

УДК 616.5-006.81-06-085

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ХЛЕБА «ДОКТОРСКИЙ ПРЯНЫЙ», ОБОГАЩЕННОГО КОМПЛЕКСОМ СПЕЦИЙ

Гайдуль К.В., Гольдина И.А.

*Научно – исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, e-mail: igoldina@mail.ru*

С целью выявления противоопухолевой эффективности ржано – пшеничного хлеба, условно названного «Докторский пряный», с добавлением механически модифицированного измельчением до размера наночастиц и иммобилизацией на полисахаридном носителе комплекса биологически активных компонентов специй - куркумина,  $\alpha$ -турмерона, алицина, Z-аджоена, апигенина, эвгенола, исследовали рост очагов экспериментальной меланомы B16 в мышечной ткани мышей (CBAxС57BL/6)F1 при кормлении их хлебом с модифицированным или немодифицированным комплексом специй. Было установлено, что в результате кормления животных хлебом с модифицированным комплексом специй происходит уменьшение суммарной массы очагов опухоли в мышечной ткани. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что хлеб с добавлением механохимически модифицированного комплекса специй обладает противоопухолевыми свойствами у мышей на модели роста экспериментальной опухоли.

**Ключевые слова:** хлеб, специи, наночастицы, противоопухолевые свойства

## THE ANTITUMOR PROPERTIES OF BREAD «DOKTORSKY PRIANUY», ENRICHED BY THE COMPLEX OF SPICES

Gaidul K. V., Goldina I.A.

*Scientific research institute of fundamental and clinical immunology, Novosibirsk, e-mail: igoldina@mail.ru*

In order to identify the anti-tumor efficacy of rye - wheat bread, tentatively called “Doctorskiy prianiy”, manufactured with the addition of mechanically modified complex of biologically active components of spices - curcumin,  $\alpha$ -turmerones, allicin, Z-ajoen, apigenin, eugenol, by grinding up to the nanoparticle size and immobilization on a polysaccharide carrier, the experimental B16 melanoma foci growth in the muscle tissue of mice (CBAxС57BL/6)F1 during the feeding them with bread with a modified or unmodified complex of spices has been investigated. It was found that as a result of the feeding of animals with a bread with the modified complex of spices, the decreasing of the total mass of tumor foci in muscle tissue occurs. Our data indicate that the bread with addition of the mechanochemically modified complex of spices possesses the anti-tumor properties at a mice model of the experimental tumor growth.

**Keywords:** bread, spices, nanoparticles, anti-tumor properties

Результатами современных исследований установлено, что канцерогенез представляет собой многоступенчатый процесс генетических и эпигенетических нарушений, которые приводят к прогрессивной трансформации нормальных клеток в опухолевые. В то же время не вызывает сомнений и тот факт, что некоторые формы рака не только поддаются лечению в случае их ранней диагностики, но и могут быть профилактированы отказом от курения, эффективным лечением рекуррентных инфекций, защитой от интенсивной инсоляции, а также воздействия токсических веществ из окружающей среды. Важное место в профилактике онкологических заболеваний отводится и характеру питания. Широкомасштабными эпидемиологическими исследованиями выявлено, что диета, обогащенная продуктами растительного происхождения, которые содержат вещества с

онкопревентивными свойствами (каротиноиды, катехины, полифенолы, изофлавоны, витамины, а также балластные вещества), доказала свою эффективность по показателям снижения риска развития, а также выживаемости и качества жизни при ряде опухолей – меланоме, раке молочной железы, простаты, матки, мочевого пузыря, толстого кишечника [2]. Известно также, что регулярное употребление овощей семейства крестоцветных, лука, зеленого чая, цитрусовых, соевых бобов, томатов, винограда, плодов клюквы, брусники, черники, малины, ассоциировано со снижением риска развития рака [8]. Вещества с онкопревентивными и онкотерапевтическими свойствами в высокой концентрации содержатся и в специях – куркуме, гвоздике, розмарине, эстрагоне, мускатном орехе, чесноке. Однако большинство из этих веществ характеризуется невысокой активностью, а также

низкой биодоступностью из – за малой растворимости, высокого системного метаболизма, нестабильности во внешней среде, поэтому их требуется употреблять в высоких дозах, что в ряде случаев сопровождается формированием побочных реакций.

