

dr hab. Łukasz Adaszek¹, mgr Olga Stabczyńska¹, dr n. wet. Marcin Gołyński², lek. wet. Paweł Łyp¹, lek. wet. Dagmara Gadomska³, dr n. wet. Jerzy Ziętek¹, dr n. wet. Dorota Różańska⁴, dr n. wet. Maciej Orzelski⁴, dr n. wet. Anna Śmiech⁵, dr hab. Wojciech Łopuszyński⁵, prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk¹

¹Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie, ²Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie, ³ARKONA L.F.S., ⁴Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie, ⁵Katedra Anatomii Patologicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie

Ocena działania przeciwnowotworowego ekstraktu z papryczek habanero, zawierającego kapsaicynę, w stosunku do wybranych linii komórek nowotworowych psów – *in vitro*

The evaluation of antitumor effect of the of hot pepper extract containing capsaicin against selected canine tumor cell lines – *in vitro*

STRESZCZENIE:

Kapsaicyna to związek organiczny wytwarzany przez rośliny z rodziny *Capsicum*, odpowiedzialny za pikantny smak papryki. Jest powszechnie stosowana jako środek przeciwbólowy, a jej działanie przeciwnowotworowe jest obecnie intensywnie badane. W artykule przedstawiono ocenę działania przeciwnowotworowego ekstraktu z papryczek habanero, zawierającego kapsaicynę, w stosunku do wybranych linii komórek nowotworowych psów *in vitro*. Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakt wykazuje dobrą aktywność przeciwnowotworową *in vitro*, tak więc dalsze badania kliniczne są konieczne dla potwierdzenia jego aktywności *in vivo*.

SŁOWA KLUCZOWE:

kapsaicyna, nowotwory, psy.

SUMMARY:

Capsaicin, an organic compound produced by plants from the *Capsicum* family, is responsible for the spicy taste of pepper. Capsaicin is widely used as analgesic, and its chemopreventive and anticarcinogenic activity is now extensively studied. In this article was presented antitumor effect of hot pepper extract containing capsaicin against selected canine tumor cell lines *in vitro*. Obtained results indicate that the extract shows a good anticarcinogenic activity *in vitro*, so the further clinical study are necessary to confirm its activity *in vivo*.

KEY WORDS:

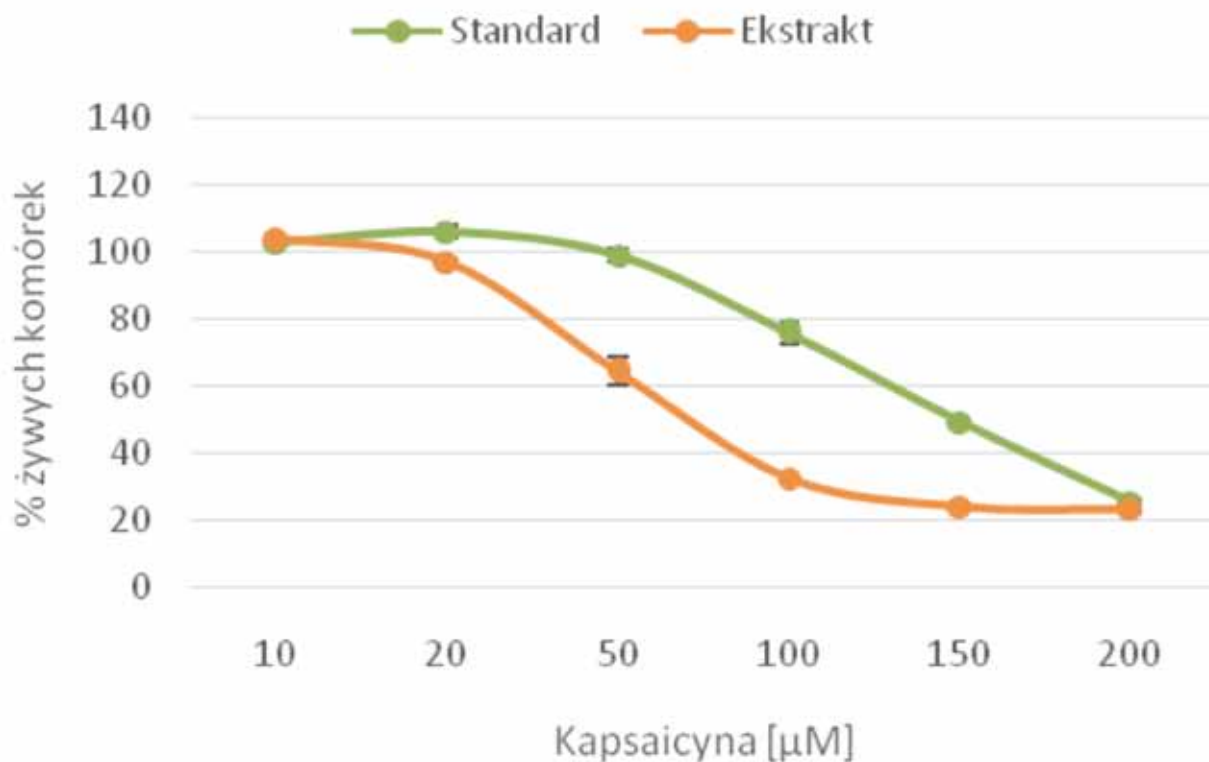
capsaicin, neoplasma, dogs.

