytek (iMark™, BioRad Laboratories) przy długości fali 595 nm. Analizę przygotowywano w oparciu o niezależne badania w trzech powtórzeniach. Żywotność komórek określono w procentach w odniesieniu do kontroli (komórki bez dodatku ekstraktów).

#### Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników wykonano z użyciem programu PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc., USA). Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe (test ANOVA;  $p < 0,05$  uznawano jako wartości istotne statystycznie).

## Wyniki

#### Charakterystyka składu chemicznego ekstraktów

Analiza HPLC składu chemicznego ekstraktów ELK i FELK została przedstawiona w tabeli 1 i wykazała przewagę związków fenolowych w ekstrakcie FELK, który poddany był procesowi oczyszczania. W FELK zawartość flawanoli i kwasów hydroksybenzoesowych wynosiła 24,6 mg/g, kwasów hydroksycynamonowych 259,62 mg/g, a flawonoli 22,42 mg/g. W przypadku ekstraktu nieoczyszczonego ELK zawartość flawonoli była dwukrotnie mniejsza niż w FELK i wynosiła 11,69 mg/g. Podobnie zawartość flawanoli i kwasów hydroksybenzoesowych oraz kwasów hydroksycynamonowych była odpowiednio niższa: 16,11 i 151,78 mg/g.

#### Ocena wpływu ekstraktów na żywotności komórek HT29

Zastosowanie testu MTT oraz analiza żywotności komórek HT29 traktowanych ekstraktami ELK

i FELK wykazały hamowanie wzrostu HT29 (ryc. 1). FELK silnie hamował wzrost komórek, działając podobnie jak 100  $\mu$ M EGCG. Istotny statystycznie spadek żywotności komórek zaobserwowano po 24 godz., zaś wzrost komórek został zahamowany o 50% (IC50) po 48 godz. dla stężenia 600  $\mu$ g/mL FELK. Ekstrakt ELK spowodował niewielką stymulację komórek po 24 i 48 godz., natomiast hamował on wzrost HT29 dopiero po 72 godz., gdzie wartość IC50 została osiągnięta dla stężenia 400  $\mu$ g/ml.

#### Ocena wpływu ekstraktów na żywotności komórek SW480

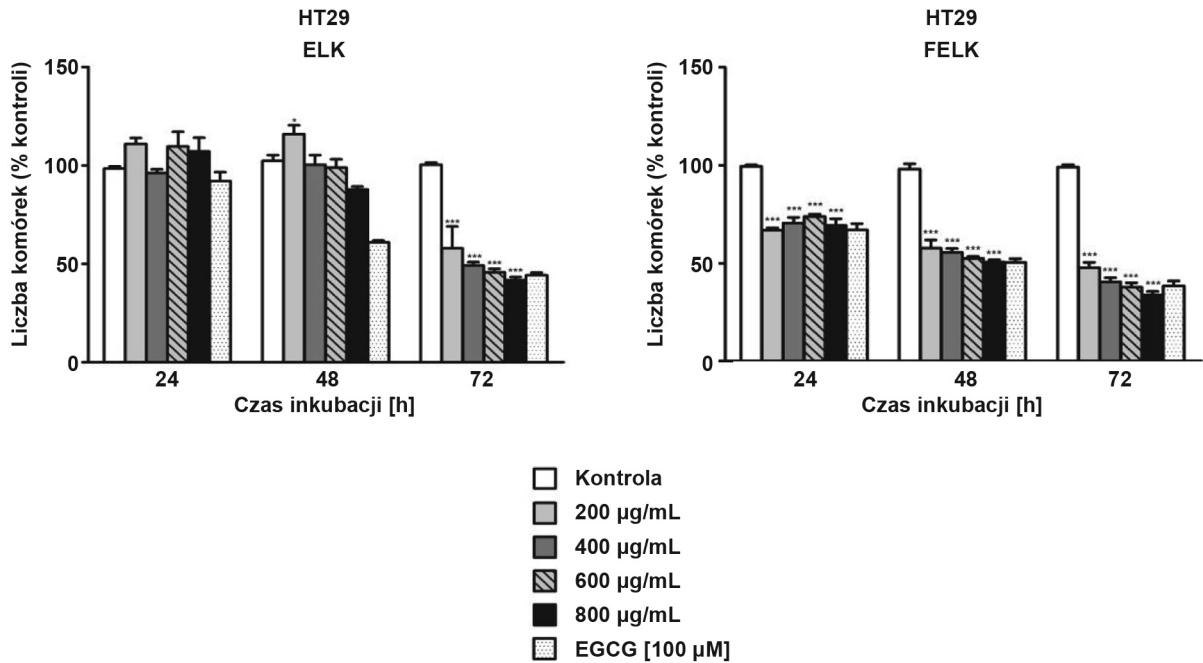
Podobnie jak w przypadku komórek HT29, również wzrost linii komórkowej SW480 był skuteczniej hamowany przez FELK (ryc. 2). ELK podobnie powodował nieznaczny wzrost żywotności komórek po 48 i 72 godz. Pierwszy statystycznie istotny spadek żywotności SW480 traktowanych ELK został odnotowany dla 500  $\mu$ g/mL po 24 godz., natomiast wartość IC50 została osiągnięta dla tego samego stężenia po 48 godz. FELK stosowano dla mniejszego zakresu stężeń (0-400  $\mu$ g/ml), gdyż już po 24 godz. przy 100  $\mu$ g/ml obserwowano istotne statystycznie hamowanie wzrostu SW480. Również po 24 godz. osiągnięta została wartość IC50 dla 200  $\mu$ g/ml. Najwyższe stężenie FELK (400  $\mu$ g/ml) również skutecznie jak EGCG (50  $\mu$ M) hamowało wzrost komórek SW480.

