

Puolukan vaikutus kielisyöpäsolumen proliferaatioon

Jenni Vesterlin

Hammaslääketieteen kandidaatti

Suu- ja leukasairauksien osasto

Helsinki 17.01.2018

Tutkielma

jenni.vesterlin@helsinki.fi

Ohjaaja: Professori Tuula Salo

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Suu- ja leukasairaudet	
Tekijä – Författare – Author Jenni Vesterlin			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Puolukan vaikutus kielisyöpäsolujen proliferaatioon			
Oppiaine – Läroämne – Subject Hammaslääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma	Aika – Datum- Month and Year 17.01.2019	Sivumäärä-Sidoantal -Number of pages 12+7 sivua	
<p>Kielisyöpä luokitellaan suuontelon syöpiin, jotka ovat yleisimpiä pään ja kaulan alueen syöpiä. Kielisyövällä on useita altistavia ja suojaavia tekijöitä. Terveellisten elintapojen on esimerkiksi osoitettu suojaavan syövältä, ja ruokavaliossa kasvikset ja vihannekset vähentävät syöpäriskiä merkittävästi. Puolukka sisältää erilaisia polyfenoliyhdisteitä, joiden on todettu muun muassa vaikuttavan solun sisäisiin signaalireitteihin ja suojaavan soluja oksidatiiviselta stressiltä.</p> <p>Tutkielmani hypoteesina oli, että puolukkauute vähentää kielisyöpäsolujen jakaantumista eli proliferaatioita <i>in vitro</i>.</p> <p>Laboratoriokokeissani analysoin kahta kaupallista kielisyöpäsolulinjaa (SCC-25 ja HSC-3). Käytin kolmea eri fermentoidun puolukkauutteen (Fermented Lingonberry Juice, FLJ) konsentraatioita (500 µg/ml, 2500 µg/ml ja 5000 µg/ml) ja vertasin eri uutemäärien vaikutusta kontrollisolujen jakaantumiseen. Proliferaatiota tutkin enzyme linked immunosorbent assay, eli ELISA-menetelmällä BrdU-merkkiaineen avulla käyttäen Cell proliferation, ELISA BrdU -kittiä. Analysoin tulokset mittaamalla solujen lukumäärää kuvaavat absorbanssiarvot ja tein tuloksista tilastolliset analyysit.</p> <p>Puolukkauute vähensi merkitsevästi suurempina (2500 µg/ml ja 5000 µg/ml) pitoisuuksina molempien kielisyöpäsolulinjojen proliferaatiota. Solulinjojen välillä oli eroa siten, että FLJ teho oli suurempi vähemmän aggressiiviselle SCC-25 solulinjalle kuin selkeästi aggressiivisemmälle HSC-3 solulinjalle.</p> <p>Yhteenvedona voin todeta, että puolukkauute vähensi kielisyöpäsolulinjojen jakaantumista <i>in vitro</i> mahdollisesti marjassa olevien polyfenoliyhdisteiden ansiosta. Tarkka mekanismi puolukan sisältämien yhdisteiden vaikutuksesta syöpäsolujen jakaantumisen ehkäisemisessä ei kuitenkaan ole vielä selvillä, vaan lisätutkimusta molekyyli-tason mekanismien selvittämiseksi tarvitaan.</p>			

Tulokseni on julkaistu In VIVO –julkaisusarjassa 2018 ja alkuperäisartikkeli on tutkielmani liitteenä.

(203 sanaa)

Avainsanat –Nyckelord –Keywords

puolukkauute; kielisyöpä; proliferaatio

Säilytyspaikka –Förvaringställe –Where deposited

Tiedekunnan kanslia toimittaa Terkkoon. Opiskelija tallettaa sähköisen version Heldaan

Muita tietoja –Övriga uppgifter –Additional information

Sisällysluettelo

1. Kielisyöpä.....	1
1.1 Kielisyöpä sairautena	1
1.2. Kielisyövälle altistavat tekijät	2
1.3 Kielisyövältä suojaavia tekijöitä	2
2. Puolukan sisältämät terveyttä edistävät yhdisteet	3
3. Tutkimuksen tarkoitus	4
4. Menetelmät ja materiaalit	4
4. 1 Soluviljely ja käytetyt solulinjat.....	4
4.2 Fermentoitu puolukkaute.....	5
4.3 Proliferaatioanalyysi.....	5
5. Tulokset	6
6. Pohdinta.....	6
7. Lähteet	8
8. Liite.....	12

1. Kielisyöpä

1.1 Kielisyöpä sairautena

Kielisyöpä luokitellaan suuontelon syöpiin, jotka ovat yleisimpiä pään ja kaulan alueen syöpiä (1). Kielisyövällä tarkoitetaan malignia kasvainta, joka ilmestyy kielen etuosaan ensimmäisen $\frac{2}{3}$ -osan alueelle, kun taas kielen takaosiin ilmestyvät pahanlaatuiset kasvaimet luokitellaan suunielun alueen syöviksi (2). Suomen syöpärekisterin mukaan kielisyövän ilmaantuvuus on lisääntynyt erityisesti nuoremmilla henkilöillä. Miehillä ilmaantuvuus on vähentynyt ja toisaalta naisilla taas lisääntynyt (3). Suuontelon syöivistä suurin osa (90-95 %) on levyepiteelikarsinoomia. Levyepiteelikarsinomat jaetaan eri tyyppeihin erilaistumisensa mukaan. Yleisimpiä ovat erilaistumattomat karsinomat. (1, 2, 4)

Ensimmäisiä kielisyövän oireita ovat usein erilaiset limakalvovalesiot tai haavaumat, jotka paranevat melko huonosti ja ovat usein kivuttomia (5). Ensimmäinen oire saattaa myös syntyä, kun kasvain on jo muodostanut metastaaseja ja se voi ilmentyä kyhmyinä kaulassa. Kaulan alueen kyhmyt voivat kivuliaisuuden osalta vaihdella aritamattomasta hyvin kivuliaaseen ja aristavaan kyhmyyn. (6) Koska kielisyövän oireet ovat varsinkin alussa melko huomaamattomia, tulee diagnoosi usein melko myöhäiseen vaiheeseen ja potilaiden ennuste onkin tästä johtuen melko huono, huolimatta siitä, että hoitomenetelmät ovat kehittyneet. (5,6) Levyepiteelikarsinoma lähettää metastaaseja imusolmukkeisiin ja suuontelon alueen syövät lähettävät niitä helposti kaulan ja submandibulaarisen alueen imusolmukkeisiin sijaintinsa vuoksi (4). Metastaaseja voi myöhemmin ilmentyä myös keuhkoissa, maksassa ja luissa (7).

1.2. Kielisyövälle altistavat tekijät

Kielisyövälle on löydetty joitakin altistavia tekijöitä erityisesti tupakka ja alkoholi ja tupakoitsijoiden riski sairastua suusyöpään on kuusinkertainen tupakoimattomiin verrattuna (8). Kielisyövissä on osallisena melko runsaasti niin sanottuja elintapa-altisteita, joista erityisen merkittävä on alkoholin ja tupakan lisäksi betelpähkinän jauhaminen muun muassa Kaakkois-Aasian ja Tyynenmeren saarten alueella (9). Elintapa-altiste viittaa käsitteenä yksilön omien valintojen mukaan hankittuun riskitekijään, esimerkiksi runsaaseen alkoholin käyttöön. Muita altistavia tekijöitä ovat runsas punaisen lihan syönti ja huono suuhygienia, erityisesti yhdessä alkoholin ja tupakan suurkulutuksen kanssa (10). Joillakin henkilöillä tiettyjen vitamiinien tai hivenaineiden, esimerkiksi C- ja E-vitamiinien tai raudan puute, voi myös toimia altistavana tekijänä, mutta puutoksen merkitys suusyövissä on epäselvä (11).