Farmakoterapia chorób nowotworowych jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną medycyny człowieka i medycyny weterynaryjnej. Obecne kierunki leczenia onkologicznego zmiierają ku temu, by nowotwór był wyleczalny oraz by ze śmiertelnej stał się chorobą przewlekłą o długim horyzoncie czasowym. Nie dziwi więc fakt, iż by osiągnąć te cele w onkologii testowane są coraz to nowe substancje, które oprócz wysokiej skuteczności powinny być także tanie w produkcji. W ostatnim czasie stosunkowo dużo uwagi poświęca się w tym względzie kapsaicynie.

Kapsaicyna (trans-8-metylo-N-wanilino-6-nonenamid) jest organicznym związkiem z grupy alkaloidów, uzyskiwanym z roślin z rodziny *Capsicum* o wzorze chemicznym: $C_{18}H_{27}NO_3$ i masie cząsteczkowej 305,41 g/mol. Stosunkowo duże jej ilości znajdują się w owocach różnych odmian papryki, a sam związek odpowiedzialny jest za ich pikantny smak. Kapsaicyna wiąże się z receptorem waniloidowym TRPV1 (ang. *transient receptor potential vanilloid subtype 1*) [1], który w dużych ilościach znajduje się w podwzgórze, na zakończeniach neuronów czuciowych, w zwojach nerwowych korzenia grzbietowego oraz nerwu trójdzielnego. Receptor ten obecny jest także w nerkach, wątrobie, pęcherzu moczowym oraz trzustce [2].