#### Ocena wpływu ekstraktów na żywotności komórek CCD841CoN

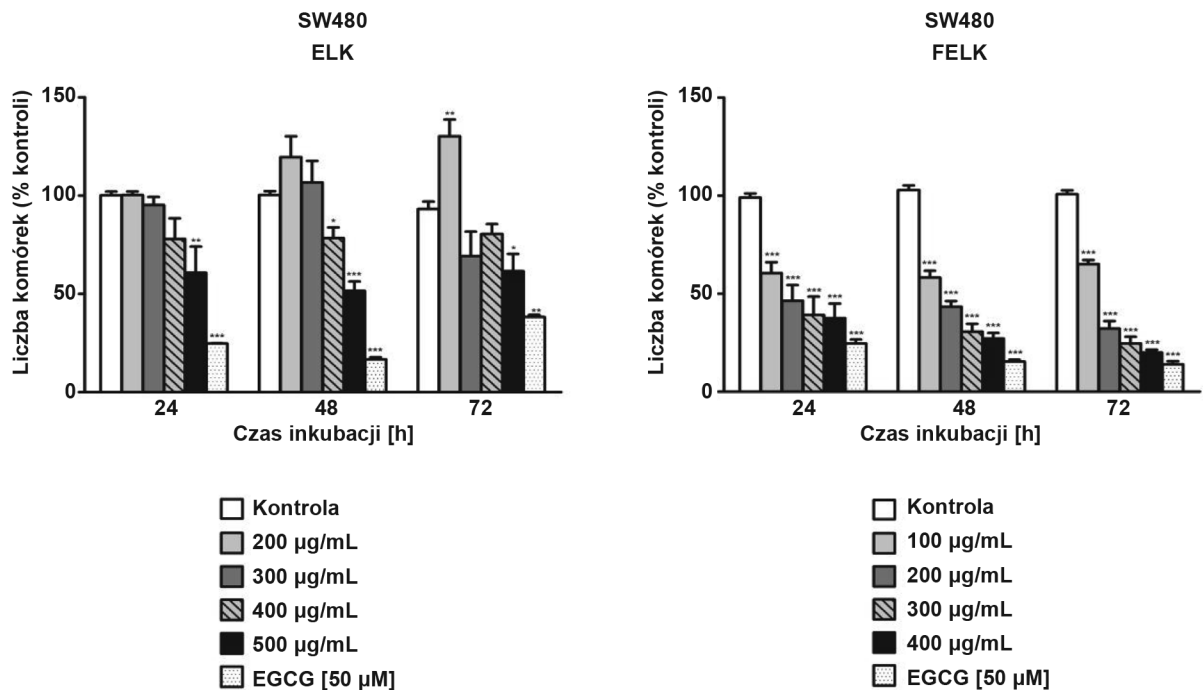
Test MTT oraz analiza żywotności prawidłowych nabłonkowych komórek jelita CCD841CoN, traktowanych ELK i FELK, wykazała hamowanie wzrostu tych komórek (ryc. 3). ELK hamował wzrost CCD841CoN, osiągając dla wszystkich czasów oraz zakresu stężeń wartość IC50. Należy podkreślić, że oczyszczony ekstrakt FELK w znacznie mniejszym stopniu wpłynął na wzrost CCD841CoN. Spowodował on zahamowanie wzrostu komórek dopiero po 48 godz., zaś wartość IC50 została osiągnięta wyłącznie dla stężenia 100  $\mu$ g/ml po 48 godz.