Edellä mainittujen elintapatekijöiden lisäksi tiettyjen suun alueen leesioiden on todettu lisäävän riskiä sairastua kielisyöpään samoin myös geneettisen alttiuden, korkean iän ja joidenkin autoimmuunitautien (12). Kielisyöpää tavataan melko harvoin alle 40-vuotiailla, mutta kielisyövän ilmaantuvuus on kuitenkin lisääntynyt myös nuorilla (3). Nuorten kielisyövän lisääntymisen syyt ovat vielä osittain epäselviä, mutta johtuvat todennäköisesti usean eri altistavan tekijän summasta (13).

1.3 Kielisyövältä suojaavia tekijöitä

Kielisyövälle on löydetty suojaavia tekijöitä, kuten liikunta ja terveellinen ruokavalio, joiden edullinen vaikutus kohdistuu monen muunkin syövän ehkäisyyn ja yleisterveyden paranemiseen tai ylläpitoon. Terveellinen ruokavalio voi toimia ehkäisevänä tekijänä syövän lisäksi monissa muissa sairauksissa ja se vähentää muun muassa sydän- ja verisuonitauteihin sairastuvuutta, ylipainoa ja Alzheimerin taudin riskiä. (14, 15, 16, 17)

Maailman terveysjärjestö WHO, World Health Organization on arvioinut, että jopa 10-15 % suun alueen syöivistä liittyy liian vähäiseen hedelmien ja vihannesten kulutukseen (18).

Kasvisten syövältä suojaavien ominaisuuksien on ajateltu liittyvän niiden sisältämiin yhdisteisiin, kuten antioksidantteihin, flavonoideihin, karotenoideihin ja folaatteihin. Nämä yhdisteet vähentävät solun oksidatiivista stressiä (19) ja niiden on ajateltu toimivan suojaavina tekijöinä myös suusyöpää altistavia tekijöitä vastaan (9). Pavia et. al osoittivat meta-analyysissään, että suusyövän riski vähenee jokaista päivittäin nautittua hedelmä- tai vihannesannosta kohden (20).

2. Puolukan sisältämät terveyttä edistävät yhdisteet

Puolukka (*Vaccinium vitis-idaea*) sisältää runsaasti terveyttä edistäviä yhdisteitä, kuten flavonoideja ja antosyaaneja, jotka luokitellaan polyfenoli-yhdisteisiin (21). Polyfenoleja esiintyy runsaasti kasveissa ja niillä on erilaisia funktioita, kuten kasvien suojaaminen erilaisilta sieni- ja bakteeri-infektioilta, jonka lisäksi polyfenolit ovat tärkeässä osassa myös kasvien pigmenttien tuotossa. Ne voidaan jaotella hiilirungosta koostuvan rakenteensa mukaan muun muassa bentsokinoneihin, fenolihappoihin, flavonoideihin ja kondensensoituihin tanniineihin. (22)

Puolukassa esiintyvien polyfenolien terveyttä edistävät vaikutukset ovat edelleen osin epäselviä ja etenevän tutkimuksen kohteena. Niiden rooli kasvien metaboliassa tunnetaan jokseenkin hyvin, mutta niiden ravitsemuksen kautta saatavaa hyötyä on hankala määrittää muun muassa niiden vaihtelevan biologisen hyötysuhteen vuoksi (23).

3. Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, onko fermentoidulla puolukasta valmistetulla uutteella merkittävää vaikutusta kielen levyepiteelisyöpäsolujen (Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma, OTSCC) proliferaatioon. Ongelmaa lähestyttiin solujen altistuksella puolukkauutteelle (Fermented lingonberry juice, FLJ), proliferaatioanalyysillä ja analyysin tilastollisella tulkinnalla.

Oma osuuteni tutkimuksessa oli annostella syöpäsoluille puolukkauutetta eri konsentraatioin, tehdä proliferaatioanalyysi valmistajan ohjeiden mukaisesti ja mitata näytteiden absorbanssiarvot, jotta niistä voitaisiin tehdä tilastollinen analyysi tulosten tulkitsemiseksi. Syventävien opintojen tutkimuksen tarkoituksena oli myös ymmärtää kielisyöpää sairautena ja pohtia sen esiintymistä ja syöväälle altistavia ja ehkäiseviä tekijöitä, joita on tarkasteltu lähemmin johdannossa.

4. Menetelmät ja materiaalit

4.1 Soluviljely ja käytetyt solulinjat

Käytin tutkimuksessa kahta eri solulinjaa, HSC-3 (Japan Health Sciences Foundation, Japan) ja SCC-25 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), jotka viljelin DMEM/F12 kasvatusliuoksessa (Gibco). Kasvatusliuos sisälsi 10 % naudan sikiön seerumia (Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/ml penisilliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä, 250 ng/ml amfoterisiini B:tä, 0,4 µg/ml hydrokortisonia ja 50 µg/ml askorbiinihappoa. Tarkoitukseni oli käyttää tutkimuksessa myös kolmatta solulinjaa (CAF, *cancer associated fibroblasts*), mutta saadut tulokset eivät olleet johdonmukaisia ja keskiarvopoikkeamia esiintyi liikaa, joten en voinut arvioida tuloksia luotettavasti tilastollisin menetelmin.

4.2 Fermentoitu puolukkauute

Tutkimuksessa käytössäni oli fermentoitu puolukkauute (*Fermented Lingonberry Juice*, FLJ), jota annostelin soluille eri konsentraatioin. Puolukkauute oli valmistettu Pirjo Pärnäsén patentoimasta puolukkavalmisteesta (24) ja sen konsentraatio oli 0.1g/ml. Valmisteessa lähtöaineena oli puolukkamehu, josta sokerit oli poistettu fermentaation avulla. Fermentaatioissa sokerit poistettiin *Saccharomyces cerevisiae*-hiivalla ja hiivasolut poistettiin uutteesta myöhemmin. Preparaatin alkuperäinen indikaatio on ollut suun mikrobikoostumuksen tasapainottaminen ja siitä on valmistettu imeskelytabletteja, joiden tarkoituksena on inhiboida haitallisten mikrobien kasvua ja edistää probioottisten bakteerien määrää suun mikrobistossa.

4.3 Proliferaatioanalyysi

Toteutin solujen proliferaatioanalyysin valmistajan proliferaatioanalyysiin tarkoitetulla välineistöllä (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit, Roche) ohjeiden mukaan. Viljelin solut 96-osaisella kuoppalevyllä, jossa jokaisen kuopan solutiheys oli 5000 solua 200 mikrolitrassa. Soluille antamani FLJ konsentraatiot olivat 1, 5 ja 10 mikrolitraa yhtä kuoppaa kohden, näin ollen kokonaiskonsentraatiot olivat 500 µg/ml, 2500µg/ml ja 5000µg/ml. Otin jokaisesta FLJ konsentraatiosta kolme otosta yksittäisen kokeen aikana. Lisäksi mukana oli kolmen otoksen kontrolli, jossa ei ollut FLJ:tä ollenkaan. FLJ lisäyksen jälkeen jätin solut inkubaattoriin, optimaalisiin kasvuolosuhteisiin (37°C) 48 tunnin ajaksi.

