

BULGARIAN VACCINIUM VITIS-IDAEA L., EXHIBIT IN VITRO ANTITUMOR POTENTIAL

Svetla Angelova *, **Ivelina Trifonova ***, **Silvia Voleva ***, **Stefka Ivanova ****, **Irina Georgieva *****,
Asya Stoyanova ***, **Ivayla Dincheva ******

*National Reference Laboratory of Influenza and Acute Respiratory Diseases, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

**National Reference Laboratory of Measles, Mumps, and Rubella, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

***National Reference Laboratory of Enteroviruses, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria

****Agro Bio Institute, Sofia, Bulgaria

*Corresponding author: svetla_georgieva@abv.bg, Department of Virology, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD), 44A "Gen. N. G. Stoletov" blvd., 1233 Sofia, Bulgaria

БЪЛГАРСКИТЕ ЧЕРВЕНИ БОРОВИНКИ ПРОЯВЯВАТ IN VITRO АНТИТУМОРЕН ПОТЕНЦИАЛ

Светла Ангелова *, **Ивелина Трифонова ***, **Силвия Волева ***, **Стефка Иванова ****,
Ирина Георгиева ***, **Ася Стоянова *****, **Ивайла Динчева ******

*Национална референтна лаборатория „Грип и ОРЗ, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България

**Национална референтна лаборатория „Морбили, паротит и рубеола“, Национален център по заразни и паразитни болести, София, България

***Национална референтна лаборатория ентеровируси, Национален център по инфекциозни и паразитни болести, София, България

****Институт Агро Био, София, България

*Автор-кореспондент: svetla_georgieva@abv.bg, Катедра по вирусология, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), бул. "Ген. Н. Столетов" № 44А, п.к.1233, София, България

Abstract

Antitumor activity of natural products with proven phytochemical properties and pharmacological significance are actively investigated in relation with identifying active substances that selectively suppress the proliferation of tumor cells. A promising candidate are Bulgarian cranberries from high mountain plant populations. They belong to a group of functional foods and are rich in various bioactive ingredients including phenolics and anthocyanins. Nowadays many studies have demonstrated their beneficial effects on different functions in the human body.

Aim: The present study aims to evaluate *in vitro*, antitumor potential of total methanol extracts and purified fractions (B- nonanthocyanin / C- anthocyanins) of *Vaccinium Vitis-Idaea L.*, picked in Bulgaria on human cervical (HeLa) and breast (MCF7) cancer cell lines.

Materials and methods: A total of four methanol extracts and respective number purified fractions (B- nonanthocyanin / C- anthocyanins) of cranberry picked in Bulgaria were used. Antitumor effect was established by MTT cell viability assay and Trypan Blue method.

Results: The results from MTT analyses showed that B- nonanthocyanin fractions of Bulgarian cranberry have well expressed inhibitory effect on survival of tested tumor cells. The observed effect dependent of the dose administered and were stronger in relation with the high-mountain populations and HeLa cell line.

Conclusion: The obtained results indicate the presence of antitumor properties in the spectrum of activities of the Bulgarian cranberries and support the further molecular analyzes for identification of the specific substances underlying this effect.

Acknowledgment: This work was supported by grant № DM 13/3 from 15.12.2017.

Key words: *Cranberries, antitumor activity, HeLa, MCF7*

Въведение

Честотата на раковите заболявания за последните десетилетия непрекъснато се увеличава и те се превръщат в сериозен проблем за съвременната наука и медицина. Една от основните причини за липсата на ефективна терапия е молекулярната хетерогенност на злокачествения процес. Наред с усилията за установяване на сложните генетични и епигенетични фактори, провокиращи канцерогенетичен процес е необходимо да се анализират и потенциалните активни субстанции в природни продукти и лечебни растения, които могат да забавят или дори да спрат прогресията на канцерогенезата. Понастоящем голяма част от лекарствените препарати, използвани в онкологичната практика, имат естествен произход. Постигане в това отношение е разработването на лекарствени препарати на основата на паклитаксела (изолиран от кората на *T. brevifolia*), винкристина и винбластин (извлечени от *C. roseus*) и подофилотоксин (получен от корени на *Podophyllum sp.*) (24) и др. Интензивните проучвания на фитохимичните свойства и фармакологично значение на българската флора, през последните години доведоха до получаване на природни продукти с антитуморен, антиоксидантен, антимикробен и имуномодулиращ ефект. Пример в това отношение е *Thaliblastine* (оригинален български медицински продукт с антинеопластичен ефект, добиван от *Th. aquilegifolium*) както и *Hyperatomarin* (*H. annulatum*), с доказан инхибиторен ефект върху клетъчни линии от хронична миелоидна левкемия (19).