С целью повышения стабильности, биодоступности, снижения риска развития побочных эффектов лекарственных препаратов в настоящее время применяется технология создания препаратов типа «хозяин – гость», в которых в качестве «гостя» используется фармакологически активное вещество, а «хозяина» – высокомолекулярный носитель, например, арабиногалактан (АГ) [4]. АГ, помимо собственных иммуномодулирующих свойств, способен формировать комплексы с лекарственными веществами, увеличивая их стабильность, растворимость, и повышая таким образом их фармакологическую активность.

Учитывая эти данные, **целью настоящего исследования** было выявление противоопухолевой эффективности хлеба с добавлением механически модифицированного измельчением до размера наночастиц и иммобилизацией на полисахаридном носителе комплекса биологически активных компонентов специй (КС) на модели роста экспериментальной меланомы В16 у животных.

Материал и методы исследования Исследование выполнено на 60 мышцах-самцах (СВАхС57BL/6)F1, в возрасте трех месяцев, с массой тела 25 – 27 г, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных СО РАМН (Новосибирск).

Эксперименты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для научных целей (Страсбург, 1986), с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 19.06. 2003 № 267 «Правила лабораторной практики в РФ»). Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, при свободном доступе к воде и пище, естественном световом режиме. Мыши, включенные в исследование, случайным образом были разделены на 3 группы. В качестве экспериментальной опухолевой модели использовали рост перевиваемой линии мышшиной меланомы В16, полученной из коллекции НИИ фундаментальной и клинической им-

мунологии, в мышечной ткани. Животным исследуемых групп внутримышечно, однократно, в верхнюю треть бедра инокулировали по  $4 \times 10^5$  клеток меланомы в 0,2 мл физиологического раствора на одно животное. За 7 суток до инокуляции клеток опухоли в пищевой рацион животных опытной группы включали ржано – пшеничный хлеб, условно названный «Докторский пряный», изготовленный по традиционной технологии, с добавлением модифицированного КС (20 г/кг), из расчета 20 г. на 1 животное в сутки, а мышам контрольных групп – ржано – пшеничный хлеб с добавлением немодифицированного КС, или без такового в соответствующем количестве и в те же сроки. Кормление животных с добавлением хлеба продолжали в течение 21 суток после инокуляции клеток опухоли. Комплекс специй представлял собой смесь биологически активных веществ специй (БАВ) – куркумина,  $\alpha$ -турмерона, аллицина, Z-аджоена, апигенина, эвгенола (Sigma Aldrich) в равных количествах, и арабиногалактана («Аметис», Благовещенск, Россия). Модификация КС до размера наночастиц осуществлялась в соответствии с методикой, описанной нами ранее [1], механохимической обработкой его в смеси с АГ, представляющим собой полисахарид природного происхождения, получаемый из древесины лиственных деревьев и состоящий из звеньев галактозы и арабинозы с высокой степенью ветвления, в шаровой ротационной мельнице (энергонапряженность 1g) в массовых соотношениях БАВ/АГ - 30:1 в течение 2 часов, с целью формирования механокомпозигов. Рентгенофазовый анализ порошкообразных композиций КС проводился на дифрактометре ДРОН-3 (Россия). Электронные микрофотографии композиций БАВ/АГ получали на электронных микроскопах JEOL и HITACHI TM-1000 (Япония). Гранулометрический состав водных суспензий композиций КС исследовали на лазерном гранулометре Micro-Sizer 201 (Россия).

По окончании эксперимента оценивали выживаемость животных, а также суммарную массу очагов опухоли в тканях. Масса очагов опухоли определялась как разница массы бедра с опухолью и здорового противоположного бедра животного после удаления шкуры. Выживаемость животных учитывали путем ежедневного учёта их количества в опытной и контрольной группе.

**Статистическую обработку результатов** исследования проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна - Уитни для двух независимых групп, с использованием коммерческого пакета программ “Statistica 7.0” (StatSoft, USA).