Tab. 1. Zawartość związków fenolowych w ekstraktach z liści – opulus

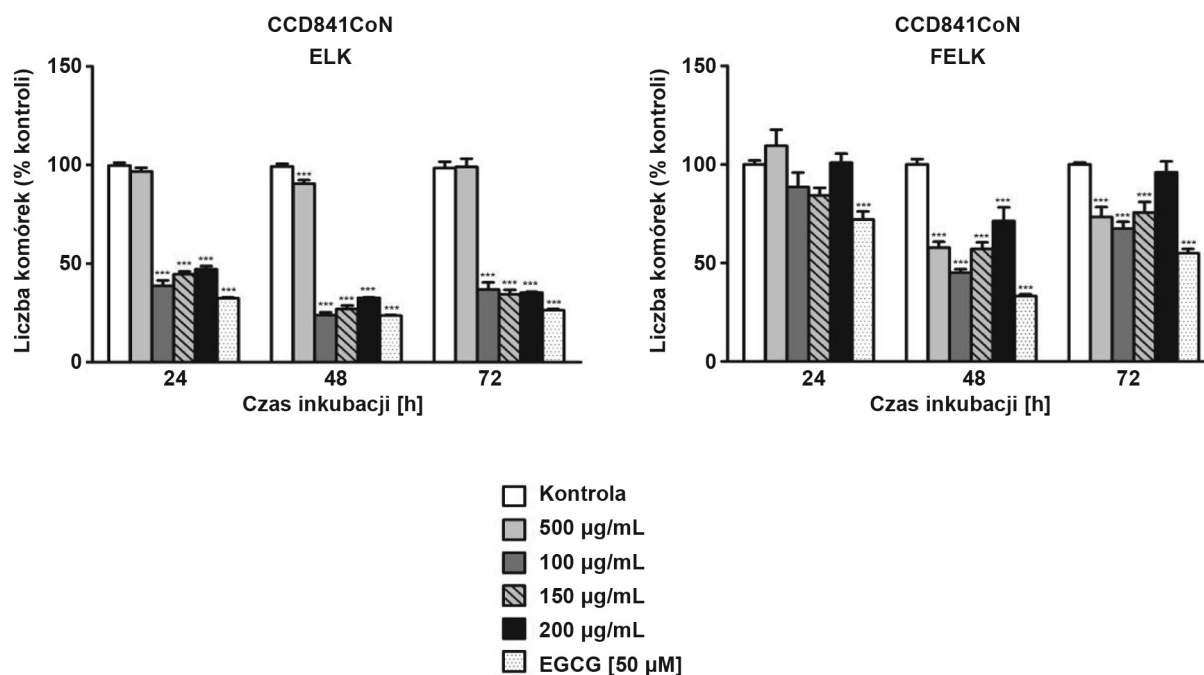
Rodzaj ekstraktu	Zawartość związków fenolowych [mg/g]		
	flawanole + kwasy hydroksybenzoesowe	kwasy hydroksycynamonowe	flawonole
ELK	16,11	151,78	11,69
FELK	24,60	259,62	22,42



Ryc. 1. Wpływ ekstraktów ELK i FELK na wzrost komórek raka jelita grubego HT29 na podstawie testu MTT. Każda wartość reprezentuje wartość średnią ± SD. Poziomy istotności wyników są prezentowane jako różnice między średnimi:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) względem kontroli



Ryc. 2. Wpływ ekstraktów ELK i FELK na wzrost komórek raka jelita grubego SW480 na podstawie testu MTT. Każda wartość reprezentuje wartość średnią ± SD. Poziomy istotności wyników są prezentowane jako różnice między średnimi:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) względem kontroli



Ryc. 3. Wpływ ekstraktów ELK i FELK na wzrost prawidłowych komórek nabłonkowych jelita CCD841CoN na podstawie testu MTT. Każda wartość reprezentuje wartość średnią  $\pm$  SD. Poziomy istotności wyników są prezentowane jako różnice między średnimi:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) względem kontroli