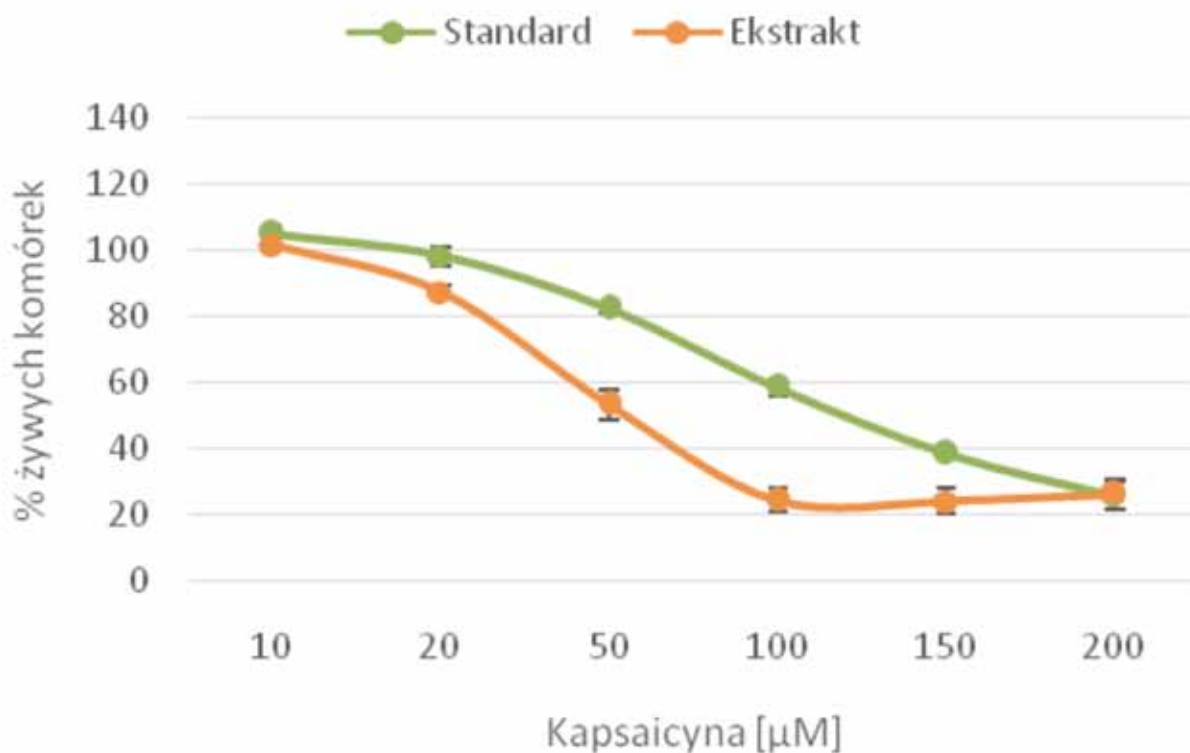
Kapsaicyna po związaniu się z receptorem TRPV1 powoduje otwarcie kanału kationowego, efektem czego jest napływ kationów do wnętrza komórki i jej depolaryzacja. Powstający w następstwie tego potencjał czynnościowy przekazywany jest do rdzenia kręgowego, gdzie odpowiada za odczuwanie ciepła i bólu. Pod wpływem kapsaicyny może dochodzić do rozszerzenia naczyń skórnych i zwiększenia oddawania ciepła, co skutkuje rozwojem hipotermii, z drugiej jednak strony alkaloid ten może powodować przyspieszenie metabolizmu, a co za tym idzie – stymulować wytwarzanie ciepła w organizmie i wzrost temperatury wewnętrznej ciała [3, 4].

D-17 - cytotoksyczność kapsaicyny 24 h



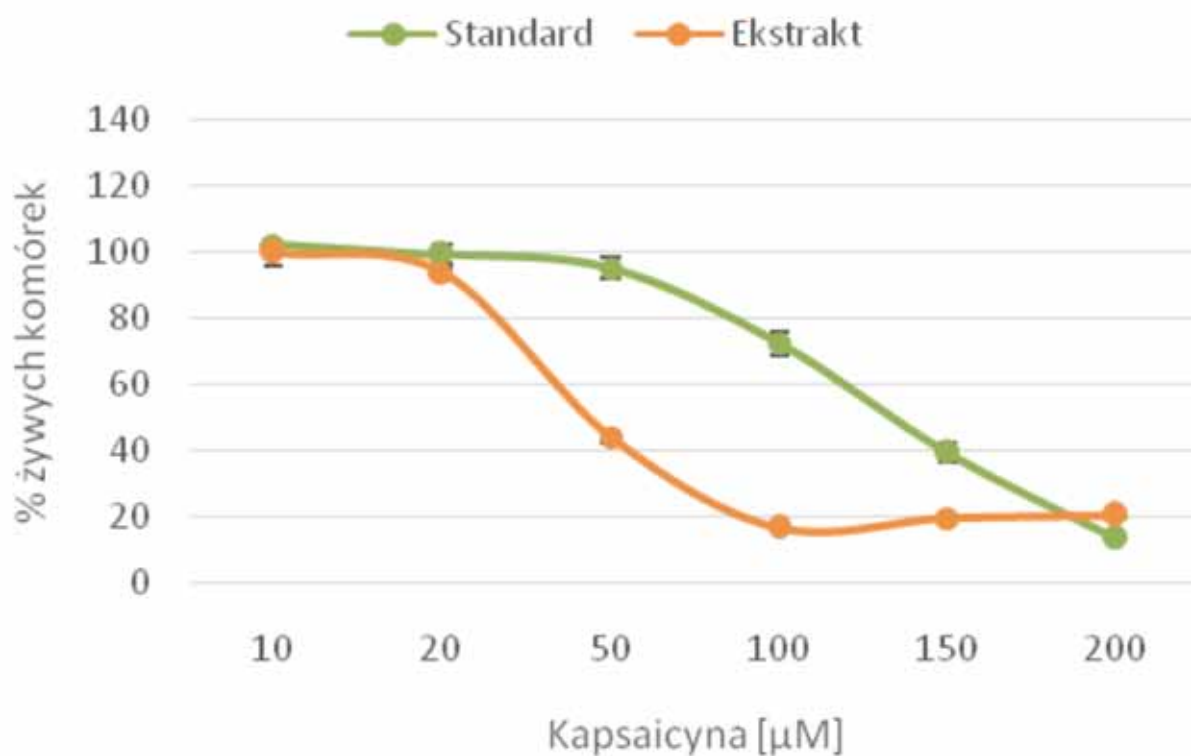
Rys. 1a. Wyniki badania cytotoksyczności ekstraktu z papryczek habanero vs czysta kapsaicyna w hodowli komórkowej D-17 po 24 h inkubacji komórek z badanymi ekstraktami.

