

Protinádorový potenciál celistvých rastlinných funkčných potravín u rakoviny prsníka

Antitumor potential of whole plant functional foods in breast cancer

Kapinová A.¹, Kašubová I.¹, Šarlinová M.¹, Mazuráková A.², Dvorská D.¹, Braný D.¹, Danková Z.^{1,3}, Kajo K.⁴, Kubatka P.⁵

¹ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Martin, Slovenská republika

² Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav anatómie, Martin, Slovenská republika

³ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Biobanka pre nádorové a zriedkavé ochorenia, Martin, Slovenská republika

⁴ Onkologický ústav sv. Alžbety, Ústav patológie, Bratislava, Slovenská republika

⁵ Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biológie, Martin, Slovenská republika

Summary

Východiská: Celistvé rastlinné potraviny sú bohatým zdrojom širokého spektra bioaktívnych funkčných substancií – fytochemikálií, s rozsiahlym aditívnym a/alebo synergickým pôsobením v rámci procesu karcinogenézy. Vďaka rastúcemu počtu dôkazov z predklinických štúdií o ich účinnosti a relatívne bezpečnom toxikologickom profile je ich možné považovať za vhodnú stratégiu prevencie či doplnkovej terapie nádorových ochorení. Cieľom našej štúdie bolo porovnať protinádorovú kapacitu rozličných zmesí fytochemikálií obsiahnutých v celistvých rastlinných funkčných potravinách, konkrétne v šalvii (*Salvia officinalis* L.), arónii (*Aronia melanocarpa* L.) a rakytníku (*Hippophae rhamnoides* L.), a to v chemopreventívnom modeli rakoviny prsníka u samíc potkanov. **Materiál a metódy:** Fytofarmaká boli zvieratám podávané v potrave v rámci troch nezávislých experimentov v dvoch koncentráciách – 1) v nižšej – 0,1% alebo 0,3% (skupina 0,1 alebo 0,3), a 2) v 10-násobne vyššej – 1% alebo 3% (skupina 1 alebo 3). V tretej skupine fytofarmaká zvieratám podávané neboli, slúžila ako kontrola (KONT). Po ukončení každého experimentu bola uskutočnená analýza základných parametrov experimentálnej mamárnej karcinogenézy a komplexná analýza dobre validovaných prognostických, prediktívnych a diagnostických biomarkerov používaných v onkologickej praxi aj v predklinickom výskume. **Výsledky:** Komplexná analýza mechanizmu účinku rastlinných funkčných potravín potvrdila ich signifikantné protinádorové účinky v nami použitom experimentálnom modeli karcinómu prsníka, ktoré boli však špecifické od použitého fytofarmaka. Fytofarmaká signifikantne zlepšili parametre mamárnej karcinogenézy *in vivo* – incidenciu, frekvenciu, latenciu nádorov, a/alebo pomer HG/LG karcinómov. Štatisticky významne zlepšili expresiu markerov apoptózy, proliferácie, angiogenézy, nádorových kmeňových buniek a onkogénnych/tumor-supresorových miRNA. Navyše, chemoprevenca viedla k významnej modulácii chemických zmien histónov a poklesu metylácie promótorových oblastí tumor-supresorových génov. **Záver:** Porovnaním účinnosti fytofarmak sme dospeli k záveru, že prítomnosť špecifických dominantných rastlinných metabolitov môže priaznivo ovplyvniť prognózu mamárnej karcinogenézy. Na potvrdenie týchto zistení je však nevyhnutný ďalší predklinický a klinický výskum, vrátane posúdenia potenciálu týchto látok ako adjuvantnej terapie popri štandardnej onkologickej liečbe.