## Dyskusja

Związki polifenolowe są istotne w profilaktyce i leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych, w tym również w terapii nowotworów jelita grubego. Wiele badań potwierdza, iż pojedyncze polifenole hamują rozwój nowotworów (29). Przykładem może być dobrze już poznany EGCG, występujący w zielonej herbacie, resweratrol obecny w czerwonym winie czy też kurkumina. Wykazują one właściwości przeciwnowotworowe, hamują rozwój guzów, migracje komórek nowotworowych, przerywają do innych narządów czy angiogenezy (6, 30). Potwierdzają to również badania *in vitro* prowadzone na komórkach raka jelita grubego oraz badania *in vivo* (31-33).

Ze względu na przeciwzapalne i przeciwnowotworowe właściwości pojedynczych polifenoli, interesujące stały się również roślinne preparaty oraz ekstrakty bogate w te związki. Zaliczyć do nich należy ekstrakty z *V. opulus*. Wiele badań potwierdziło, iż kwas chlorogenowy występujący w *V. opulus* w dużych ilościach nadaje tej roślinie właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne oraz przeciwbakteryjne (17, 18, 22-24, 34-36).

Wiedza na temat przeciwnowotworowych właściwości *V. opulus* jest niewielka, niemniej jednak kilka prac sugeruje użyteczność jej wykorzystania w leczeniu chorób nowotworowych. Badania *in vitro* dowiodły

umiarkowaną aktywność wobec komórek nowotworowych. Dla przykładu doniesiono, że *Viburnum awabuki* wykazuje aktywność cytotoksyczną wobec kilku linii komórek nowotworowych, w tym również HT29 (37). Podobnie *Viburnum luzonicum* hamował żywotność komórek raka szyjki macicy HeLa S3 (38). Również cytotoksyczność związków *Viburnum odoratissimum* została poddana ocenie w stosunku do ludzkich komórek nowotworowych raka sutka i raka żołądka (39). Z kolei ekstrakt z *Viburnum juncundum* okazał się cytotoksyczny wobec niektórych ludzkich linii komórek nowotworowych, także raka jelita grubego HCT-15 (40).

Innym przykładem może być praca zaprezentowana przez Ulger i wsp. (41), w której testowano zastosowanie soku z *V. opulus* u myszy Balb-c z wywołanym przez 1,2-dimetylohydrazynę (DMH) rakiem jelita grubego. Badania te dowiodły, iż spożywanie soku z *V. opulus* zahamowało w dużym stopniu zmiany nowotworowe w okrężnicy myszy. Zaobserwowano ponadto, iż sok ten hamuje rozwój nowotworu na etapie inicjacji, mimo to nie zapobiega zmianom wywołanym przez DMH (41). *V. opulus* wywiera również silne działanie ochronne na żołądek, powodując zwiększenie endogennego wytwarzania tlenu azotu, zahamowanie peroksydacji lipidów, wzrost aktywności przeciwutleniającej

oraz zmiany w zawartości glikokoniugatu błony śluzowej żołądka i dwunastnicy (42). Inne badanie, przeprowadzone w 2018 roku na mysim modelu z inkubowanym nowotworem Ehrlicha (EAC), wykazało wpływ ekstraktu z *V. opulus* na wzrost komórek nowotworowych. Żywotność komórek EAC w teście cytotoksyczności uległa obniżeniu pod wpływem ekstraktu. Zaobserwowano również zmniejszoną inwazję i złagodzenie zmian histopatologicznych w obrębie jelita cienkiego i okrężnicy przy traktowaniu myszy ekstraktem z *V. opulus*. Ekstrakt ten wykazywał działanie przeciwnowotworowe wobec komórek EAC poprzez modulowanie peroksydacji lipidów oraz wzmacnianie endogennych systemów obrony przeciwutleniającej (43).