DAN - cytotoksyczność kapsaicyny 24 h



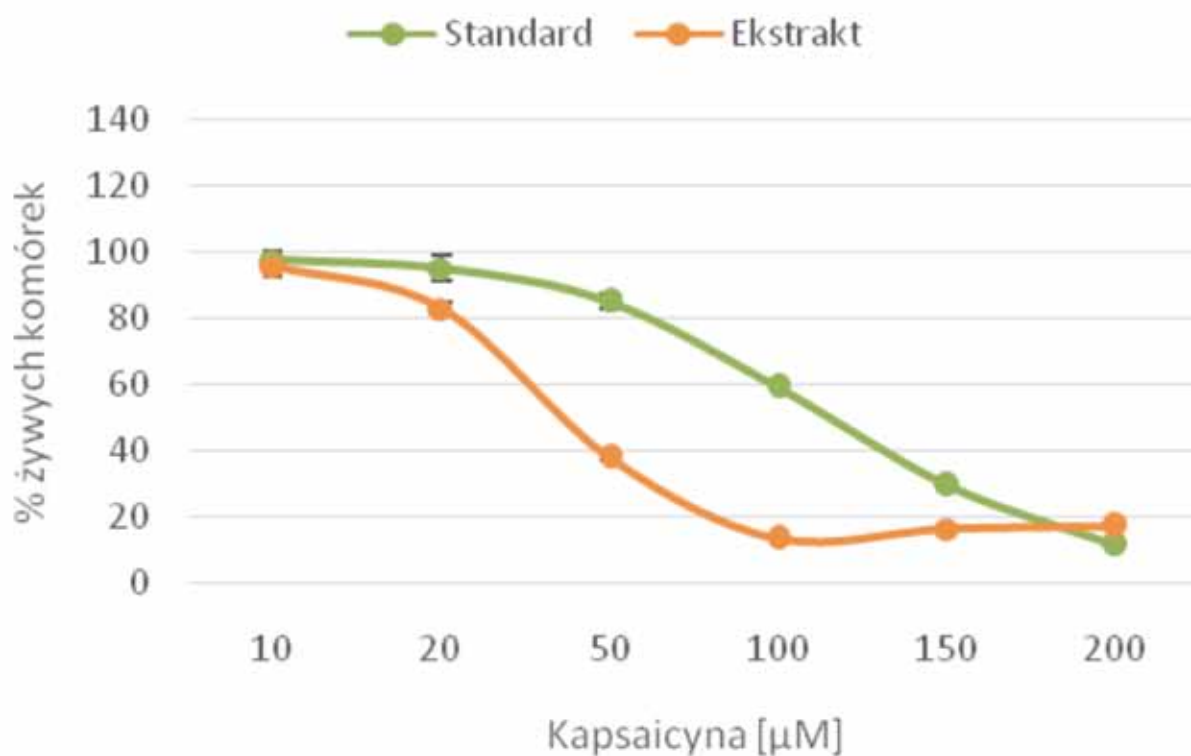
Rys. 1b. Wyniki badania cytotoksyczności ekstraktu z papryczek habanero vs czysta kapsaicyna w hodowli komórkowej DAN po 24 h inkubacji komórek z badanymi ekstraktami.