Дивите ягодоплодни са отдавна известни със своите антисептични свойства, антиоксидантни и антимикробни активности и широко се използват в традиционната медицина при зрителни и сърдечно-съдови нарушения, както и при инфекции на пикочните пътища (25). Ярък представител на дивите горски плодове са боровинките (сем. Ericaceae, род *Vaccinium*). В България са разпространени предимно 3 вида – червена (*Vaccinium vitis-idaea L.*), черна (*Vaccinium myrtillus L.*) и синя (*Vaccinium uliginosum L.*). Понастоящем червената боровинка се отнася към групата на функционалните храни, тъй като експерименталните проучвания доказват тяхното благоприятно въздействие върху отделни функции в организма, свързани с намаляване на риска от редица патологични състояния, включително социално значимите, диабет и остеопороза.

Червената боровинка присъства в състава на редица лекарствени препарати за лечение на урогинетални инфекции (11), офталмологични заболявания (21), атеросклероза включително заболявания на нервната система, като болестта на Алцхаймер. Плодовете ѝ са богати на биоактивни съединения като: антоциани, полифеноли, витамини от група В, С, РР, магнезий, манган, желязо, органични киселини, гликозиди и др. (2). Литературната

справка показва засилен интерес към оценка на антитуморният потенциал на различни активни фракции от боровинки (10, 12).

До момента в България са публикувани единствено данни от изследванията на Nikolaeva-Glomb и колектив (18) върху антивирусния потенциал на различни диви ягодоплодни, включително черни и червени боровинки.

В тази връзка настоящото проучване цели да се анализира *in vitro* потенциалната антитуморна активност на тотални екстракти и фракции от червени боровинки от български растителни популации, върху туморни (от рак на млечната жлеза и от рак на маточната шийка) клетъчни линии (MCF7/HeLa) и да се изследват някои от механизмите, включително морфологични изменения асоциирани с апоптотична прогресия в основата на проявен антитуморен ефект с помощта на съвременни молекулярни методи

Методи и материали

Растителен материал

За целите на анализите през 2018 година бяха проучени естествените находищата на диворастящи червени боровинки, в районите на Стара планина и Родопска планина и бяха подбрани четири растителни популации, развиващи се на различна надморска височина: хижа Васильов - GPS: 42°52.753'N 24°28.968'E; н.в.: 1360м; местност Беклемето - GPS: 42 46.460'N 24 37.000'E н.в.:1470м; хижа Перелик - GPS: 41°36.400'N 24°35.805'E; н.в.:1970м; крепост „Градище“ над село Гела - GPS: 41°37.967'N 24°33.183'E н.в.:1780м. във връзка с литературните данни за наличие на значителни вариации в химичния състав и съдържанието на биологично активни вещества в диворастящи видове, обитаващи различни географски региони и растящи при специфични почвено-климатични условия (5). Растителният материал от набелязаните храсти (с отстояние един от друг минимум 10 метра) беше събран в средата на характерния за съответния район беритбен период и беше подложен на фракциониране.

Получаване на базови екстракти и фракции

Събраните плодове бяха смлени в мелница и лиофилизирани. Така приготвената лиофилизирана биомаса беше екстрахирана трикратно по 10 минути на ултразвук с разтвор съдържащ 80% разтворител А [AcN-MeOH (80:20 (v/v))] и 20% разтворител В [0.1% воден разтвор на HCOOH] и изпарена под вакуум. Получените извлеци бяха подложени на фракциониране, посредством твърдофазова екстракция (SPE) чрез използване на колонки Giga: 2 g / 12 ml, C18-E единици (Strata, Phenomenex®). Преди нанасяне на базовите екстракти, колонките бяха кондиционирани с подвижните фази, използвани за елуиране на отделните фракции в следния ред: 12 мл 0.1% (v/v) мравчена киселина в ацетонитрил; 12 мл етилацетат; 12 мл 0.1% (v/v) мравчена киселина във вода. Базовите екстракти бяха разтваряни в минимален обем 0.1% v/v мравчена киселина във вода преди нанасяне в колонките. Полярните метаболити - фракция „А“ беше елуирана с 2 x 12 мл 0.2% (v/v) мравчена киселина във вода. Фракциите „А“, съдържащи захари, органични киселини и аминокиселини, не са обект на това изследване. Неантоциановите съединения - фракция „В“ бяха елуирани с 2 x 12 мл. Антоциановите вещества - фракция „С“ беше елуирана с 2 x

12 мл 0.1% (v/v) мравчена киселина в ацетонитрил. Получените фракции "В" и "С" бяха изпарени до сухо под вакуум при $t > 40$ °C.