Результаты представляли в виде медианы и интервала между 1 и 4 квартилями (Ме (25%; 75%). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение**

*Структурная характеристика композиции.* Материал КС, на основании электронных микрофотографий, состоял из округлых наночастиц размером 20-100 нм, агрегированных в рыхлые агрегаты размером 5 мкм. Около 30% материала составляли агрегаты размером менее 5 мкм. Следовательно, механохимическая обработка КС позволяет увеличить количество малоразмерных (менее 5 мкм) фракций частиц КС, соответственно, и количество биологически активных веществ, сорбированных наиболее биологически активными микро- и наноразмерными частицами арабиногалактана.

*Терапевтическая эффективность композиции.* У всех животных, включенных в

эксперимент, после инокуляции клеток опухолевой линии был обнаружен рост очагов опухоли в мышечной ткани. Учет продолжительности жизни мышей - опухоленосителей выявил, что мыши опытной и контрольных групп не отличались по показателю выживаемости в указанные сроки наблюдения. В то же время оценка роста очагов опухоли в мышцах показала, что в группе мышей, получавших в составе пищевого рациона хлеб с добавлением наноструктурированного КС, наблюдалось уменьшение их роста по сравнению как с контрольной группой, получавшей хлеб с немодифицированным КС, так и без него. Показатели роста очагов опухоли в контрольных группах не отличались между собой. Уменьшение роста опухоли выражалось в более низких показателях абсолютной суммарной массы ее очагов, по сравнению с таковой животных контрольных групп. Полученные данные представлены в Таблице 1.

**Таблица 1.**

Показатели роста очагов опухоли у мышей при воздействии хлеба с добавлением биологически активных веществ комплекса специй (Ме (25%; 75%)

Группы животных	Суммарная масса очагов опухоли, г.
Контроль I	5,62 (4,9; 6,5)
Контроль II	5,81 (5,0; 6,3)
Опыт	4,4 (3,2; 5,0)*

*Примечание:* n = 15 в каждой группе. \*  $p < 0,05$  между группами животных. Контроль I – хлеб без добавления КС; контроль II – хлеб с немодифицированным КС; опыт - хлеб с модифицированным КС;

Таким образом, полученные данные об уменьшении количества очагов меланомы B16 в мышечной ткани у экспериментальных животных свидетельствуют о том, что хлеб с добавлением механохимически модифицированного КС обладает противоопухолевыми свойствами.

Известно, что вещества с онкопревентивными и онкотерапевтическими свойствами, которые содержатся в специях – куркуме, гвоздике, розмарине, эстрагоне, мускатном орехе, чесноке, характеризуются низкой биодоступностью при поступлении их в систему пищеварения из-за высокого системного метаболизма, незначительной абсорбции, низкой растворимости в воде и частичной инактивации в кислой среде желудка [6], что значительно ограничивает их клиническую эффективность, что и было подтверждено отсутствием противоопухолевого эффекта у мышей, которых кормили хлебом с добавлением немодифицированного КС. Мы использовали метод механи-

ческого измельчения БАВ в высокоинтенсивных шаровых мельницах до размера наночастиц с иммобилизацией на полисахаридном носителе, как было описано выше, с целью получения наноразмерных фракций КС и формирования более стабильного механокомпозита для повышения его биодоступности - увеличения растворимости и устойчивости во внешней среде. Хлеб, как продукт, занимающий важное место в структуре питания практически всех слоев населения, широкодоступный, употребляющийся регулярно, на протяжении всей жизни индивида, был выбран для исследования и придания ему потенциальных противоопухолевых свойств.

В составе специй, использованных в эксперименте, согласно данным современных исследований, идентифицированы вещества, обладающие противораковыми свойствами. Так, куркума, получаемая из корневищ растения порядка имбирных *Curcuma Longa L.*, произрастающей пре-

имущественно в Индии и Юго – Восточной Азии, рассматривается как одна из наиболее активных антиканцерогенных пряностей, благодаря высокому содержанию полифенолов семейства куркуминоидов, в частности, куркумина, а также турмерона. Противоопухолевая активность куркумина и турмерона подтверждена множеством исследований. В частности, у куркумы идентифицированы антипролиферативные, антиангиогенные, антиметастатические свойства, а также способность повышать уровень апоптоза раковых клеток [9]. У турмерона, который преобладает в эфирном масле корневищ *Curcuma purpurascens* Bl., произрастающей в Индонезии, выявлена высокая цитотоксическая активность в отношении клеток опухолевой линии колоректального рака человека HT29 [7].