D-17 - cytotoksyczność kapsaicyny 48 h

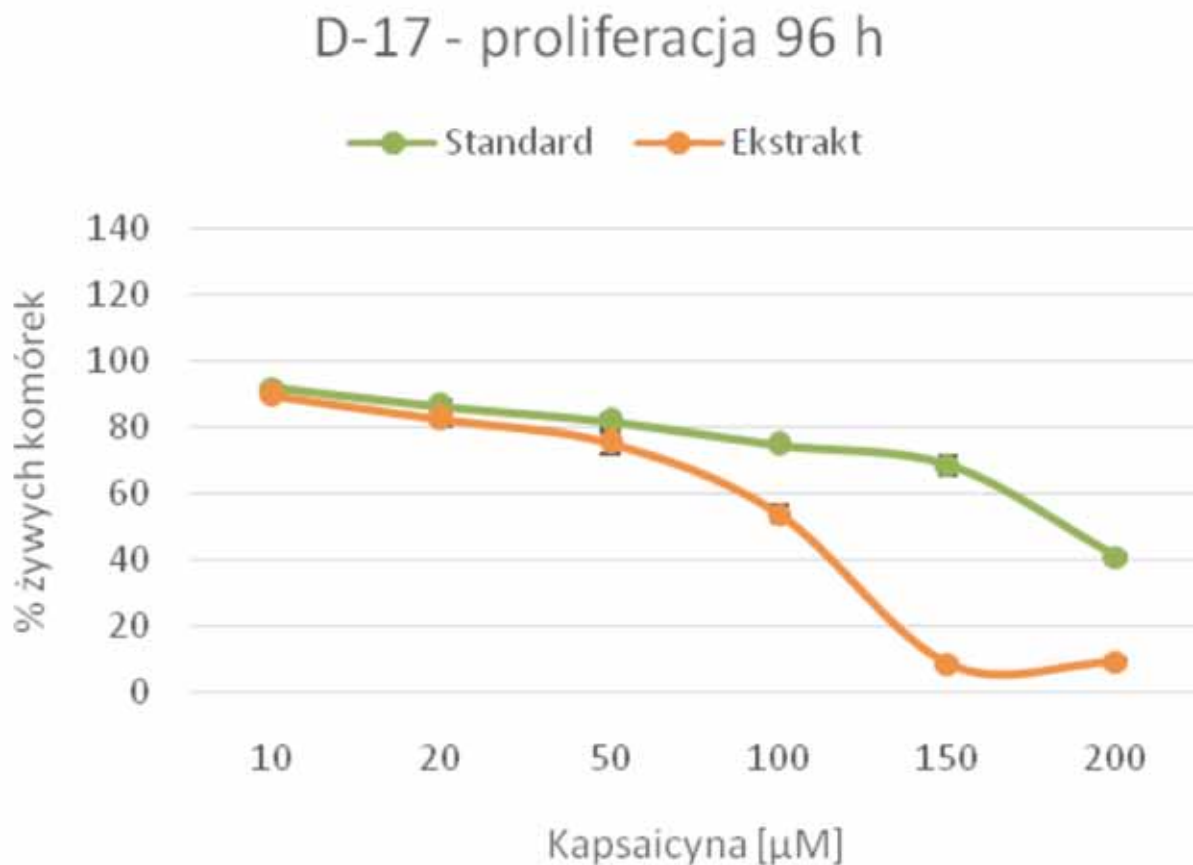


Rys. 2a. Wyniki badania cytotoksyczności ekstraktu z papryczek habanero vs czysta kapsaicyna w hodowli komórkowej D-17 po 48 h inkubacji komórek z badanymi ekstraktami.