Описание на пробите

На фракционен анализ беше подложен растителен материал от плодове на *Vaccinium vitis-idaea L* събрани от предварително подобрани и проучени четири различни находища. Получените четири тотални извлеци приехме да означаваме по следния начин - Тv (хижа Васильов); Тb (местност Беклемето); Тp (хижа Перелик); Тg (крепост „Градище“ над село Гела). Всеки от четирите тотални извлеци беше подфракциониран, в резултат на което бяха елуирани следните фракции: С - антоцианови (Cv, Cb, Cp, Cg) и В - неантоцианови/полифенолни (Vv, Vb, Vp, Vg).

Клетъчни линии

В изследвания бяха използвани две човешки туморни клетъчни линии: HeLa и MCF7. HeLa е получена от пациентка с рак на маточната шийка. Линията е широко използвана за *in vitro* анализи вече повече от петдесет години. MCF7 е най-често използваната в научните изследвания клетъчна линия от рак на млечната жлеза (РМЖ). Получена е от плеврален ексудат на пациентка с метастатичен РМЖ. Клетъчните линии са част от колекцията на АТСС.

При клетъчното култивиране беше използвана хранителна среда EMEM (Gibco) с 10 % фетален телешки серум (FBS) и 1 % натриев пируват. При работа с клетъчните култури бяха използвани ламинарни боксове, инкубатор поддържащ 37°C и 5% CO₂, както и фабрично стерилни консумативи и химикали.

Трупан Blue анализ.

Третираните за 48 ч и 72 ч туморни клетки от MCF7/HeLa линиите с тотален извлек и полифенолни / антоцианови фракции от *Vaccinium vitis-idaea L* бяха отлепени с помощта на 0.05 % трипсин - 0.53 mM EDTA, инкубирани за 15 мин. на 37°C и събирани в епруветки. След центрофугиране за 5 мин. при 125G, супернатантата беше отстранявана а получената утайка от клетки беше промита двукратно с PBS. Аликвоти от 50µl клетъчна суспензия бяха оцветени с равен обем 0.4% разтвор на *trypan blue* и след инкубация за 10 мин. при стайна температура визуално под микроскоп беше наблюдавано дали клетките го усвояват или изключват. Живите (неоцветени) клетки и мъртвите (сини) се изброяват с помощта на броителна камера в 5 произволно подобрани квадрата. Процентът на жизнеспособните клетки беше изчисляван по формулата:

$$\text{Жизнеспособност (\%)} = (\text{брой живи клетки} / \text{общ брой клетки}) \times 100$$

MTT анализ

MTT анализът беше проведен при следните условия: клетките бяха инокулирани в 96 ямкови плаки (1×10^5 кл/ямка) и инкубирани в пълноценна хранителна среда за 24 часа. Следваше третиране с различни концентрации (от 0.5 to 1000 µg тест субстанция/ml среда) от анализирани базовите извлеци/фракции в продължение на 48 и/или 72 часа. Диапазонът от тестови концентрации беше съобразен с наличните данни в литературата

(Nikolaeva-Glomb и съавт., 2013, Voivin и съавт., 2007) за липса на клетъчна токсичност. В последните 3 часа на инкубирането бяха добавяни по 10µl/ямка МТТ (сток 5 mg/ml). След инкубирането средата беше отстранявана и полученият виолетов формазанов комплекс беше разтварян чрез накапване на 100 µl/ямка от предварително приготвената смес DMSO/ЕТАНОЛ в съотношение 1:1. Абсорбцията на получения комплекс беше определяна при дължина на вълната от 540nm. За достоверност на получените резултати от МТТ анализа всеки експеримент беше повторен, а всяка от анализирани концентрации присъстваше в три повторения.