Наиболее биологически активными компонентами чеснока являются аллицин (diallyl thiosulfinate), обладающий, наряду с онкопротекторными, также кардиопротекторными и гиполипидемическими свойствами [11], и аджон (4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9-oxide), вещество, молекула которого содержит серу в высокой концентрации, обладающее широким спектром биологической активности, включающем антибактериальные (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Xanthomonas maltophilia*), а также цитотоксические свойства в отношении раковых клеток. Например, Z-аджон подавлял рост популяции стволовых опухолевых клеток GBM CSC (Glioblastoma Multiforme Cancer Stem Cell), не затрагивая при этом нетрансформированные клетки [5].

Апигенин, флавоноид растительного происхождения, присутствующий во множестве овощей, фруктов и пряно – вкусовых растений – петрушке, сельдерее, орегано, тимьяне, рассматривается как эффективное онкопревентивное вещество, так как обладает противовоспалительными, антиоксидантными и противораковыми свойствами [10].

Эвгенол, представляющий собой фенилпропаноид, содержащийся в эфирных маслах целого ряда растений, например, *Artemisia dracunculoides* (эстрагон), *Syzygium aromaticum* (гвоздика), *Daucus carota* (морковь), *Myristica fragrans* (мускатный орех) и *Rosmarinus officinalis* (розмарин), также обладает онкопротекторными свойствами. Например, выявлена противораковая активность эвгенола в отношении клеток опухолевой линии рака шейки матки HeLa, которая обеспечивается за счет индукции апоптоза, остановки клеточного цикла и потере мембранного потенциала клетки. Кроме того, эвгенол в комбинации с цисплатином и мирицетином усиливал действие

данных цитостатиков, увеличивая степень апоптоза клеток опухоли за счет более выраженной активации каспазы 3 [12].

Арабиногалактан, который был использован в качестве носителя БАВ и представляющий собой нетоксичный биосовместимый высокомолекулярный разветвленный полисахарид, содержащий  $\beta$  – галактозу, употребляется человеком в пищу на протяжении многих веков, так как содержится во множестве овощей – редисе, моркови, кукурузе, томатах, пшенице. В качестве промышленного источника АГ используется древесина различных видов лиственницы (*Larix sibirica*, *Larix gmelinii*). АГ присущи иммуномодулирующие свойства – стимуляция пролиферации спленоцитов, активности естественных киллеров, макрофагов, Т и В лимфоцитов, секреции провоспалительных цитокинов. АГ в комплексе с флавоноидами, при применении его *per os* у экспериментальных животных, приводил к активации клеток иммунной системы, увеличению цитотоксической активности сыворотки крови [3]. Учитывая, что АГ способен формировать комплексы с лекарственными веществами, увеличивая их стабильность, растворимость, и повышая их фармакологическую активность, а также его иммуномодулирующие свойства, данный полисахарид был выбран в качестве носителя БАВ с противораковыми свойствами.

Примененная нами механохимическая технология получения композиции БАВ/АГ позволила изменить фазовое состояние композиции – многократно увеличить долю наиболее мелких биологически активных частиц в механокомпоните, что и является предполагаемым механизмом повышения противоопухолевой активности механохимически модифицированного КС.

Полученные нами в данном исследовании данные свидетельствуют, что механохимически модифицированный КС в составе хлеба продемонстрировал противоопухолевую активность в отношении роста экспериментальной меланомы В16, которая выражалась в уменьшении количества очагов опухоли в конечности животного, в которую инокулировали клетки опухоли, по сравнению с контрольной. Следовательно, модифицированный КС в составе хлеба обладал достаточной стабильностью во внешней среде и биодоступностью для реализации его противоопухолевых свойств. Мы предполагаем, что возможными механизмами сохранения противоопухолевых свойств КС является механохимическая модификация, которая увеличивает и растворимость БАВ, и их термостабильность, а также устойчивость к изменению кислотности среды [4].