Inkubaatioajan jälkeen lisäsin soluihin BrdU-merkkiaineen. BrdU (5-Bromo-2-deoksiuridiini) on pyrimidiini analogi, joka kiinnittyy äskettäin syntetisoituun DNA:han, korvaten tymidiinin (25) Lisäyksen jälkeen jätin solut edelleen inkuboitumaan 2 tunnin ajaksi inkubaattoriin. Inkubaatioajan jälkeen lisäsin soluihin FixDenat-liuosta DNA:n denaturoitumiseksi. Annoin FixDenat-liuoksen vaikuttaa 30 minuuttia huoneenlämmössä (21-25 °C), jonka jälkeen poistin sen kuoppalevyiltä huolellisesti. Tämän jälkeen, lisäsin denaturoituneeseen DNA:han Anti-BrdU-POD vasta-aine-liuosta 1:100 suhteen laimennoksella ja annoin sen vaikuttaa 90 minuuttia huoneenlämmössä (21-25 °C). Anti-BrdU-POD liuoksen vaikutuksesta anti-BrdU-vasta-aine sitoutuu denaturoituneeseen DNA:han (26). Poistin vasta-ainekonjugaatin vaikutusajan jälkeen ja huuhdoin kaikki käytössä olleet kuopat fosfaattipuskurilla (Phosphate Buffered Saline, PBS), käyttäen

puskuriliuosta 250 µl/kuoppa. Toistin huuhtelun kolme kertaa. Huuhtelun jälkeen lisäsin kuoppiin substraattiliuosta, jonka reaktio vasta-aineen kanssa luo liuoksen värin. Mittasin värin abosorbanssiarvon Thermo Fisherin Multiscan Spektrofotometrillä aallonpituudella 450 nm. Toteutin proliferaatioanalyysin molempien solulinjojen osalta samalla tavalla.

Tutkimuksessa toistin samat kokeet useaan kertaan toisistaan itsenäisesti ja analysoin tulokset samoilla laitteistoilla virhelähteiden minimoimiseksi. Virhelähteitä olisivat kuitenkin olleet laboratoriotyöskentelyssä tapahtuneet mahdolliset virheet esimerkiksi huolimattomuudesta tai väärästä tekniikasta johtuen. Näitä virhelähteitä pyrin vähentämään siten, että tein kokeita useita kappaleita ja niistä valitsin tutkimuksen otoksiksi ne, joissa tulokset olivat yhdenmukaisia ja keskiarvon poikkeama oli mahdollisimman pieni.

5. Tulokset

Tilastollinen analyysin perusteella FLJ suurina pitoisuuksina vähensi proliferaatiota molemmissa solulinjoissa. Korrelaatio oli merkitsevä ($p < 0,05$), kun pitoisuudet olivat 2500 µg/ml ja 5000 µg/ml. Vaikka solujen jakaantuminen väheni molemmilla solulinjoilla, SCC-25 solulinjan proliferaatio laski hieman enemmän kuin HSC-3 solulinjan. Sen sijaan alhaisimmalla puolukkautepitoisuudella (500 µg/ml) merkittävää proliferaation laskua ei tapahtunut.

6. Pohdinta

Terveellisen ruokavalion ja runsaan kasvien käytön tiedetään osittain ehkäisevän tiettyjä syöpiä (18, 20). Oletettavasti erilaiset kasvien sisältämät fytokeemikaalit auttavat soluja ylläpitämään itselleen optimaalisia fysiologisia olosuhteita ja samalla suojautumaan soluja tai DNA:ta vaurioittavilta yhdisteiltä (17).

Solutasolla polyfenoliyhdisteistä on saatavilla *in vitro*-kokeita, joissa muun muassa flavonoidien on todettu vähentävän vapaiden radikaalien aiheuttamaa DNA-vauriota ja

toimivan syöpää ehkäisevänä tekijänä, jonka lisäksi niillä on selkeä vaikutus solun signaaliketjuihin (27). Flavonoideihin liittyen on löydetty myös eläinmalleissa suun alueen syöpää ehkäisevä vaikutus (28), mutta flavonoidien suoraa mekanismia syövän ehkäisyssä ei ole todistettu (29).

Meta-analyseissä on voitu osoittaa erilaisten hedelmien, marjojen ja vihannesten edullinen vaikutus syövän ehkäisyssä, mutta vaikutuksen on arvioitu koostuvan enemmän monipuolisen ruokavalion kokonaisvaikutuksesta kuin yksittäisistä yhdisteistä (30,31). Lisäksi yksittäisten fytokeemikaalien kohdalla tutkimus on osoittautunut haastavaksi, sillä eläinmallien osalta tutkimusta on hyvin vähän saatavilla ja antioksidanttien vaikutus jää *in-vitro* tutkimuksessa vähäiseksi (17).

Puolukan osalta, sen sisältämien fenoliyhdisteiden terveyttä edistäviin vaikutuksiin kuuluu muun muassa flavonoidien anti-fungaalinen, antimikrobinen ja syöpää ehkäisevä vaikutus (32). Työssämme osoitimme, että FLJ merkittävästi vähensi kielisyöpäsolujen proliferaatiota suurempina konsentraatioina. Vaikka vaikutus proliferaatioon oli tilastollisesti merkittävä molemmilla solulinjoilla, vaikutti FLJ paremmin vähemmän invasiiviseen SCC-25 kielisolulinjaan kuin aggressiivisempiin ja invasiivisempiin HSC-3 soluihin. On syytä muistaa, että saimme tuloksemme *in vitro* kokeissa, joten puolukkauutteen vaikutusta *in vivo* ei tämän perusteella voi varmuudella arvioida.

Puolukan sisältämien yhdisteiden terveysvaikutukset ovat osittain tunnettuja polyfenoleihin kuuluvien flavonoidien osalta, joten yksi mahdollinen hypoteesi FLJ:n anti-proliferatiiviselle vaikutukselle voisi olla nimenomaan puolukan sisältämien flavonoidien vaikutus, jonka on osoitettu muun muassa vaikuttavan signaaliketjuihin solun sisällä (27). Puolukka sisältää kuitenkin flavonoidien lisäksi monia muitakin yhdisteitä, joilla on todettu olevan terveydelle edullisia vaikutuksia (21,22).

Tulokseni perusteella voin todeta, että FLJ suurina konsentraatioina ehkäisee kielisyöpäsolujen, SCC-25 ja HSC-3, proliferaatiota *in vitro*. Toistaiseksi FLJ:n proliferaatiota ehkäisevää mekanismia ei tunnettu, minkä vuoksi emme voi kokeidemme perusteella päätellä onko anti-proliferatiivinen tekijä flavonoidi vai jokin muu puolukan sisältämä komponentti. Mekanismin selvittäminen vaatiikin lisää tutkimustietoa ja molekulaaristen mekanismien selvittämistä.

7. Lähteet

1. Sano, D, Myers, J. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007; 26:645-62
2. Mäkinen L K, Hagström J, Mäkitie A, Atula T. Kielisyöpä - Varhainen toteaminen parantaa ennustetta, *Duodecim, Lääketieteellinen aikakauskirja*, 2016 132:2063-70
3. Suomen syöpärekisteri, (Viitattu 30.10.2018), Saatavilla internetissä: <http://syoparekisteri.fi/>
4. Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clinic Proceedings*, 2007; 82:1017
5. Kantola S, Jokinen K, Hyrynkangas K, Mäntyselkä P, Alho OP. Detection of tongue cancer in primary care. *British Journal of General Practice* 2001; 51:106-11
6. Pitiphat W, Diehl SR, Laskaris G, Cartsos V, Douglass CW, Zavras AL. Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *Journal of Dental Research* 2002; 81:192-7
7. Woolgar JA. Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma: incidence, histopathological features and clinical implications. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1999; 37:181-6
8. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg P, Brjööklund A, Rutqvist LE. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 1998; 82:1367-75
9. Stephano Petti. Lifestyle risk factors for oral cancer, *Oral Oncology* 2009; 45:340-50

10. Salaspuro V, Kurkivuori J, Salaspuro M. Alkoholi, tupakka ja mikrobit suusyövän etiologiassa, *Duodecim* 2005;121:2338–44
11. Negri E, Franceschi S, Bosetti C, Levi F, Conti E, Parpinel M, La Vecchia C. Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. *International Journal of Cancer*. 2000; 86:122-7
12. Prime SS, Thakker NS, Pring M, Guest PG, Paterson IC, A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2001; 37: 1-16
13. Atula S, Grénman R, Laippala P, Syrjänen S. Cancer of the tongue in patients younger than 40 years. A distinct entity? *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery* 1996; 122:1313-9.
14. Petersen P E. Oral cancer prevention and control – The approach of the World Health Organization, *Oral Oncology* 2009;45:454-60
15. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century, *American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 81:341-54
16. Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003: 78:517-20
17. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action, *Journal of Nutrition* 2004;134: 3479-85
18. World Health Organization/FAO expert consultation / Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, 2003