Резултати

Трупан Blue тестът дава възможност да се определи бързо и точно броя живи клетки в клетъчна суспензия. Базиран е на принципа, че живите клетки притежават интактни клетъчни мембрани, които изключват багрилото Трупан Blue, за разлика от мъртвите клетки. Резултатите от проведения тук Трупан Blue тест показаха, че процентът на жизнеспособност на MCF7 клетъчната линия е $95,02\% \pm 2,31$ (SD), а този на HeLa е $96,04\% \pm 2,51$ (SD). Тези стойности удовлетворяват напълно следващия МТТ анализ.

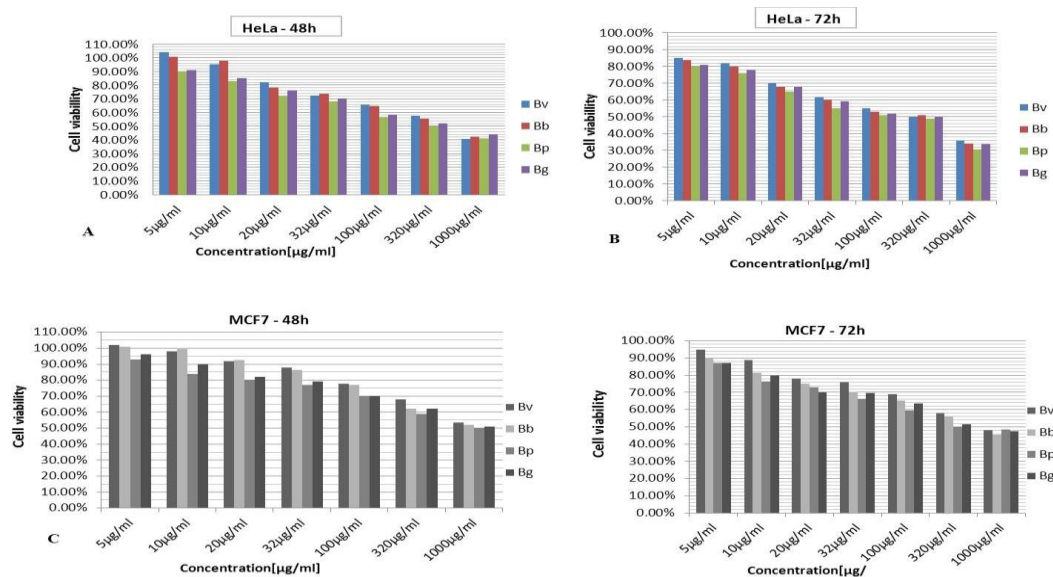
Относителната клетъчна преживяемост на туморните клетки след третиране с базови екстракти (Tv, Tb, Tr и Tg) и фракции "C" (Cv, Cb, Cr и Cg) и "B" (Bv, Bb, Br и Bg) от червени боровинки беше анализирана с помощта на МТТ метод. Методът се основава на способността на живите клетки да усвояват разтворимата тетразолиева сол 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид (МТТ), превръщайки я в неразтворим формазан. МТТ анализът е сравнително бърз, количествен и високо възпроизводим. За антитуморна активност се съди по IC50 (half maximal inhibitory concentration) - концентрацията на активното вещество, необходима за редуциране на преживяемостта до 50%. Ефектът на базовите екстракти и полифенолни-В/ антоцианови-С фракции от боровинки върху преживяемостта на клетките от раковите (на гърдата (MCF-7) и (шийката на матката HeLa) клетъчни линии беше оценен чрез паралелното им третиране за 48/72 часа с широк набор от концентрации на тестовите субстанции, вариращи в диапазона от 5 до 1000 µg / ml, като беше използвана средата за култивиране като разтворител. Диапазонът на концентрациите (5, 10, 20, 32, 100, 320, 1000 µg B / ml) за МТТ беше избран съгласно предишни данни за нетоксични свойства и ефект (антивирусен) на базов екстракт и / или фракции от горски плодове. относно жизнеспособността на различни човешки клетъчни линии, в това число и човешки (18). Нетретирани туморни клетки бяха използвани като контроли и тяхната жизнеспособност беше приемана за 100%.