Nasze badania potwierdzają cytotoksyczne działanie ekstraktów z liści *V. opulus* na komórki raka jelita grubego. Znacznie skuteczniej działał bogatszy

w związku fenolowe ekstrakt FELK (oczyszczony) niż ELK (nieoczyszczony) na komórki nowotworowe HT29 i SW480. Umiarkowany spadek żywotności zaobserwowano dla komórek HT29. Co istotne, żywotność prawidłowych komórek jelita CCD841CoN była w dużo mniejszym stopniu hamowana przez FELK niż przez ELK. Może być to efekt wynikający z różnic składu chemicznego obu ekstraktów, czyli znacznie wyższych zawartości związków fenolowych w ekstrakcie EFLK, który został poddany procesowi oczyszczania. Zauważono, że wraz ze wzrostem zawartości związków fenolowych w FELK słabnie hamowanie wzrostu komórek prawidłowych, natomiast dla obu linii komórek nowotworowych stwierdzono odwrotny efekt. Uzyskane wyniki *in vitro* mogą być podstawą do kolejnych badań w kierunku poszukiwania mechanizmów komórkowych odpowiedzialnych za hamowanie wzrostu raka jelita grubego.

## Piśmiennictwo

1. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67(1):23.
2. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer Statistics 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(1):5-29.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R i wsp. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Intern J Cancer* 2015; 136(5):E359-86.
4. Chojnacka K, Lewandowska U. Chemopreventive effects of polyphenol-rich extracts against cancer invasiveness and metastasis by inhibition of type IV collagenases expression and activity. *J Funct Foods* 2018; 6:295-311.
5. Singh BN, Singh HB, Singh A i wsp. Dietary phytochemicals alter epigenetic events and signaling pathways for inhibition of metastasis cascade: Phytoblockers of metastasis cascade. *Cancer Metastasis Rev* 2014; 33(1):41-85.
6. Patel VB, Misra S, Patel BB i wsp. Colorectal cancer: Chemopreventive role of curcumin and resveratrol. *Nutr Cancer* 2010; 62:958-67.
7. Owczarek K, Lewandowska U. The impact of dietary polyphenols on COX-2 expression in colorectal cancer. *Nutr Cancer* 2017; 69(8):1105-18.
8. Lewandowska U, Owczarek K, Szewczyk K i wsp. Influence of polyphenol extract from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) seeds on human prostate and breast cancer cell lines. *Post Hig Med Dośw* 2014; 68:110-8.
9. Seo EY, Kim WK. Red ginseng extract reduced metastasis of colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J Ginseng Res* 2011; 35(3):315-24.
10. Wu C-H, Yang M-Y, Lee Y-J i wsp. *Nelumbo nucifera* leaf polyphenol extract inhibits breast cancer cells metastasis *in vitro* and *in vivo* through PKC $\alpha$  targeting. *J Funct Foods* 2017; 37:480-90.
11. Azzini E, Maiani G. Mediterranean Diet: Antioxidant nutritional status. *W: The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach* 2014; 249-57.
12. Scoditti E, Calabriso N, Massaro M i wsp. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Arch Biochem Biophys* 2012; 527(2):81-9.
13. Kim JA, Kong CS, Seo YW i wsp. *Sargassum thunbergii* extract inhibits MMP-2 and -9 expressions related with ROS scavenging in HT1080 cells. *Food Chem* 2010; 120(2):418-25.
14. Cerqueira FM, De Medeiros MHG, Augusto O. Dietetic antioxidants: Controversies and perspectives. *Quim Nova* 2007; 30(2):441-9.
15. Russo GL, Tedesco I, Spagnuolo C i wsp. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Semin Cancer Biol* 2017; 46(5):1-13.
16. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M i wsp. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 2004; 500(1-3 Spec Iss):299-313.
17. Karaçelik AA, Küçük M, Iskefiyeli Z i wsp. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods. *Food Chem* 2015; 175:106-14.
18. Kraujalyte V, Venskutonis PR, Pukalskas A i wsp. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. *Food Chem* 2013; 141(4):3695-702.
19. Tuglu D, Yılmaz E, Yuvanc E i wsp. *Viburnum opulus*: could it be a new alternative, such as lemon juice, to pharmacological therapy in hypocitratric stone patients? *Arch Ital Urol Androl* 2014; 86(4):297-9.
20. Cam M, Hisil Y, Kusu A. Organic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of fruit flesh and seed of *Viburnum opulus*. *Chem Nat Comp* 2007; 43(4):460-1.
21. Andreeva T, Komarova E, Yusubov M i wsp. Medicinal plants: antioxidant activity of cranberry tree (*Viburnum opulus* L.) bark extract. *Pharm Chem J* 2004; 38(10):54-60.