19. Chow C. Vitamin E and oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 1990;11: 215-32
20. Pavia M, Pileggi C, Nobile CG, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *The American journal of clinical nutrition*, 2006;83: 1126-34
21. Ek S, Kartimo H, Mattila S, Tolonen A. Characterization of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006;54: 9834-42
22. Vincenzo Lattanzio; Veronica M.T Lattanzio; Angela Cardinali. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects, *Phytochemistry: Advances in Research*, 2006; 23-67
23. Manach C; Williamson G; Morand C; Scalbert A; Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans, Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81:230-42
24. Pärnänen P. A preparation for balancing the composition of the oral microbial flora. EP 2 585 087 B1. 13.12.2017
25. Porstmann T; Ternyck T; Avrameas S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response, *Journal of immunological methods*, 1985;82:169-79
26. Matatall KA; Kadmon CS; King KY. Detecting Hematopoietic Stem Cell Proliferation Using BrdU Incorporation, *Methods in molecular biology*, 2018; 1686:91-103
27. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 36:838-49

28. Balasubramanian S, Govindasamy S. Inhibitory effect of dietary flavonol quercetin on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1996; 17:877-9
29. Romagnolo DF, Selmin OI. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence, *Journal of nutrition in gerontology and geriatrics*, 2012; 31:206-38
30. Temple N. J, Gladwin, K. K. Fruits, vegetables, and the prevention of cancer: research challenges *Nutrition*, 2003 19:467-70
31. Vainio H, Widerpass E. Fruit and vegetables in cancer prevention, *Nutrition and cancer*, 2006; 54:111-42
32. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG, Pizzolatti MG, Silva FR. Flavonoids, prospective drug candidates. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2008;13:1429-40

8. Liite

Liitteenä alkuperäisartikkeli, jonka osana tutkimustyöni tulokset on esitetty.

Fermented Lingonberry Juice Inhibits Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma Invasion *In Vitro* Similarly to Curcumin

DOUWE HOORNSTRA¹, JENNI VESTERLIN¹, PIRJO PÄRNÄNEN¹, AHMED AL-SAMADI¹,
AYELET ZLOTOGORSKI-HURVITZ², MARILENA VERED^{2,3} and TUULA SALO^{1,4,5}

¹Department of Oral and Maxillofacial Diseases,
University of Helsinki and Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland;
²Department of Oral Pathology and Oral Medicine, School of Dental Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel;
³Institute of Pathology, The Chaim Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel;
⁴Cancer and Translational Medicine Research Unit, University of Oulu, Oulu, Finland;
⁵Medical Research Center, Oulu University Hospital, Oulu, Finland

Abstract. *Background:* Oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC) cells are highly proliferative and invasive. Lingonberry contains several polyphenolic compounds similar to curcumin. We hypothesize that fermented lingonberry juice (FLJ) has an anti-invasive and anti-proliferative effect on OTSCC cells similarly to curcumin, which is known to be anti-carcinogenic. *Materials and Methods:* FLJ, curcumin dissolved in ethanol, or curcumin loaded in *Candida* extracellular vesicles (EVs) were added to more (HSC-3) and less aggressive (SCC-25) OTSCC cells. Cell proliferation was measured with a 5-bromo-2'-deoxyuridine kit and invasion in the three-dimensional Myogel spheroid assay. Statistical analyses were completed with one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc testing. *Results:* Both FLJ and curcumin significantly reduced the proliferation and invasion of HSC-3 and SCC-25 cells. The effects of curcumin were not improved when cells were treated with curcumin loaded within EVs. *Conclusion:* Our results suggest that FLJ, like curcumin, has an anti-carcinogenic effect on aggressive OTSCC cells *in vitro*.

Oral cancer is the tenth most common cancer in men worldwide, and most of these cancers are oral tongue squamous cell carcinomas (OTSCCs). Bioactive protective anticancer molecules are present in a healthy diet containing high amounts of fruits and vegetables (1). Pavia *et al.* showed a ~50% reduction

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Tuula Salo Department of Oral and Maxillofacial Diseases, University of Helsinki and Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland. E-mail: Tuula.salo@helsinki.fi

Key Words: Oral cancer cells, anti-invasive, anti-proliferative, 3D spheroid.

in oral cancer risk for each portion of fruit or vegetable consumed per day (2). Similar results for reducing the risk of head and neck cancer by fruits and vegetables was documented by Freedman *et al.* (3).

Berries from the genus *Vaccinium*, such as blueberry (*V. corymbosum*), cranberry (*V. macrocarpon*), bilberry (*V. myrtillus* L.) and lingonberry (*V. vitis-idaea*), have several health benefits. They positively affect gut microbiota and cardiovascular disease outcomes and negatively affect tumour growth (4). When cloudbberries (*Rubus chamaemorus*) or lingonberries were added to a modified high-fat diet in mice, the number and size of colonic adenomas were significantly reduced, demonstrating the tumour-preventative capacities of these berries (5). Similarly, a decrease in lung metastasis of breast cancer by fermented blueberries was documented in a mouse model by Vuong *et al.* (6). Tsuda *et al.* analysed five *Vaccinium* species *in vitro* and observed that the one with the highest total polyphenol content had the greatest anti-proliferative and pro-apoptotic effects on the pro-myelocytic human leukaemia cell line HL-60 (7). However, to the best of our knowledge, the effects of fermented lingonberry juice (FLJ) on OTSCC proliferation and invasion have not been studied.

Curcumin is the phenolic component of turmeric (*Curcuma longa*), and although used in Chinese and Indian medicine, it is still mainly applied as a spice. It has antimicrobial, hepatoprotective, cardioprotective, thrombosuppressive, and anti-carcinogenic properties, including inhibitory effects on OTSCC cells (8, 9). Recently, curcumin was shown to reduce oral squamous cell carcinoma cell migration at low doses (10), as well as the invasiveness of an OTSCC cell line, SCC-25 (11). A phase I clinical trial reported histological improvement in precancerous lesions after treatment with curcumin for 3 months in 29% of patients who had high risk of cancer transformation (12). The poor bioavailability of curcumin has shifted focus towards loading curcumin into

vehicles, such as nanoparticles and liposomes (9). Saengkrit *et al.* loaded cationic liposomes with curcumin (13), Dhule *et al.* used a 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin/curcumin liposome complex (14) and later introduced nanoliposomes containing phospholipids, chitosan and curcumin (15). Instead of using synthetic carriers, Aqil *et al.* loaded curcumin into extracellular vesicles (EVs) isolated from bovine milk (16).

In this study, we aimed to evaluate the anti-proliferative and anti-invasive properties of FLJ on OTSCC cell lines and compare the effects to those of curcumin. Curcumin was either dissolved in ethanol or combined with EVs isolated from *Candida glabrata*.

Materials and Methods

Chemicals. Curcumin was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). A stock solution of 5 mg curcumin per ml 70% ethanol was prepared. Locally produced lingonberry juice (0.1 g/ml) was fermented using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as described by Pärnänen (17).

Isolation and characterization of EVs. *C. glabrata* G212 (clinical strain; Helsinki University Central Hospital, Finland) was cultivated on Sabouraud agar and incubated overnight at 37°C before being transferred into Sabouraud broth, which was incubated on a shaker (120 rpm) for 48 h at 37°C.