МТТ анализ на базови екстракти (Tv, Tb, Tr и Tg) и фракции "C" (Cv, Cb, Cr и Cg) от червени (*Vaccinium vitis-idaea* L.) боровинки събрани от различни растителни популации в България върху MCF-7 и HeLa туморни клетъчни линии

Резултатите показаха липса на ефект върху туморните клетки от рак на гърдата и тези от рак на шийката на матката и висока преживяемост (над 100%) на контролните клетки при третирането им за период от 48 и 72 часа с всички анализирани концентрации (5, 10, 20, 32, 100, 320, 1000 µg B / ml) на тотални екстракти и С фракции от червени боровинки.

МТТ анализ на полифенолни фракции "B" (Bv, Bb, Bp и Bg) от български червени боровинки върху туморните клетъчни линии - MCF-7 и HeLa

Получените резултати показаха, че B - неантоциановите фракции от боровинки, имат добре изразен дозо и времезависим ефект върху жизнеспособността на клетъчни линии от тумори на гърдата и маточната шийка. В диапазона на по-ниските концентрации (до 5 µg B / ml среда) жизнеспособността на туморните клетки беше висока и сравнима с тази на контролата от нетретирани клетки, но с увеличаването на концентрацията беше отчетено стабилно намаляване на жизнеспособността на раковите клетки (Фигура 1). IC50 беше достигнато при концентрации в диапазона 100 - 320µg B / ml среда за HeLa клетките и 320-1000 µg B / ml среда за MCF7 клетките от рак на гърдата, третирани в продължение на 48 и 72 часа с различните подлежащи на анализ B - фенолни фракции от бовинки. Най-значимият антитуморен ефект беше наблюдаван под действието на B-фракции получени от представители на високо планинските популации развиващи се на най голяма надморска височина.



Фигура 1. МТТ анализ на HeLa (A / B) и MCF7 (C / D) туморни клетъчни линии, третирани в продължение на 48 (A / C) и 72 (B / D) часа с нарастващ спектър от концентрации на B - неантоцианинови фракции от *Vaccinium vitis-idaea L.* получени от растителни популации в района на: Стара планина - Васильов (Bv) и Veclemeto (Bb) и Родопска планина - Perelik (Bp) и Gela (Bg).

Дискусия

През последните години се наблюдава засилен интерес и интензивно се изследват редица растителни природни продукти, като потенциален източник на активни компоненти подходящи за лечение и превенция на онкологични заболявания. Извечно е, че

за период от 1940 г. до 2010 г. 48,6% от общо 175-те активни на нано ниво съединения одобрени за приложение в онкологичната практика, са растителни или природни продукти (17). Биологичната активност на лечебните растения до голяма степен зависи от химичния им състав. Предполага се, че фитоелементите, особено тези с полифенолна природа в плодовете, са ключови за правилното функциониране на редица органи и системи в човешкото тяло. Прието е, полифенолните екстракти от растителни източници да се разглеждат, като смес от различни класове подобни съединения (6, 22). Плодовете от боровинки съдържат високи нива на флавоноидни съединения, с обща молекулярна структура - трицикличен С6-С3-С6 "флавоноиден скелет" (5, 20). Високото съдържание на полифеноли при червените боровинки *Vaccinium vitis-idaea L.* и наличните литературни данни за тяхната антимулагенна, противовъзпалителна и антимикробна активност предполагат и наличие на висок антитуморен потенциал (2, 8).

По наше знание, настоящото проучване е първото съобщаващо за антитуморна активност на полифенолни фракции от *Vaccinium vitis-idaea L.* от български планински популации. Изследванията са проведени с помощта на МТТ анализ – нов и високочувствителен метод за оценка на клетъчна жизнеспособност при третиране с широк набор от концентрации от базови екстракти и фракции от лечебни природни продукти. На анализ бяха подложени две туморни клетъчни линии - от рак на гърдата и от рак на маточната шийка. При пороведеният МТТ анализ беше установено значително намаляване на жизнеспособността на раковите клетки след третирането им широк спектър от концентрации на полифенолните фракции „В“ от червени боровинки. Отчетеният антитуморен ефект показва, както дозова така и времева зависимост. Неантоциановите фракции упражняваха по – силен инхибиторен ефект върху преживяемостта на клетките от рак на маточната шийка в сравнение с този при клетките от рак на гърдата. Беше установено също, че инхибиторните концентрации IC50 за полифенолните фракции варират при третираните на HeLa и MCF7 клетките в продължение на 48 и 72 часа и са най ниски за представителите на високопланинските популации.

