

О.О. Кравченко, І.В. Якубцова, Т.Д. Хілько, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко, В.Ф.Чехун

Вплив комплексу природних речовин насіння фенугреку на формування аберантних крипт у слизовій оболонці за умов експериментального канцерогенезу товстої кишки у щурів

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка; E-mail: irinamaster@gmail.com

*Аберантні крипти Foci (АКФ) вважаються передраковими ушкодженнями і біомаркерами у скринінгу потенціальних хемопротективних речовин. Терапія колоректального раку викликає токсичні побічні ефекти. Природні біологічно активні речовини все частіше використовуються для протидії неопластичним процесам. Досліджено вплив насіння фенугреку (*Trigonella foenum graecum* L.) на стан слизової оболонки товстої кишки у щурів на моделі експериментального канцерогенезу. Показано можливий гепатопротекторний вплив і зменшення поодиноких АКФ на 40 %, мультикрипт на – 31 % у слизовій оболонці товстої кишки тварин, які отримували дрібнодисперсний порошок разом зі стандартним кормом.*

*Ключові слова: аберантні крипти Foci, слизова оболонка товстої кишки, насіння фенугреку (*Trigonella foenum graecum* L.).*

ВСТУП

Канцерогенез товстої кишки – це багатоетапний процес, що призводить до послідовних змін клітин колончатого епітелію мета-, пренео-, неопластичними перетвореннями [1]. Аберантні крипти Foci (АКФ) утворюються у кишечнику та можуть стати індикатором виникнення колоректального раку як у людини, так і у тварин. Нині АКФ як пренеопластичні ушкодження колончатого епітелію відіграють роль доступних і надійних біомаркерів у скринінгу потенціальних хемопротективних речовин [2]. У щурів багаторазове введення 1,2 диметилгідразину викликає формування АКФ в основному у дистальній частині кишечника, і з часом вони можуть перетворюватись у злоякісну пухлину [3]. Таким чином їх можна застосовувати для оцінки ефективності засобів, які можуть впливати

чи блокувати появу колоректального раку у гризунів. Для протидії неопластичним процесам часто використовують природні біологічно активні речовини, які здатні стимулювати внутрішні резерви організму, тому все більшого значення набуває пошук нових протипухлинних агентів рослинного походження.

Цілющі властивості багатьох рослин відомі давно, але їх біологічно активні речовини, що зумовлюють лікувальний ефект, вивчені ще недостатньо глибоко. Актуальним є застосування препаратів рослинного походження при патологіях шлунково-кишкового тракту, які відрізняються впливом на різні системи організму. Фенугрек і його насіння (*Trigonella foenum graecum* L.) містять велику кількість таких біологічно активних речовин, як стероїдні флавоноїди (апигенін, лютеолін, кверцетин, вітексин), алкалоїди (тригонелін, холін,

© О.О. Кравченко, І.В. Якубцова, Т.Д. Хілько, Т.Д. Преображенська, Л.І. Остапченко, В.Ф.Чехун

гентіанін, карпаїн), сапогеніни (діосгенін, протодіосин, ямогенін, гітогенін, тітогенін), ефірні олії, галактоманани, амінокислоти, ліпіди, ненасичені жирні кислоти, полісахариди, стероїдні сапогеніни, алкалоїди, вітаміни, мікроелементи [4–6]. Тому їм притаманні протимікробні, протизапальні, анаболічні і антикоагулянтні якості.

У сучасній літературі є дані щодо протипухлинних властивостей активних компонентів фенугреку відносно різних типів злоякісних пухлин на пухлинних моделях *in vitro*. Вплив екстракту насіння фенугреку оцінювали на моделі карциноми Ерліха на мишах лінії BALB/c, де він гальмував на 70 % ріст клітин пухлини [7]. Hibasami та співавт. [8], передбачають, що пригнічення інгібування клітин HL-60 лейкемії людини зростає за рахунок протодіосину, ізольованого з насіння фенугреку, що призводить до індукції апоптозу. Діосгенін, стероїдний сапогенін з насіння фенугреку, є попередником таких стероїдних гормонів, як прогестерон, та антизапальних стероїдів, таких, як кортизон [9]. Moalic та співавт. [10] показали, що діосгенін інгібує клітинну проліферацію при остеосаркомі клітинної лінії 1547 індукцією апоптозу і зупинкою у G₁-фазі клітинного циклу. Базуючись на вищевикладеному, зрозуміло, що діосгеніну і іншим складовим насіння фенугреку властиві антиканцерогенні можливості, що дає змогу передбачати їх потенціальну роль у запобіганні розвитку колоректального канцерогенезу.