Kľúčové slová

rakovina prsníka – chemoprevenca – fytofarmakum – epigenetika

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Andrea Kapinová, Ph.D.
prof. RNDr. Peter Kubatka, Ph.D.
 Martinské centrum pre biomedicínu
 Jesseniova lekárska fakulta
 v Martine
 Univerzita Komenského v Bratislave
 036 01 Martin, Slovenská republika
 e-mail: andrea.kapinova@uniba.sk,
 peter.kubatka@uniba.sk

Obdržané/Submitted: 31. 5. 2025

Prijaté/Accepted: 12. 8. 2025

doi: 10.48095/ccko2024S104

Summary

Background: Whole plant foods are a rich source of a wide range of bioactive functional substances – phytochemicals, with extensive additive and/or synergistic effects within the process of carcinogenesis. Thanks to the growing body of evidence from preclinical studies on their effectiveness and relatively safe toxicological profile, they can be considered a suitable strategy in the prevention or adjuvant therapy of cancer diseases. Our study aimed to compare the antitumor capacity of various mixtures of phytochemicals contained in whole plant functional foods, namely in salvia (*Salvia officinalis* L.), aronia (*Aronia melanocarpa* L.), and sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.), in a chemopreventive model of breast cancer in female rats. **Material and methods:** Phytopharmaceuticals were administered to animals through the diet in three independent experiments using two concentrations: 1) a lower of 0.1% or 0.3% (Groups 0.1 or 0.3), and 2) a 10-fold higher of 1% or 3% (Groups 1 or 3). In the third group, serving as a control (CONT), no phytopharmaceuticals were administered to the animals. After completing each experiment, an analysis of the basic parameters of experimental mammary carcinogenesis and a comprehensive evaluation of well-validated prognostic, predictive, and diagnostic biomarkers used in oncological practice and preclinical research were performed. CS/LC-MS or LC-DAD/MS analysis of phytopharmaceuticals was performed to detect the presence of dominant phytochemicals. **Results:** A comprehensive analysis of the mechanism of action of plant-based functional foods confirmed their significant antitumor effects in our experimental breast cancer model, which were, however, specific to the phytopharmaceutical used. Phytopharmaceuticals significantly improved parameters of mammary carcinogenesis *in vivo* – incidence, frequency, latency of tumors, and/or ratio of HG/LG carcinomas. They statistically significantly improved the expression of markers of apoptosis, proliferation, angiogenesis, cancer stem cells, and oncogenic/tumor-suppressor miRNAs. In addition, chemoprevention led to significant modulation of histone chemical modifications and a decrease in methylation of promoter regions of tumor-suppressor genes. **Conclusion:** By comparing the efficacy of phytopharmaceuticals, we concluded that the presence of specific dominant plant metabolites may favorably influence the prognosis of mammary carcinogenesis. However, further preclinical and clinical research is necessary to confirm these findings, including assessing the potential of these agents as adjuvant therapy alongside standard oncological treatment.

Keywords

breast cancer – chemoprevention – phytopharmaceutical – epigenetics

Úvod

Rakovina prsníka patrí dlhodobu medzi najčastejšie diagnostikované nádorové ochorenia u žien [1]. Predklinické štúdie naznačujú, že zvýšený príjem celistvých rastlinných potravín bohatých na bioaktívne fytochemikálie môže byť spojený so zníženým rizikom jej vzniku [2–5]. Cieľom našej štúdie preto bolo analyzovať protinádorový potenciál troch rastlinných funkčných potravín – šalvie (*Salvia officinalis* L.), arónie (*Aronia melanocarpa* L.) a rakytníka (*Hippophae rhamnoides* L.) – v chemopreventívnom modeli karcinómu mliečnej žľazy u samíc potkanov. Na základe dostupných poznatkov sme predpokladali, že uvedené rastlinné funkčné potraviny budú vykazovať protinádorový účinok prostredníctvom synergického pôsobenia ich fytochemických zložiek na parametre nádorového rastu, diferenciácie a molekulové regulačné dráhy súvisiace s progresiou nádoru.

Materiál a metódy

Experimenty boli schválené Etickou komisiou JLF UK (EK1860/2016, EK1860/2022) a ŠVPS SR. Panenské samice potkana kmeňa Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Nemecko) boli náhodne rozdelené do troch skupín po