Понастоящем в литературата бяха открити статии, излагащи данни от *in vitro* проучвания на атипипролиферативни свойства и инхибиращи ефектите върху множество етапи на канцерогенеза на различни антоцианови и полифенолни съставки в екстракти от боровинки и други диви ягодоплодни, като ягоди, малини и капини върху редица човешки карциномни линии като: KB, CAL-27 – от малигнени формации в устната кухина, MCF-7 – рак на гърдата, HT-29, HCT116 - дебелото черво, LNCaP - проста (13, 15, 23). В съответствие с нашите резултати и други автори установяват инхибиране на клетъчна жизнеспособност и пролиферация след третиране на ракови клетъчни линии с нарастващ диапазон от концентрации на екстракти от ягодоплодни, в това число и боровинки (3,7, 9, 10, 12, 14, 16).

Разликите в стойностите на IC50 между публикациите вероятно се дължат както на различната лекарствена чувствителност на изследваните туморни клетъчни линии, така и на разнообразието в химичния състав и условията на околната среда на растенията от различни географски области и популации. Данните в литературата показват, че по-големи количества активни полифенолни компоненти се откриват в проби, събрани от находища, изложени на по- дълга слънчева експозиция в сравнение с тези със сенчести местообитани.

Освен това е установено, че при растенията развиващи се на надморска височина над 1500 m полифенолната фракция е с най високо съдържание на активни компоненти (5).

През последните години редица литературни източници съобщават, че полифенолите, антоцианите и флавоноидите в състава на боровинките и други ягодоплодни, могат да потиснат туморогенезата и метастазирането чрез инициране на апоптоза в туморните клетки (7, 13, 26, 27). Процесът е свързан с активиране на клетъчните ендонуклеази нарушаващи интактната структура на клетъчната ДНК до добре диференцирани фрагменти, които могат да се визуализират чрез гел електрофореза (1). Подобни данни за индуциране на апоптоза чрез блокиране на клетъчния цикъл в G1 фазата при MCF7 клетки е установено от Masoudi M и Saiedi M (15) под действие на базови екстракти от плодове на *V. Oxycoccos*.

В заключение, В- неантоциановите, полифенолни плодови фракции от български червени боровинки показват дозо-зависим инхибиторен ефект върху жизнеспособността на раковите клетки от тумори на гърдата и на шийката на матката. В механизмите на антитуморния ефект вероятно участват апоптотични процеси. Получените тук резултати са пионерни, показващи антитуморна активност на българските червени боровинки и са показателни за по-нататъшни по-детайлни изследвания на активните съставки, определящи антитуморната активност на растението.

Благодарност

Авторите изказват благодарност на ФНИ и договор № ДМ 13/3 от 15.12.2017 за финансовата подкрепа.

Литература

1. Arden, N., Betenbaugh M.J., "Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition". Trends Biotechnol., 22(4):174-180, 2004.
2. Battino, M., Beekwilder, J., Denoyes-Rothan, B., Laimer, M., McDougall, G., Mezzetti, B., "Bioactive compounds in berries relevant to human health". Nutr. Rev., 67, S: 145–150, 2009.
3. Dhandapani, K. M, Mahesh, V. B, Brann, D.W., "Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors". J Neurochem., 102(2): 522-38, 2007.
4. Dincheva I., Badjakov I., Angelova S., Georgieva I., Genova-Kalu5 P., Stoyanova A., Nikolaeva-Glomb L., Nestby R., Kondakova V., 2017. "In vitro antitumor activity of proanthocyanidin-rich fractions from vaccinium berries originating from Bulgaria and Norway". 3rd International Conference on Natural Products Utilization, 18.10.-21.10.2017, Bansko, Bulgaria, pp 61.
5. Dincheva, I., Badjakov, I., "Assesment of the Anthocyanin Variation in Bulgarian Bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium Vitis-Idaea* L.)". IJMPS, 6(3): 39-50, 2016.
6. Es-Safi, N., 2012. "Plant Polyphenols: Extraction, Structural Characterization, Hemisynthesis and Antioxidant Properties". In: Rao DV, editor. Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health: INTECH, pp. 181-206.