Таким чином, оскільки більшість досліджень було проведено *in vitro* на різних пухлинних клітинних лініях [8, 10], актуальним є вивчення впливу насіння фенугреку на різні моделі канцерогенезу *in vivo*.

Метою нашої роботи було дослідити вплив насіння фенугреку на стан слизової оболонки товстої кишки на створеній моделі канцерогенезу в тварин у динаміці розвитку неопластичних змін.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на нелінійних білих щурах-самцях з початковою масою 160–180 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Розвиток експериментального канцерогенезу товстої кишки у тварин індукували повною заміною питної води на 1,5%-й розчин декстрансульфату натрієвої солі з подальшими щотижневими ін'єкціями специфічного проканцерогена – 1,2 диметилгідразину у дозі 20 мг/кг, розчиненого у фізіологічному розчині, протягом 2,5 міс [3].

Під легким ефірним наркозом вводили 0,25 мл фізіологічного розчину у кишковий простір, використовуючи катетер (з зовнішнім діаметром 0,3 мм), що розміщувався приблизно в 7 см проксимально до ануса. Перед першим введенням 1,2 диметилгідразину вдувається 0,5 мл повітря. Тварин декапітували на 2, 4, 6, 8-й і 10-й тиждень дії канцерогена, згідно з «Правилами роботи з лабораторними тваринами». Розвиток патологій діагностували за специфічними симптомами та гістологічно за ураженнями слизової оболонки товстої кишки. Метод, що використовувався для візуалізації АКФ, полягає у фарбуванні зафіксованої, нерізанної слизової оболонки метиленовим синім з наступною діафаноскопією внутрішньопорожнинної поверхні при збільшенні у 40 разів. Загальну кількість аберантних крипт визначали у 2-сантиметрових висічках слизової. Пренеопластичні ушкодження товстої кишки чи АКФ були обрані як кінцеві точки дослідження.

Щурів поділяли на 4 групи: 1-ша – інтактні тварини, 2-га – тварини, у яких моделювали експериментальний канцерогенез товстої кишки, 3-тя і 4-та – тварини з канцерогенезом, які щоденно отримували дрібнодисперсний порошок насіння фенугреку у дозі 250 мг/кг маси разом з стандартним кормом протягом 6 і 8 тиж відповідно. Порошок з насіння фенугреку був наданий професором Ш. Макаєм (Університет Західної Угорщини, Інститут

рослинництва, відділення медичних та ароматичних рослин).

За допомогою методів варіаційної статистики обробляли результати з використанням стандартного пакету комп'ютерних програм Excel, OriginLab 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що у дослідних тварин через 7 днів канцерогенного впливу слизова оболонка товстої кишки була набрякла, гіперемована, інфільтрована нейтрофілами, епітеліальні клітини збільшені у розмірах, видимі і мали збільшені перекриптичні зони. Для більш пізніх термінів (8–10 тиж) характерним було формування ущільнення та пухлиноподібні утворення у цьому органі. Слизова оболонка товстої кишки щурів інтактної групи відповідала нормі – представлена одношаровим призматичним епітелієм, в якому чітко розрізнялися стовбчасті епітеліоцити, ендокриноцити та келихоподібні клітини.

Через 2 тиж після ін'єкцій 1,2 диметилгідрозину у слизовій оболонці товстої кишки спостерігали поодинокі АКФ, які оточені нормальними криптами. Чітко прослідковується збільшення розмірів і щільності поверхневого вистилаючого епітелію аберантних крипт. Через 6–8 тиж відмічали збільшення розміру АКФ, вони мали різну кількість малих і великих крипт. Ушкодження крипт відрізнялися збільшеним розміром, потовщеним поверхневим епітелієм та ширшою перекрипталною зоною (див. рис.1,б). А через 9–10 тиж чітко видно дисплазію, а також клітини, що активно діляться, утворюючи мікроаденоми у вигляді поодиноких чи груп поліпів, що вважається початком кишкового канцерогенезу. Скупчення крипт, що відкриті у просвіт товстої кишки за розміром займають площу в 3–4 більше, ніж нормальні крипти (див. рис. 1,в).