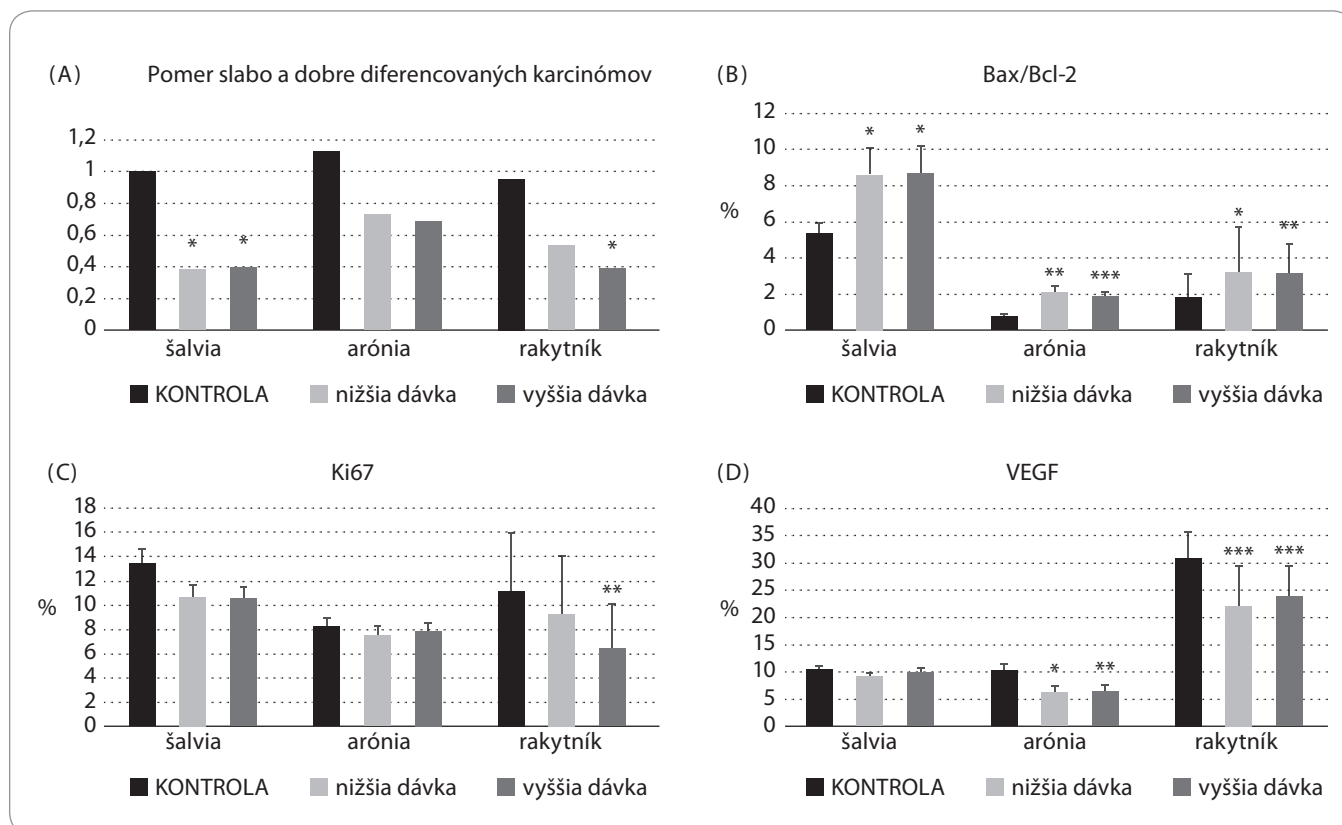
25 zvierat. Mamárna karcinogéza bola indukovaná i.p. aplikáciou N-metyl-N-nitrozourey (50 mg/kg) na 42. postnatálny deň, čím sa modeloval premenopauzálny stav u žien s vysokým rizikom rakoviny prsníka. Fytofarmaká boli podávané v potrave (SSNIFF, Nemecko) v koncentráciách 0,1/0,3 % (nižšie dávky) a 1/3 % (vyššie dávky), kontrolná skupina (KONT) liečbu nedostávala. Dávkovanie vychádzalo z klinických odporúčaní a predchádzajúcich experimentov [6–9]. V prípade šalvie bol do formy fytofarmaka spracovaný prášok z vňate *Salvia officinalis* L. (Calendula, Nová Ľubovňa, Slovensko; miesto pôvodu: severovýchodné Slovensko), v prípade ostatných fytofarmák to bol prášok zo šupiek plodov *Aronia melanocarpa* L. a *Hippophae rhamnoides* L. (Zamio, Michalovce, Slovensko; pôvodom z regiónu Zemplín) [10–12]. Experiment trval 15 týždňov. Po eutanázii boli nádory odobraté, zmerané a fixované vo formalíne alebo RNAlateri na histologické a molekulárne analýzy. Hodnotila sa incidencia, frekvencia, latencia a pomer HG/LG karcinómov. Imunohistochemické stanovenie markerov apoptózy, proliferácie, angiogenézy, CSCs a histónových modifikácií sa realizovalo pomocou Autostainer Link 48 a komerčných protilátok (Thermo Fis-