Выявление конкретных механизмов сохранения противоопухолевых свойств КС в составе хлеба требует дальнейшего углубленного изучения, так как хлеб с добавлением механохимически модифицированного КС перспективен как потенциальный продукт функционального питания для профилактики и адьювантной терапии онкологических заболеваний.

### Выводы

В результате проведенных экспериментов была установлена противоопухолевая эффективность хлеба, обогащенного измельченным до размера наночастиц и иммобилизованным на полисахаридном носителе комплексом биологически активных веществ специй в отношении роста экспериментальной меланомы В16 у животных – опухоленосителей.

### Список литературы

1. Душкин А.В., Гайдунь К.В., Гольдина И.А., Гуськов С.А., Евсеенко В.И., Ляхов Н.З., Козлов В.А. Антимикробная активность механохимически синтезированных комплексов антибиотиков и наноструктурированного диоксида кремния // Доклады АН. - 2012. - Т. 443, №1. - С. 120- 122.
2. Blanchard C.M., Courneya K.S., Stein K. American Cancer Society's SCS-II. Cancer survivors adherence to lifestyle behavior recommendations and associations with health-related quality of life: results from the American Cancer Society's SCS-II // J. Clin. Oncol. - 2008. - Vol. 26(13). - P. 2198-204. doi: 10.1200/JCO.2007.14.6217.
3. Dion C., Chappuis E., Ripoll C. Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials // Nutr. Metab. (Lond). - 2016. - Vol. 13. - P. 28. doi: 10.1186/s12986-016-0086-x.
4. Dushkin A.V., Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Tolstikov G.A. Complexes of polysaccharides and glycyrrhizic acid with drug molecules. mechanochemical synthesis and pharmacological activity // in book: The Complex World of Polysacchraids, ed.by Dr. D.N.Karunarathn. - Publisher: InTech. - 2012. - P. 573-602.
5. Jung Y., Park H., Zhao H.-Y. Systemic Approaches Identify a Garlic-Derived Chemical, Z-ajoene, as a Glioblastoma Multiforme Cancer Stem Cell-Specific Targeting Agent // Mol. Cells. - 2014. - Vol. 37(7). - P. 547-553. doi: 10.14348/molcells.2014.0158
6. Phadatar A.G., Viswanathan V., Mukne A. Novel strategies for optimized delivery of select components of Allium sativum // Pharmacognosy Res. - 2014. - Vol. 6(4). - P. 334-340. doi: 10.4103/0974-8490.138288.
7. Rouhollahi E., Moghadamtousi S.Z., Paydar M. Inhibitory effect of Curcuma purpurascens Bl. rhizome on HT-29 colon cancer cells through mitochondrial-dependent apoptosis pathway // BMC Complement. Altern. Med. - 2015. - Vol. 15. - P. 15. doi: 10.1186/s12906-015-0534-6
8. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types // Pharmacogn. Rev. - 2014. - Vol. 8, N 16. - P. 122 - 146. doi: 10.4103/0973-7847.134247
9. Singh M., Singh N. Curcumin counteracts the proliferative effect of estradiol and induces apoptosis in cervical cancer cells // Mol. Cell Biochem. - 2011. - Vol. 347, N 1-2. - P. 1 - 11.
10. Shukla S., Gupta S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention // Pharm. Res. - 2010. - Vol. 27(6). - P. 962-978. doi: 10.1007/s11095-010-0089-7
11. Tao M., Gao L., Pan J. Study on the Inhibitory Effect of Allicin on Human Gastric Cancer Cell Line SGC-7901 and Its Mechanism // Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. - 2014. - Vol. 11(1). - P. 176-179.
12. Yi J.-L., Shi S., Shen Y.-L. Myricetin and methyl eugenol combination enhances the anticancer activity, cell cycle arrest and apoptosis induction of cis-platin against HeLa cervical cancer cell lines // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2015; 8(2): 1116-1127.