Результати наших досліджень показали, що у тварин з експериментальним канцерогенезом товстої кишки, які щоденно отри-

мували дрібнодисперсний порошок насіння фенугреку разом з стандартним кормом була значно знижена кількість АКФ (рис. 2).

Клітини слизової оболонки товстої кишки, маючи високий регенераторний потенціал забезпечують фізіологічну здатність до її швидкого відновлення. Ця властивість реалізується завдяки балансу між проліферацією, диференціацією, апоптозом та десквамацією епітеліоцитів. Вплив біологічно активних речовин насіння фенугреку, гальмуючи проліферацію та атипічне переродження епітеліальних клітин у слизовій оболонці товстого кишечника, упереджує розвиток канцерогенезу.

Як свідчать наші результати, у тварин з експериментальним канцерогенезом, які отримували дрібнодисперсний порошок насіння фенугреку протягом 2 і 4 тиж кількість мультикрипт слизової оболонки товстої кишки зменшувалась на 15 і 31 % відповідно, а поодиноких АКФ – на 24 і 40 % відповідно в порівнянні з тваринами 2-ї групи.

На рис.3 представлені результати впливу біологічно активних речовин насіння фенугреку на фенотипічно змінені клітини, отримані при підрахунку кількості формування АКФ слизової оболонки товстої кишки (поодиноких і мультикрипт), індукованих 1,2-диметилгідрозином.

1,2 диметилгідрозин специфічно впливає на периферичну частину кишечника у щурів, а також може викликати ушкодження ДНК. Саме фітоестрогени (ізофлавоноїди), флавоноїди, такі, як кверцетин, індоли тощо, яким притаманні і антиоксидантні властивості, гальмують метаболічну активацію та стимулюють детоксикацію канцерогенів.

Протипухлинна хіміотерапія викликає різноманітні побічні ефекти, зокрема утворення вільних радикалів і інактивування ферментів антиоксидантного захисту. Це є причиною токсичного пошкодження внутрішніх органів і найчастіше призводить до