her, Abcam, Dako a i.), vizualizácia prebiehala cez systém EnVision s DAB substrátom. Morfometria bola vykonaná v softvéri QuickPhoto Micro 3.0. Expresia miRNA sa stanovovala RT-PCR (TaqMan testy, AB7500) alebo pomocou microarray analýzy (Agilent). Methýlácia tumor-supresorových génov sa hodnotila pyrosekvenáciou (PyroMark, Qiagen). Dominantné fytochemikálie boli identifikované LC-DAD/MS a LC-MS analýzou. Štatistické vyhodnotenie zahŕňalo ANOVA, Kruskal-Wallis a Mann-Whitneyov test.

Výsledky

V preklinickom modeli chemicky indukovanej mamárnej karcinogenézy u potkanov preukázali celistvé rastlinné potraviny – šalvia, arónia a rakytník – protinádorové účinky sprostredkované moduláciou apoptózy, proliferácie, angiogenézy, expresie nádorových kmeňových buniek a epigenetických dráh.

Podávanie vybraných rastlinných potravín viedlo k zníženiu podielu nízkodiferencovaných karcinómov (graf 1A), čo dokazuje zlepšenie prognózy a zvýšeniu pomeru Bax/Bcl-2 (graf 1B), čo naznačuje aktiváciu apoptózy. Súčasne klesla expresia markerov Ki67 a VEGF, poukazujú na potlačenie proliferácie a angioge-



Graf 1. Účinky fytofarmák na parametre nádorovej progresie v chemopreventívnom modeli karcinómu prsníka u potkanov. (A) Pomer nízko a vysoko diferencovaných karcinómov. (B) Pomer proapoptického a antiapoptického proteínu Bax/Bcl-2. (C) Proliferácia nádorových buniek hodnotená expresiou Ki67. (D) Expresia vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF). Signifikantný rozdiel vs. kontrola (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

nézy (graf 1C,D). Tieto nálezy podporujú hypotézu, že rastlinné bioaktívne látky môžu priaznivo ovplyvniť nádorovú biológiu prostredníctvom viacerých regulačných mechanizmov.

Naviac, chemoprevenca signifikantne zlepšila expresiu onkogénnych/tumor-supresorových miRNA, viedla k významnej modulácii chemických zmien histónov a poklesu metylácie promótorových oblastí tumor-supresorových génov, avšak tieto dáta v rámci tejto štúdie neboli detailnejšie analyzované [10–12].

Diskusia a záver

Celistvé rastlinné potraviny ako šalvia, arónia a rakytník preukázali významný protinádorový účinok v chemopreventívnom modeli rakoviny prsníka u potkanov, čo sa pripisuje synergickému pôsobeniu ich fytochemikálií na viaceré bunkové dráhy [4,5]. Naša analýza klinicky relevantných biomarkerov potvrdzuje, že fytofarmaká môžu priaz-

nivo ovplyvniť prognózu karcinómu prsníka [13,14]. Napriek sľubným výsledkom má použitý model viaceré obmedzenia. Indukovaná mamárna karcinogenéza u potkanov poskytuje cenné poznatky, no nereflektuje plne komplexitu ľudskej rakoviny pre rozdiely v metabolizme, imunite a genetickej variabilite. Laboratórne podmienky navyše znižujú mikrobiálnu expozíciu, čo môže ovplyvniť liečebnú odpoveď. Variabilita zloženia rastlinných extraktov závislá od pôvodu a spracovania tiež komplikuje štandardizáciu a klinické využitie. Hoci hľadavce modely odhaľujú základné mechanizmy účinku, ich translačný potenciál je obmedzený a vyžaduje doplnenie o pokročilejšie systémy, ako sú 3D kultúry či PDX modely. Napriek tomu výsledky poskytujú dôležitý dôkaz o biologickej aktivite rastlinných potravín s potenciálom ovplyvniť nádorovú progresiu *in vivo*.