EVs were isolated using a two-step ultracentrifugation procedure. Firstly, the broth was filtered (0.22 μ m) then centrifuged at 11 000 \times g for 30 min at 4°C. The supernatant was collected and centrifuged again at 100 000 \times g for 90 min at 4°C. The second supernatant was discarded and the pellet containing EVs was resuspended in 300 μ l phosphate-buffered saline (PBS) and kept at -80°C until further use. Purified EVs were analysed by nanoparticle tracking analysis (NTA) using a NanoSight LM14 viewing unit (NanoSight, Salisbury, UK) equipped with a blue (404 nm, 70 mW) laser and scientific CMOS camera. The samples were diluted in Dulbecco's PBS and three videos of 90 s were recorded using camera level 14. The data were analysed using NTA software version 3.0 (NanoSight) with the detection threshold optimized for each sample and the screen gain at 10 to track as many particles as possible with minimal background. The EV content of *C. glabrata* G212 was 3.5 \times 10⁶ EVs/ μ l PBS. EVs were spiked with 30 μ l of curcumin stock solution and incubated for 30 min at room temperature.

Electron microscopy. The samples were prepared for electron microscopy and imaged as described elsewhere (18). Briefly, after fixation with 2% paraformaldehyde, the samples were stained with 2% neutral uranyl acetate and further stained and embedded in uranyl acetate and methyl cellulose mixture (1.8/0.4%). The samples were viewed using a JEOL JEM-1400 (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) transmission electron microscope operating at 80 kV. Images were taken with a Gatan Orius SC 1000B CCD-camera (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA) with 4008 \times 2672 pixel image size and no binning. The morphology of the EVs (50-125 nm) before and after adding curcumin was confirmed by electron microscopy (Figure 1).

Cell culture. Two human OTSCC cell lines, HSC-3 (Japan Health Sciences Foundation, Tokyo, Japan) and SCC-25 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were used in this study. HSC-3 is a highly invasive cell line, while SCC-25 is less invasive

(19). The cells were cultured in 75 cm² flasks containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-12 (Gibco, Paisley, UK) supplied with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 250 ng/ml amphotericin B, 0.4 μ g/ml hydrocortisone and 50 μ g/ml ascorbic acid.

Proliferation assay. Cell proliferation assay was performed using a Cell Proliferation enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 5-bromo-2'-deoxyuridine BrdU (colorimetric) Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were cultured in 96-well plates at a density of 5 \times 10³ cells/200 μ l and exposed to FLJ (500, 2,500, or 5,000 μ g/ml), curcumin (25, 125, or 250 μ g), or curcumin-loaded EVs (25, 125, or 250 μ g); phosphate-buffered saline was used as a control. After 48 h, the cells were labelled using 10 μ M BrdU per well and re-incubated for 2 h at 37°C in a humidified atmosphere. The culture medium was removed, the cells were fixed, and the DNA was denatured in one step by adding FixDenat. Next, the cells were incubated with anti-BrdU-POD for 90 min at room temperature. After the removal of the antibody conjugate, the cells were washed, and the substrate solution was added. The reaction product was quantified by measuring the absorbance using a scanning multi-well spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) at 450 nm with a reference wavelength of 690 nm. The results are expressed as mean absorbance values.

Three-dimensional (3D) tumour Myogel spheroid invasion assay. Cells were added (1000 cells per well) into a Corning™ ultra-low attachment 96-well round bottom plate (Costar® Corning Inc., Kennebunk, ME, USA). The plate was transferred to an incubator (37°C, 5% carbon dioxide, 95% humidity). After 4 days, tumour spheroid formation was visually confirmed.

One hundred microlitres of growth medium was removed from each well and replaced by 100 μ l of a mixture of Myogel (0.5 mg/ml) and collagen I (0.5 mg/ml; BD Biosciences, Bedford, MA, USA) cFLJ (500, 2500, or 5,000 μ g/ml), curcumin (25, 125, or 250 μ g), or curcumin-loaded EVs (25, 125, or 250 μ g). The plate was transferred to an incubator at 37°C and the Myogel-collagen mixture was allowed to solidify. After 1 h, 100 μ l/well of complete growth medium plus FLJ, curcumin or EVs loaded with curcumin at the same concentration was added. Images were taken at 0, 24, 48, 72 and 96 h using a Nikon DS-Fi2 camera (Nikon, Tokyo, Japan) with 4 \times magnification (light microscope, no phase contrast). The spheroid diameter (Figure 2, indicated by the solid arrow) and cell invasion (Figure 2, indicated by the dashed arrow) were measured using ImageJ 1.50i (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

Statistical analysis. All experiments were repeated three times independently, each in triplicate. Values are given as mean \pm standard deviation. To determine the statistical significance, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *post-hoc* test was performed. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

FLJ and curcumin inhibited proliferation of OTSCC cells. Exposing the HSC-3 cells to FLJ inhibited cell proliferation at concentrations of 2.5 and 5.0 mg/ml (Figure 3A).

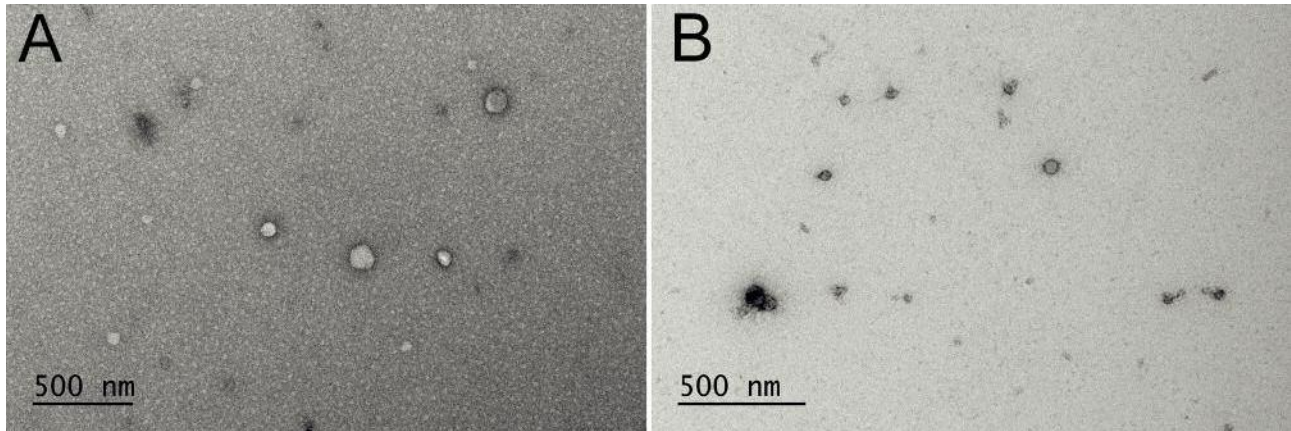


Figure 1. Morphology and size of extracellular vesicles (EVs). An electron microscope was used to confirm the presence of the EVs before (A) and after (B) adding curcumin.

Curcumin with and without *Candida* EVs acted similarly but at lower concentrations (125 and 250 $\mu\text{g/ml}$; Figure 3B and C). The half maximal -inhibitory concentration (IC_{50}) for FLJ was 1162 $\mu\text{g/ml}$, and was 35 $\mu\text{g/ml}$ for curcumin.

SCC-25 cell proliferation, similarly to HSC-3, was inhibited by FLJ and curcumin with and without EVs (Figure 3A-C) at concentrations of 2.5 mg/ml or more for FLJ and 125 $\mu\text{g/ml}$ or more for curcumin. The IC_{50} was 773 $\mu\text{g/ml}$ for FLJ and 25 $\mu\text{g/ml}$ for curcumin. This demonstrates that the less aggressive SCC-25 cells were more sensitive to FLJ and curcumin than the more aggressive HSC-3 cells.

The anti-proliferative effects on HSC-3 and SCC-25 cells were statistical significant for FLJ ($p=0.023$ and $p=0.001$, respectively) and curcumin ($p=0.00003$ and $p=0.002$, respectively).