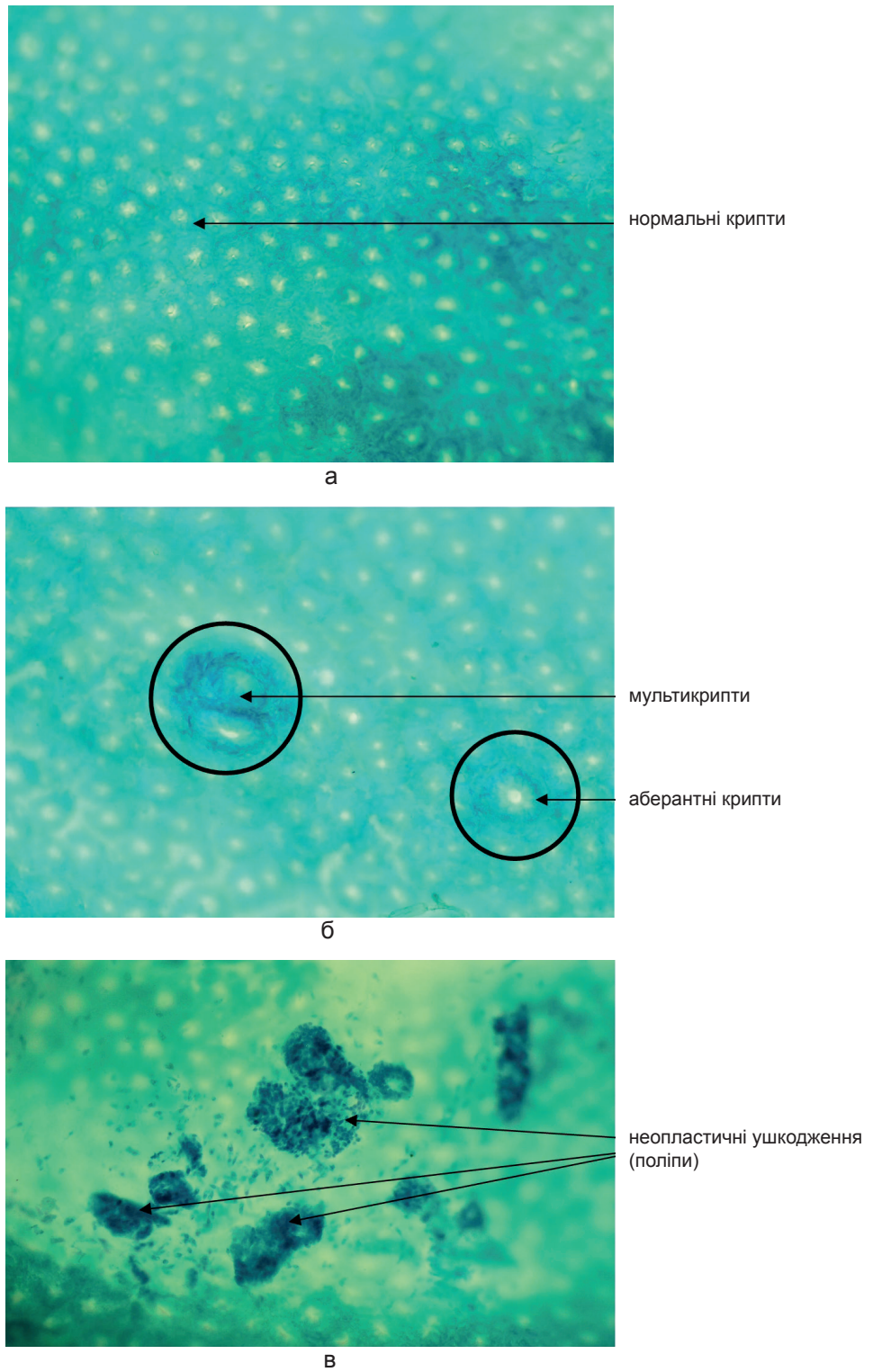


Рис. 1. Топографічний вигляд слизової оболонки товстої кишки щурів (препарати зафіксовані у формаліні та пофарбовані 0,2%-м метиленовим синім): а – у інтактних щурів, б, в – через 6 і 8 тиж від початку щотижневих ін'єкцій 1,2 диметилгідразину відповідно. Збільшення у 40 разів

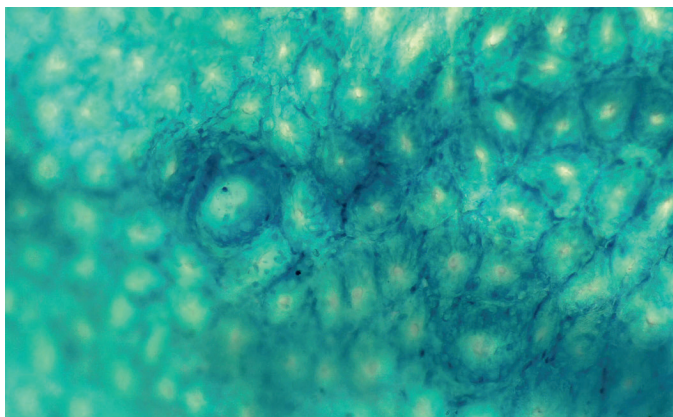
неможливості продовження лікування [11]. Сучасні дослідження свідчать, що рослинні поліфеноли можуть бути використані для зменшення небажаних побічних ефектів [12, 13]. Потенціальні агенти природного походження, що здатні гальмувати розвиток канцерогенезу, повинні підсилювати процеси фізіологічного захисту організму від пренеопластичної клітинної прогресії чи неопластичного клітинного росту.

Використання фіторечовин природного походження може зменшувати ризик, гальмувати розвиток колоректального канцерогенезу. Встановлено, що екстракти насіння фенугреку і деякі з їх сапонінових складових проявляють антиканцерогенний потенціал

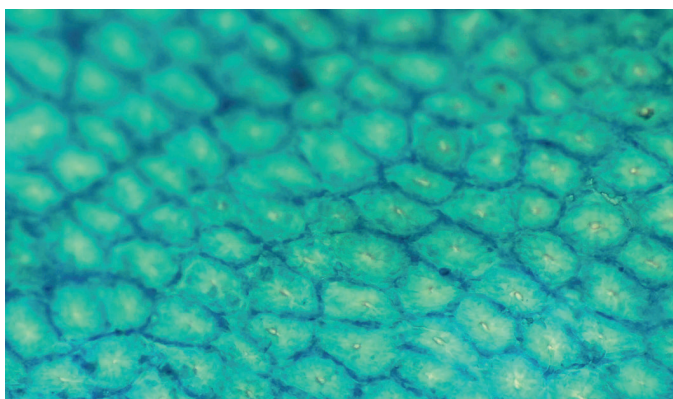
[12, 13]. Серед біоактивних компонентів, ізольованих з насіння фенугреку, є протодіопсин, тригонеозид, діостгенін, ямогенін тощо [4–6]. Ці речовини можуть зв'язувати канцерогенні метаболіти, а також гальмувати ендogenous синтез канцерогенних нітросполук [13].