7. Etienne-Selloum, N., Dandache, I., Sharif, T., Auger, C., Schini-Kerth, V.B., 2013. "Polyphenolic compounds targeting p53-family tumor suppressors: Current progress and challenges". In Future aspects of tumor suppressor gene. IntechOpen.
8. Heinonen, M., "Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - a Finnish perspective". *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (6): 684-691, 2007.
9. He X., Liu R.H., "Cranberry phytochemicals: isolation, structure elucidation and their antiproliferative and antioxidant activities". *J Agric Food Chem.*, 54, 7069–7074, 2006.
10. Hossain, M.M, Banik, N.L, Ray S.K., "Synergistic anti-cancer mechanisms of curcumin and paclitaxel for growth inhibition of human brain tumor stem cells and LN18 and U138MG cells". *Neurochem Int.*, 61(7): 1102-1113, 2012.
11. Jepson, R.G.,Williams, G.; Craig, J.C., 2012. "Cranberries for preventing urinary tract infections". *Cochrane Database Syst. Rev.*, 10, CD001321.
12. Jurikova, T., Skrovankova, S., Mlcek, J., Balla, S., Snopek, L., "Bioactive compounds, antioxidant activity, and biological effects of european cranberry (*vaccinium oxycoccus*)". *Molecules*, 24(1): 24, 2019.
13. Kizhakkayil, J., Thayyullathil, F., Chathoth S., Hago, A., Patel, M., Galadari, S., "Modulation of curcumin-induced Akt phosphorylation and apoptosis by PI3K inhibitor in MCF-7 cells". *Biochem Biophys Res Commun.*, 394(3): 476-81, 2010.
14. Kondo, M., 2006. "Phytochemical studies of extracts from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) with anti-cancer, anti-fungal and cardioprotective properties". M.S. Thesis, University of Massachusetts Dartmouth.
15. Masoudi, M., and Saiedi, M., "Anti-carcinoma activity of *Vaccinium oxycoccus*". *Pharm. Lett.*, 9, 74–79, 2017.
16. Neto, C.C., 2007. "Cranberry and its phytochemicals: a review of in vitro anticancer studies". *J Nutr.*, 137, 186S 193S.
17. Newman, D. J., Cragg, G. M., „Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010“. *J Nat Prod.*, 75(3): 311-35, 2012.
18. Nikolaeva-Glomb, L., Mukova, L., Nikolova, N., Badjakov, I., Dincheva, I., Kondakova, V., Doumanova, L., Galabov, A.S., "In vitro antiviral activity of a series of wild berry fruit extracts against representatives of Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae". *Nat Prod Commun.*, 9(1): 51-4, 2014.
19. Nikolov, S., Momekov, G., Kitanov, G., Ionkova, I., Krasteva, I., Toshkova, R., Konstantinov, S., Nedialkov, P., Karaivanova, M., "Exploitation of the Bulgarian flora's biodiversity as a source of immunomodulatory and/or antineoplastic agents: current challenges and perspectives". *Biotechnol & Biotechnol Equipment*, 21(4): 471-477, 2007.
20. Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C., „Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species“. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46, 2686-2693. 1998.
21. Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Alakomi, H., Oksman-Caldentey, K., "Bioactive berry compounds – novel tools against human pathogens". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 8-18, 2005.

22. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysegu, L., "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis". *Angewandte Chemie*, 50(3): 586-621, 2011.
23. Seeram, N.P.; Adams, L.S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H.S.; Heber, D., "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro". *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9329 – 9339, 2006.
24. Shoeb, M., "Anticancer agents from medicinal plants". *Bangladesh J Pharmacol.*, 1, 35-41, 2006.
25. Singh, I., Gautam, L.K., Kaur, I.R., "Effect of oral cranberry extract (standardized proanthocyanidin-A) in patients with recurrent UTI by pathogenic E. coli: a randomized placebo-controlled clinical research study". *Int Urol Nephrol.*, 48(9): 1379-86, 2016.
26. Singh, N., Zaidi, D., Shyam, H., Sharma, R., Balapure, A.K., "Polyphenols sensitization potentiates susceptibility of MCF-7 and MDA MB-231 cells to Centchroman". *PloS one.*, 7(6): e37736, 2012.
27. Walter, A., Etienne-Selloum, N., Brasse, D., Khallouf, H., Bronner, C., Rio, M.C., "Intake of grape-derived polyphenols reduces C26 tumor growth by inhibiting angiogenesis and inducing apoptosis". *FASEB journal*, 24(9): 3360-9, 2010.