FLJ and curcumin significantly reduced the invasion of OTSCC cells in the 3D Myogel spheroid assay without affecting spheroid size. Exposing the 3D Myogel spheroids of OTSCC cells to curcumin with and without EVs and FLJ for 96 h did not change the spheroid size (data not shown). For HSC-3 cells, the spheroid diameter was 200 -250 μm and for SCC-25 cells 150-200 μm .

The invasion of HSC-3 cells was significantly inhibited by FLJ ($p=0.000009$; Figure 4A and B), curcumin ($p=0.001$; Figure 4C and D), and curcumin-loaded EVs ($p=0.000125$; Figure 4E and F). FLJ (Figure 5A and B), curcumin ($p=0.034$; Figure 5C and D), curcumin-loaded EVs ($p=0.028$; Figure 5E and F) inhibited SCC-25 cell invasion at concentrations similar to those against HSC-3, but for FLJ the effect was not statistically significant. The statistical significance was calculated based on the area under the curve of the invading cancer cells over time.

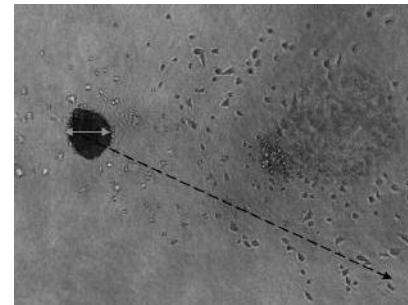


Figure 2. The three-dimensional Myogel spheroid assay. Spheroid diameter (solid arrow) and cell invasion (dashed arrow) were measured using the ImageJ 1.50i software.

Discussion

Our *in vitro* study showed anti-proliferative and anti-invasive effects of FLJ on more (HSC-3) and less (SCC-25) aggressive OTSCC cell lines similarly to curcumin. However, the IC_{50} of curcumin was approximately 30-times lower than that of FLJ in both cell lines tested.

The inhibition of OTSCC cell proliferation by FLJ is similar to the results obtained by Brown *et al.* (20) using a highly invasive human colorectal adenocarcinoma cell line, HT115. The anti-proliferative effects of lingonberry were also demonstrated in human cervical (HeLa) and colon (Caco-2) cancer cells (21).

Curcumin inhibited OTSCC proliferation and invasion in both cell lines similarly to the study by Lee *et al.* (11) in which they also analysed SCC-25 cells. In that study, proliferation was measured by trypan blue and invasion in the transwell assay, while in the present study a BrdU Kit and 3D

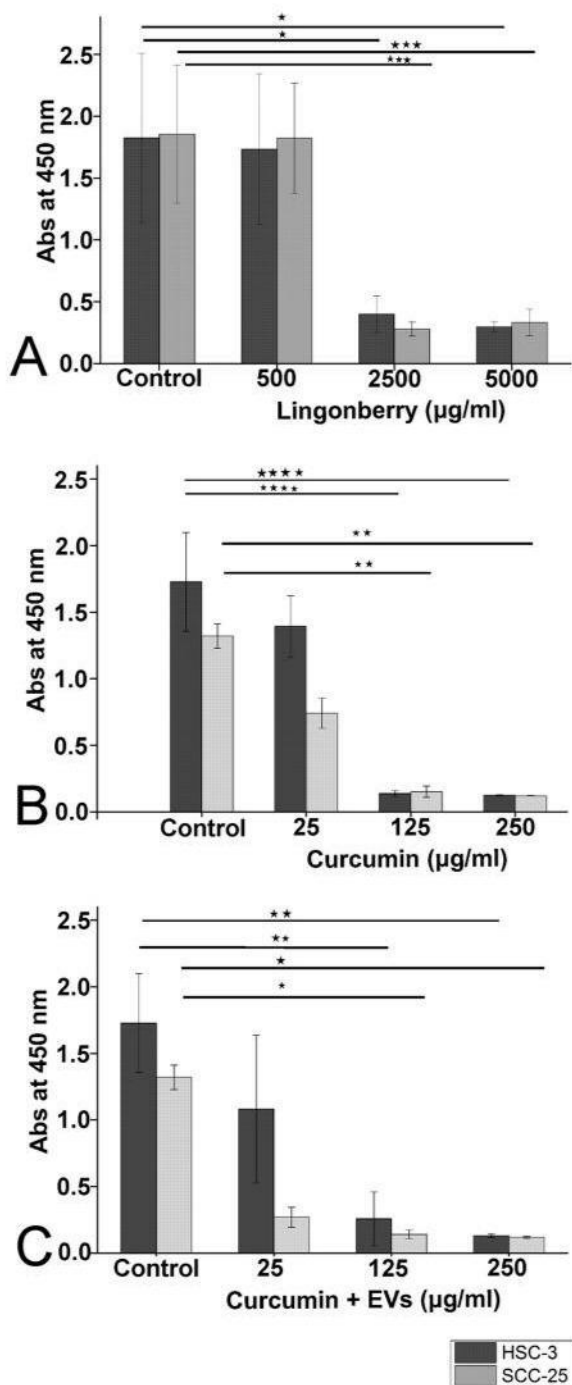


Figure 3. Inhibition of HSC-3 and SCC-25 cell proliferation after 48 h of exposure to fermented lingonberry juice (FLJ), curcumin and curcumin-loaded extracellular vesicles (EVs). A colorimetric proliferation assay was used to study the effects of FLJ (A), curcumin (B) and curcumin-loaded EVs (C) on oral tongue squamous cell carcinoma. PBS was used as control. Statistical significance was determined using one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. All experiments were repeated independently three times and each in triplicate. Results are the means of the three replicate experiments \pm standard error. Significantly different at * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, and **** $p \leq 0.0001$.

spheroid assay, respectively, were used. In addition, in their experiments, a concentration as low as 10 μM curcumin reduced cell invasion by 95%, and 15 μM curcumin reduced cell viability by 50%. In our experiments, the IC₅₀ of curcumin for SCC-25 cell proliferation was 25 μM .

Our attempt to increase curcumin bioavailability by mixing curcumin with *Candida* EVs did not show similar additive effects to those in the study by Aqil *et al.* (16), which used EVs from raw bovine milk. The EVs isolated from milk were mixed with curcumin and those curcumin-loaded EVs were able to inhibit the proliferation of lung (A549 and H1299), cervical (CaSki and HeLa) and breast cancer (MDA-MB -231 and T47D) cell lines more efficiently than curcumin itself. In our study, the EVs isolated from *C. glabrata* G212 did not affect cell proliferation; after the EVs were loaded with curcumin, the effects were similar to those of curcumin alone on OTSCC cell proliferation and invasion. One explanation could be that bovine milk EVs may take up more curcumin compared with *Candida* EVs. The amount of curcumin in different EV isolations may vary and should be compared. It would be interesting to analyse whether raw cow milk EVs mixed with curcumin would have different effects on the invasion and proliferation of OTSCC cells than EVs from other sources, such as *Candida* or saliva (22).

Berries from the genus *Vaccinium* have been tested in some anticancer studies as described in a review article by Neto (23). However, so far, only the effect of blueberry powder has been analysed on oral carcinogenesis in a hamster model, where it inhibited both cancer invasion and angiogenesis (24). The bioactive compounds of lingonberry *in vitro* were shown to be similar before and after fermentation, and degradation (20). The variety of anthocyanin metabolites after ingesting another *Vaccinium*, chokeberry, included at least 10 individual anthocyanin metabolites found in urine and serum (25). The concentration of anthocyanins detected in plasma was 138 nmol/l derived from 1435 μmol ingested from bilberries and lingonberries (26). The concentration of curcumin detected in serum after ingesting 4 g per day was on average $0.51 \pm 0.11 \mu\text{M}$, after 6 g it was $0.63 \pm 0.06 \mu\text{M}$ and after 8 g it was $1.77 \pm 1.87 \mu\text{M}$ (12). The concentration of curcumin which inhibited the proliferation and invasion of OTSCC cells was 30 times lower than that required for FLJ. However, a person is undoubtedly able to consume high amounts (more than 100 g) of berries daily, whereas consuming the required daily amount of curcumin is less noticeable. Therefore, the anti-carcinogenic effects for both compounds could easily, at least in theory, be ingested on a daily basis.