Аналізуючи власні та літературні дані, можна передбачати, що використання біологічно активних речовин насіння фенугреку може активно впливати на процеси біотрансформації токсичних хімічних сполук-канцерогенів та їх спрямованої метаболізації [14, 15].

Особливістю біологічно активних речовин в необхідній дозі є їх пролонгуюча дія,



а



б

Рис. 2 Топографічний вигляд слизової оболонки товстої кишки тварин з експериментальним канцерогенезом, які отримували дрібнодисперсний порошок насіння фенугреку разом зі стандартним кормом (препарати зафіксовані у формаліні і пофарбовані метиленовим синім): а – протягом 6 тиж, б – протягом 8 тиж. Збільшення у 40 разів

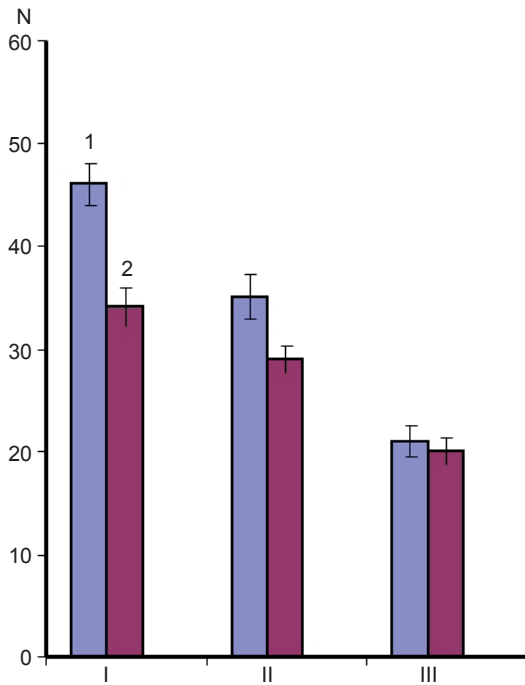


Рис. 3. Вплив біологічно активних речовин насіння фенугреку на формування аберантних крипт слизової оболонки товстої кишки (поодинокі – 1 і мультикрипт – 2), індукованих 1,2-диметилгідразином: I – тварини, у яких моделювали експериментальний канцерогенез товстої кишки, II, III – тварини, у яких моделювали експериментальний канцерогенез товстої кишки та які протягом 4 і 8 тиж отримували порошок насіння фенугреку разом із стандартним кормом відповідно

що дає змогу цілеспрямовано регулювати обмінні процеси в живих системах, що є перспективним для підвищення протипухлинного потенціалу організму.

Це може свідчити про перспективність використання біологічно активних речовин насіння фенугреку як можливих модуляторів побічної дії цитостатиків при лікуванні хворих на онкологічну патологію.

Таким чином, отримані результати за умов моделювання специфічного канцерогенезу при дослідженні дії насіння фенугреку виявили пригнічувальний вплив як на поодинокі аберантні крипти, так і на мультикрипти у товстій кишці, що дає змогу передбачати можливість використання його у комплексному лікуванні злоякісних новоутворень.

**О.А. Кравченко, И.В. Якубцова,
Т.Д. Хилько, Т.Д. Преображенская,
Л.И. Остапченко, В.Ф.Чехун**

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ПРИРОДНЫХ ВЕЩЕСТВ СЕМЯН ФЕНУГРЕКА НА ФОРМИРОВАНИЕ АБЕРРАНТНЫХ КРИПТ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ У КРЫС

Аберрантные крипты Foci (АКФ) считаются предраковыми повреждениями и биомаркерами при скрининге потенциальных хемопротективных веществ. Терапия колоректального рака приводит к токсическим побочным эффектам. Природные биологически активные вещества все чаще используются для противодействия неопластическим процессам. Исследовано влияние семян фенугрека (*Trigonella foenum graecum* L.) на состояние слизистой оболочки толстой кишки на модели экспериментального канцерогенеза толстой кишки у крыс при развитии патологических изменений. Показано возможное гепатопротекторное действие и уменьшение одиночных АКФ на 40%, мультикрипт – на 31% в слизистой оболочке толстого кишечника животных, получавших мелкодисперсный порошок вместе со стандартным кормом.