Výsledky tejto štúdie poukazujú na potenciál rastlinných funkčných potra-

vín ako doplnkovej stratégie v prevencii karcinómu prsníka a zároveň sú v súlade s výsledkami našich predchádzajúcich štúdií využívajúcich rovnaký experimentálny model [6–9]. Pre ich translačné uplatnenie je však potrebné rozšíriť výskum o rôzne modely, zohľadniť fytochemickú variabilitu a presnejšie definovať mechanizmy účinku, optimálne dávkovanie a spôsob podávania. Ich efektívne využitie v klinickej praxi predpokladá integráciu do konceptu prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny (3PM).

Dedikácia: Práca bola finančne podporená grantom VEGA-1/0045/23 a VEGA-1/0286/22.

Literatúra

- Kim J, Harper A, McCormack V et al. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. *Nat Med* 2025; 31(4):1154–1162. doi: 10.1038/s41591-025-03502-3.
- Romanos-Nanclares A, Willett WC, Rosner BA et al. Healthful and unhealthful plant-based diets and risk of breast cancer in U.S. women: results from the Nurses' Health

- Studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2021; 30(10): 1921–1931. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-21-0352.
3. Fernández-Figares Jiménez MDC. Role of a whole plant foods diet in breast cancer prevention and survival. [In press]. doi: 10.1080/27697061.2024.2442631.
4. Molina-Montes E, Salamanca-Fernández E, García-Villanova B et al. The impact of plant-based dietary patterns on cancer-related outcomes: a rapid review and meta-analysis. Nutrients 2020; 12(7): 2010. doi: 10.3390/nu12072010.
5. Bahrami H. Nutrition for cancer prevention and control: a review of dietary risk factors and protective measures. Cancer Screening and Prevention 2023; 2(4):250–259. doi: 10.14218/CSP.2023.00008S.
6. Kubatka P, Kapinová A, Kružliak P et al. Antineoplastic effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the breast cancer model. Nutrition 2015; 31(4): 560–569. doi: 10.1016/j.nut.2014.08.010.
7. Kubatka P, Kapinová A, Kello M et al. Fruit peel polyphenols demonstrate substantial anti-tumour effects in the model of breast cancer. Eur J Nutr 2016; 55(3): 955–65. doi: 10.1007/s00394-015-0910-5.
8. Kubatka P, Uramova S, Kello M et al. Anticancer activities of *Thymus vulgaris* L. in experimental breast carcinoma *in vivo* and *in vitro*. Int J Mol Sci 2019; 20(7): 1749. doi: 10.3390/ijms20071749.
9. Kubatka P, Kello M, Kajo K et al. Chemopreventive and therapeutic efficacy of *Cinnamomum zeylanicum* L. bark in experimental breast carcinoma: mechanistic *in vivo* and *in vitro* analyses. Molecules 2020; 25(6): 1399. doi: 10.3390/molecules25061399.
10. Kubatka P, Mazurakova A, Koklesova L et al. *Salvia officinalis* L. exerts oncostatic effects in rodent and *in vitro* models of breast carcinoma. Front Pharmacol 2024a; 15: 1216199. doi: 10.3389/fphar.2024.1216199.
11. Dvorska D, Mazurakova A, Lackova L et al. *Aronia melanocarpa* L. fruit peels show anti-cancer effects in preclinical models of breast carcinoma: the perspectives in the chemoprevention and therapy modulation. Front Oncol 2024b; 14: 1463656. doi: 10.3389/fonc.2024.1463656.
12. Dvorska D, Sebova D, Kajo K et al. Chemopreventive and therapeutic effects of *Hippophae rhamnoides* L. fruit peels evaluated in preclinical models of breast carcinoma. Front Pharmacol 2025; 16: 1561436. doi: 10.3389/fphar.2025.1561436.
13. Krystel-Whittemore M, Tan PH, Wen HY. Predictive and prognostic biomarkers in breast tumours. Pathology 2024; 56(2): 186–191. doi: 10.1016/j.pathol.2023.10.014.
14. Tarighati E, Keivan H, Mahani H. A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. Clin Exp Med 2023; 23(1): 1–16. doi: 10.1007/s10238-021-00781-1.