In conclusion, our study showed that FLJ significantly inhibited the invasion and proliferation of OTSCC cells, but the concentration needs to be higher than that of curcumin. Loading curcumin into *Candida* EV's improved its poor

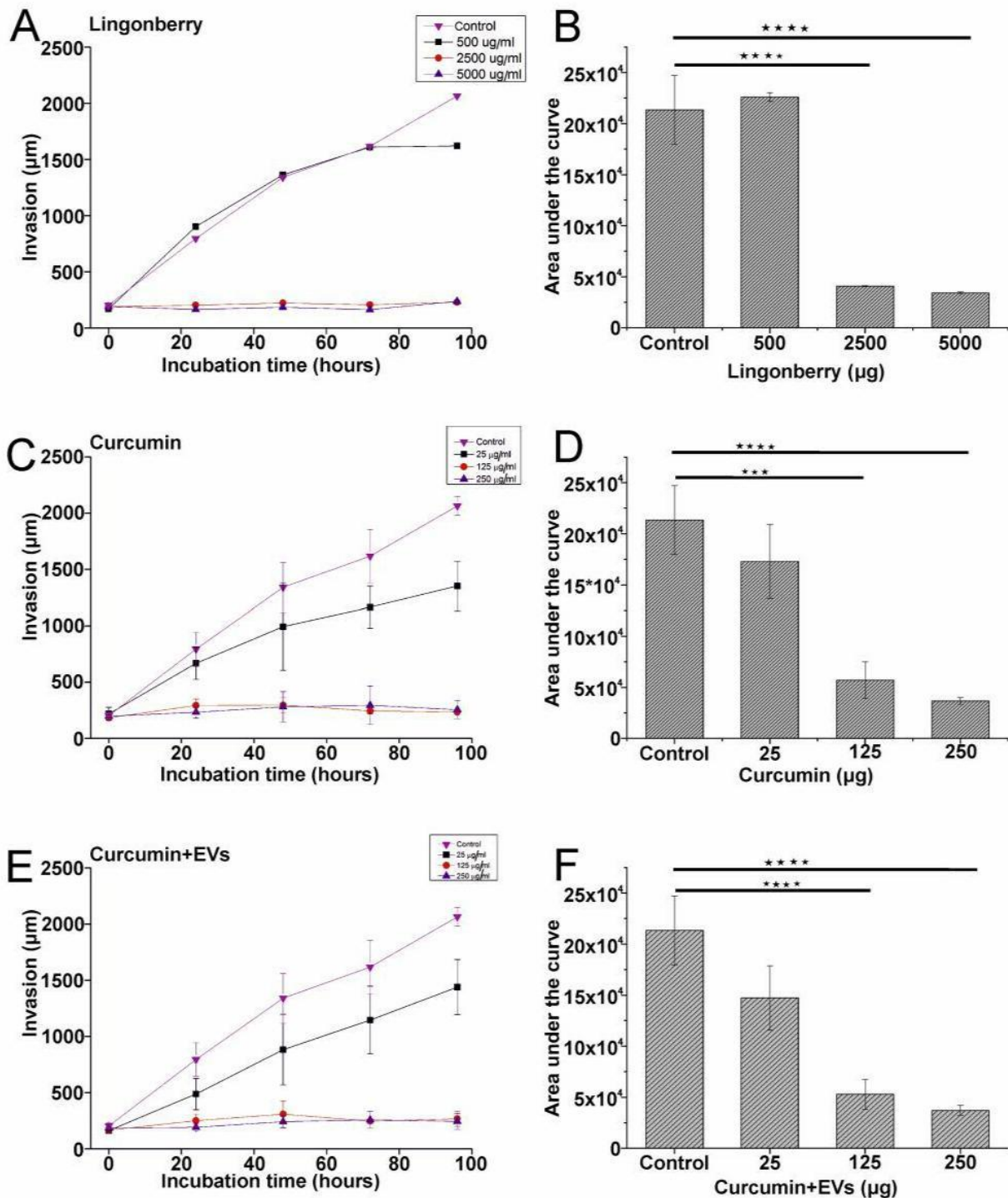


Figure 4. Effects of fermented lingonberry juice (FLJ) and curcumin on the invasiveness of HSC-3 cells after 96 h of exposure. The three-dimensional tumour spheroid invasion assay was used to study the effects of FLJ (A), curcumin (B) and curcumin-loaded extracellular vesicles (C) on oral tongue squamous cell carcinoma invasion. Phosphate-buffered solution was used as control. Invasion was measured using the ImageJ software. All experiments were repeated independently three times and each in triplicate, except for FLJ, which was performed twice in triplicate. Results are the means \pm standard error. Statistical significance was determined by calculating the area under the curve of the invading cancer cells over time, and using one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. Significantly different at $***p \leq 0.001$ and $****p \leq 0.0001$.