Ключевые слова: аберантне крипти Foci, слизистая оболочка толстого кишечника, семена фенугрека (*Trigonella foenum graecum* L.).

**O.A. Kravchenko, I.V. Yakubtsova, T.D. Khilko,
T.D. Preobrazhenska, L.I. Ostapchenko,
V.F. Chekhun**

INFLUENCE OF COMPLEX NATURAL SUBSTANCES TRIGONELLA FOENUM GRAECUM L. SEEDS ON FORMING ABERRANT CRYPT FOCI IN THE MUCOSA AT EXPERIMENTAL COLON CANCER IN RATS

Aberrant crypt Foci are considered preneoplastic colonic lesions and biomarkers for screening potential chemoprotective substances. Colorectal cancer therapy leads to toxic side effects. Natural biologically active substances are increasingly being used to counteract neoplastic processes. The influence of *Trigonella foenum graecum* L. on the state of the colonic mucosa on the model of experimental colon carcinogenesis in rats in the dynamics of pathological changes. It is shown a possible hepatoprotective effect and reduction of single aberrant crypts Foci 40%, multicrypts Foci – 31% in the colonic mucosa of animals treated finely dispersed powder together with the standard feed.

Key words: aberrant crypts Foci, colon mucosa, *Trigonella foenum graecum*

T. Shevchenko Kyiv National University

REFERENCES

1. Nikishaev VI, Patiy AR, Tumak IN, Kolyada IA Endoscopic diagnostics of early colorectal cancer. Ukr J Min Invasive and Endoscopic Surgery. 2012; 16: 35-55.
2. Alrawi SJ, Schiff M, Carols RE, et al., Aberrant Crypt Foci. Anticancer Res. 2006; 26: 107-120.
3. Jian-Guo Wang, Dong-Fei Wang, Bing-Jian Lv, Jian-Min Si. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. World J Gastroenterol. 2004; 10 (20). – P. 2958–2962.
4. Plechyschik ED, Goncharova LV, Spiridovich EV, Reshetnikov VN. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) as a source of a wide variety of biologically active compounds. Proceedings of the Belarusian State University. Ser. "Physiological, Biochemical and Molecular Biology Sciences." 2009; 4 (2): 138-146.
5. Murakami T, Kishi A, Matsuda H, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XVII. Fenugreek seed (3): structures of new furostanoltype steroid saponins, trigoneosides Xa, Xb, XIb, XIIa, XIIb, and XIIIa, from the seeds of Egyptian *Trigonella foenum graecum* L. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000;48:994-1000.
6. Mehrafarin A, Qaderi A, Rezazadeh N., et al. Bioengineering of important secondary metabolites and metabolic pathways in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). J Med Plants. 2010; 9 (35): 1–18.
7. Sur P, Das M, Gomes A, et al. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. Phytother Res. 2001;15:257-9.
8. Hibasami H, Moteki H, Ishikawa K, et al. Protodioscin isolated from fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) induces cell death and morphological change indicative of apoptosis in leukemic cell line H-60, but not in gastric cancer cell line KATO III. Int J Mol Med. 2003; 11: 23-6.
9. Norton SA. Useful plants of dermatology. III. Corticosteroids, strophanthus, and dioscorea. J Am Acad Dermatol. 1998; 38:256-9.
10. Moalic S, Liagre B, Corbiere C, et al. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. FEBS Lett. 2001; 506:225-30.
11. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M., et al. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. Mol. Interv. 2007; 7 (3): 147–156.
12. Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. Altern. Ther. Health Med. 2007; 13: 22–28.
13. Prasad KN. Multiple dietary antioxidants enhance the efficacy of standard and experimental cancer therapies and decrease their toxicity. Integr. Cancer Ther. 2004; 3: 310–322.
14. Devasena T. Fenugreek affects the activity of β -glucuronidase and mucinase in the colon. Phytother Res. 2003; 17: 1088-1091.
15. Shaban A, Jahanmehr SA, Rezaeian M, et al. Fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum* L.) Seed Extract Induces Cell Death, Growth Inhibition and Morphological Change Indicative of Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. Res J Biol Sci. 2007; 2 (4): 438-43.

Матеріал надійшов до редакції 15.05.2014