22. Rop O, Reznicek V, Valsikova M i wsp. Antioxidant properties of European cranberrybush fruit (*Viburnum opulus* var. *edule*). *Molecules* 2010; 15(6):4467-77.
23. Sagdic O, Aksoy A, Ozkan G. Evaluation of the antibacterial and antioxidant potentials of cranberry (gilaburu, *Viburnum opulus* L.) fruit extract. *Acta Aliment* 2006; 35(4):487-92.
24. Moldovan B, David L, Vulcu A i wsp. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties of green synthesized silver nanoparticles using *Viburnum opulus* L. fruits extract. *Mater Sci Eng C* 2017; 79:720-7.
25. Sarözkan S, Türk G, Eken A i wsp. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) fruit extract alleviates testis and sperm damages induced by taxane-based chemotherapeutics. *Biomed Pharmacother* 2017; 95:1284-94.
26. Saltan G, Süntar I, Ozbilgin S i wsp. *Viburnum opulus* L.: A remedy for the treatment of endometriosis demonstrated by rat model of surgically-induced endometriosis. *J Ethnopharmacol* 2016; 193:450-5.
27. Georgé S, Brat P, Alter P i wsp. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem* 2005; 53(5):1370-3.
28. Dyrby M, Westergaard N, Stapelfeldt H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chem* 2001; 72(4):431-7.
29. Hussain SA, Sulaiman AA, Balch C i wsp. Natural polyphenols in cancer chemoresistance. *Nutr Cancer* 2016; 68:879-91.
30. Rady I, Mohamed H, Rady M i wsp. Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egypt J Basic Appl Sci* 2018; 5(1):1-23.
31. Chidambara-Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. Citrus limonoids and curcumin additively inhibit human colon cancer cells. *Food Funct* 2013; 4(5):803-10.
32. Zhang CX, Wang SM, Jin HY. Inhibitory effect and mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate on HT29 and HCT-8 colorectal cancer cell lines and expression of HES1 and JAG1. *Zhonghua wei Chang wai ke za zhi* 2011; 14(8):636-9.
33. Cui X, Jin Y, Hofseth AB i wsp. Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prev Res* 2010; 3(4):549-59.
34. Ilhan M, Ergene B, Süntar I i wsp. Preclinical evaluation of antiurolithiatic activity of *Viburnum opulus* L. on sodium oxalate-induced urolithiasis rat model. *Evid Based Compl Altern Med* 2014; 2014.
35. Altun ML, Saltan Çitoğlu G, Sever Yilmaz B i wsp. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Viburnum opulus*. *Pharm Biol* 2009; 47(7):653-8.
36. Altun ML, Erdogan-Orhan I. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant assets of the major components (salicin, amento-flavone, and chlorogenic acid) and the extracts of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* and their total phenol and flavonoid contents. *J Med Food* 2010; 13(6):1537-43.
37. El-Gamal AA. Cytotoxic lupane-, secolupane-, and oleanane-type triterpenes from *Viburnum awabuki*. *Nat Prod Res* 2008; 22(3):191-7.
38. Fukuyama Y, Minoshima Y, Kishimoto Y i wsp. Cytotoxic iridoid aldehydes from Taiwanese *Viburnum luzonicum*. *Chem Pharm Bull* 2005; 53(1):125-7.
39. Shen YC, Lin CL, Chien SC i wsp. Vibsane diterpenoids from the leaves and flowers of *Viburnum odoratissimum*. *J Nat Prod* 2004; 67(1):74-7.
40. Rios MY, González-Morales A, Villarreal ML. Sterols, triterpenes and biflavonoids of *Viburnum jucundum* and cytotoxic activity of ursolic acid. *Planta Med* 2001; 67(7):683-4.
41. Ulger H, Ertekin T, Karaca O i wsp. Influence of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon cancer. *Toxicol Ind Health* 2013; 29(9):824-9.
42. Zayachkivska OS, Gzhegotsky MR, Terletska OI i wsp. Influence of *Viburnum opulus* proanthocyanidins on stress-induced gastrointestinal mucosal damage. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57(Suppl 5):155-67.
43. Ceylan D, Aksoy A, Ertekin T i wsp. The effects of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on experimentally induced Ehrlich ascites tumor in mice. *J Cancer Res Ther* 2018; 14(2).

**Konflikt interesów****Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 27.07.2018

zaakceptowano/accepted: 09.08.2018

Adres/address:

\*dr hab. n. med. Urszula Lewandowska, prof. nadzw.

Zakład Biochemii

Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź

tel.: +48 (42) 272-57-14

e-mail: urszula.lewandowska@umed.lodz.pl