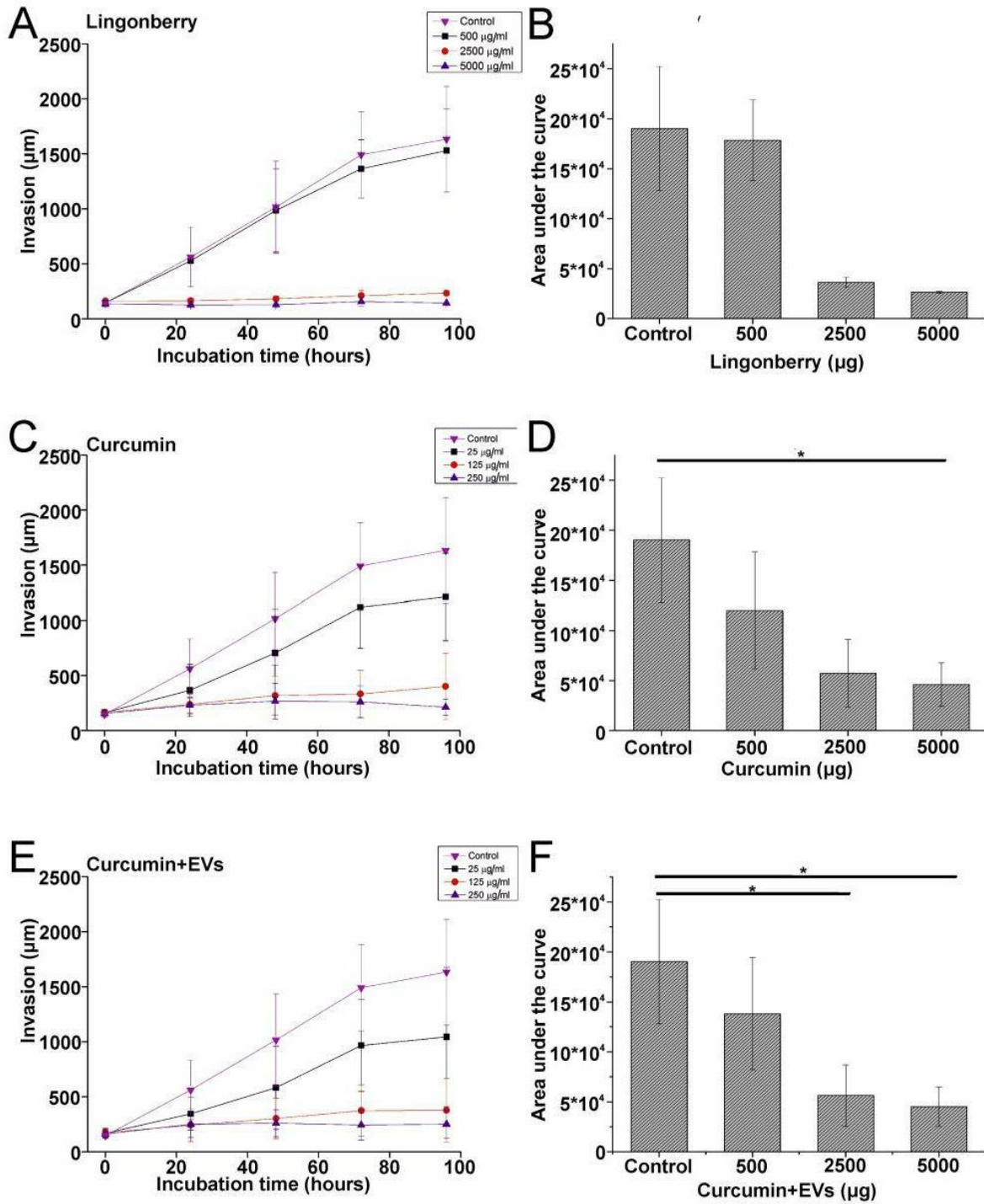


Figure 5. Effects of fermented lingonberry juice (FLJ) and curcumin on the invasiveness of SCC-25 cells after 96 h of exposure. The three-dimensional tumour spheroid invasion assay was used to study the effects of FLJ (A), curcumin (B) and curcumin-loaded extracellular vesicles (C) on OTSCC invasion. Invasion was measured using the ImageJ software. All experiments were repeated independently three times and each in triplicate. Results are the means \pm standard error. Statistical significance was determined by calculating the area under the curve and using one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. Significantly different at $*p \leq 0.05$.

bioavailability, but the anti -carcinogenic effect on OTSCC cells was unchanged. *In vivo* animal studies of FLJ compounds should be conducted to see whether it is able to prevent or reduce the progression of OTSCC.

Acknowledgements

Authors thank the EV Core at the University of Helsinki for performing the nanoparticle tracking analysis as well as the Electron Microscopy Unit of the Institute of Biotechnology at the University of Helsinki for providing the facilities. This work was supported by the Sigrid Juselius Foundation, the Cancer Society of Finland, and Helsinki University Central Hospital

References

- McClements DJ and Xiao H: Designing food structure and composition to enhance nutraceutical bioactivity to support cancer inhibition. *Semin Cancer Biol* 46: 215-226, 2017.
- Pavia M, Pileggi C, Nobile CG and Angelillo IF: Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: A meta- analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 83(5): 1126-1134, 2006.
- Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A and Abnet CC: Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int J Cancer* 122(10): 2330-2336, 2008.
- Seeram NP: Berries and human health: research highlights from the Fifth Biennial Berry Health Benefits Symposium. *J Agric Food Chem* 62(18): 3839 -3841, 2014.
- Mutanen M, Pajari AM, Paivarinta E, Misikangas M, Rajakangas J, Marttinen M and Oikarinen S: Berries as chemopreventive dietary constituents – a mechanistic approach with the *ApcMin/+* mouse. *Asia Pac J Clin Nutr* 17(Suppl 1): 123 -125, 2008.
- Vuong T, Mallet JF, Ouzounova M, Rahbar S, Hernandez-Vargas H, Herceg Z and Matar C: Role of a polyphenol-enriched preparation on chemoprevention of mammary carcinoma through cancer stem cells and inflammatory pathways modulation. *J Transl Med* 14 : 13, 2016.
- Tsuda H, Kunitake H, Kawasaki-Takaki R, Nishiyama K, Yamasaki M, Komatsu H and Yukizaki C: Antioxidant activities and anti- cancer cell proliferation properties of Natsuhaze (*Vaccinium oldhamii* Miq.), Shashanbo (*V. bracteatum* Thunb.) and blueberry cultivars. *Plants* 2(1): 57-71, 2013.
- Fadus MC, Lau C, Bikhchandani J and Lynch HT: Curcumin: An age-old anti- inflammatory and anti-neoplastic agent. *J Tradit Complement Med* 7: 339-346, 2017.
- Panda AK, Chakraborty D, Sarkar I, Khan T and Sa G: New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *J Exp Pharmacol* 9: 31-45, 2017.
- de Campos PS, Matte BF, Diel LF, Jesus LH, Bernardi L, Alves AM, Rados PV and Lamers ML: Low doses of curcuma longa modulates cell migration and cell - cell adhesion. *Phytother Res* 31(9): 1433 - 1440, 2017.
- Lee AY, Fan CC, Chen YA, Cheng CW, Sung YJ, Hsu CP and Kao TY: curcumin inhibits invasiveness and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma through reducing matrix metalloproteinase 2, 9 and modulating p53-E-cadherin pathway. *Integr Cancer Ther* 14(5) : 484-490, 2015.
- Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC and Hsieh CY: Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high -risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 21(4B): 2895-2900, 2001.
- Saengkrit N, Saesoo S, Srinuanchai W, Phunpee S and Ruktanonchai UR: Influence of curcumin- loaded cationic liposomes on anticancer activity for cervical cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 114(10) : 349-356, 2014.
- Dhule SS, Penfornis P, Frazier T, Walker R, Feldman J, Tan G, He J, Alb A, John V and Pochampally R: Curcumin- loaded γ -cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. *Nanomedicine* 8(4): 440-451, 2012.
- Dhule SS, Penfornis P, He J, Harris MR, Terry T, John V and Pochampally R: The combined effect of encapsulating curcumin and C6 ceramide in liposomal nanoparticles against osteosarcoma. *Mol Pharm* 11(2): 417 - 427, 2014.
- Aqil F, Munagala R, Jeyabalan J, Agrawal AK and Gupta R: Exosomes for the enhanced tissue bioavailability and efficacy of curcumin. *AAPS J* 19(6): 1691-1702, 2017.
- Pämänen P: A preparation for balancing the composition of the oral microbial flora. EP 2 585 087 B1, 13.12.2017.
- Puhka M, Nordberg ME, Valkonen S, Rannikko A, Kallioniemi O, Siljander P, Af and Hällström TM: KeepEX, a simple dilution protocol for improving extracellular vesicle yields from urine. *Eur J Pharm Sci* 98: 30 -39, 2017.
- Ramos DM, Chen BL, Boylen K, Stern M, Kramer RH, Sheppard D, Nishimura SL, Greenspan D, Zardi L and Pytela R: Stromal fibroblasts influence oral squamous- cell carcinoma cell interactions with tenascin-C: *Int J Cancer* 72: 369 -376, 1997.
- Brown EM, Nitecki S, Pereira-Caro G, McDougall GJ, Stewart D, Rowland I, Crozier A and Gill CI: Comparison of *in vivo* and *in vitro* digestion on polyphenol composition in lingonberries: potential impact on colonic health. *Biofactors* 40(6): 611-623, 2014.
- McDougall GJ, Ross HA, Ikeji M and Stewart D: Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown *in vitro*. *J Agric Food Chem* 56(9): 3016-3023, 2008.
- Zlotogorski- Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, Korvala J, Salo T, Sormunen R and Vered M: Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation. *J Histochem Cytochem* 63(3): 181-189, 2015.
- Neto CC: Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res* 51(6): 652 - 664, 2007.
- Baba AB, Kowshik J, Krishnaraj J, Sophia J, Dixit M and Nagini S: Blueberry inhibits invasion and angiogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) -induced oral squamous cell carcinogenesis in hamsters via suppression of TGF- β and NF - κ B signaling pathways. *J Nutr Biochem* 35: 37-47, 2016.
- Kay CD, Mazzau G, Holub BJ, Wang J: Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Br J Nutr*, 933-942, 2004
- Nurmi T, Mursu J, Heinonen M, Nurmi A, Hiltunen R and Voutilainen S: Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J Agric Food Chem* 57(6) : 2274-2281, 2009.

Received May 14, 2018

Revised June 11, 2018

Accepted June 15, 2018