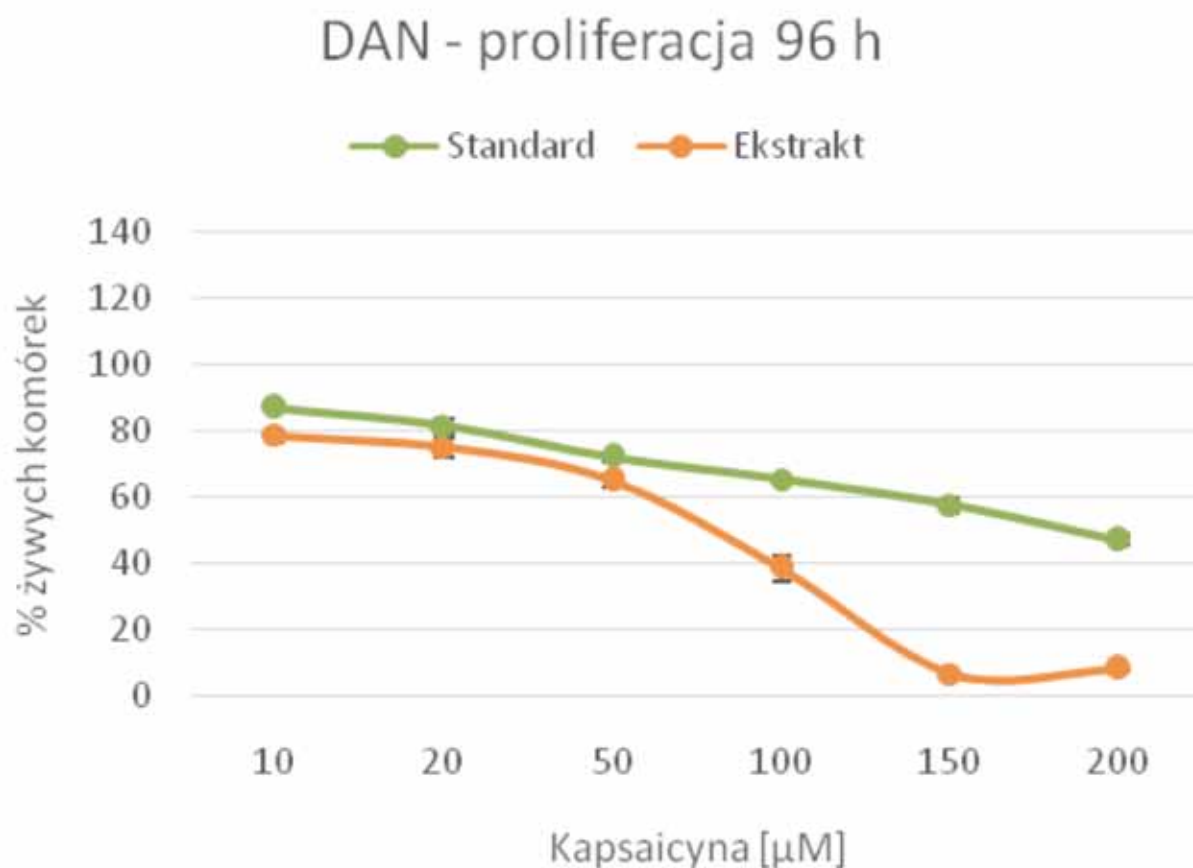
DAN - cytotoksyczność kapsaicyny 48 h



Rys. 2b. Wyniki badania cytotoksyczności ekstraktu z papryczek habanero vs czysta kapsaicyna w hodowli komórkowej DAN po 48 h inkubacji komórek z badanymi ekstraktami.



Rys. 3a. Wpływ ekstraktu z papryczek habanero vs czysta kapsaicyna na proliferację komórek linii D-17 po 96 h inkubacji komórek z badanymi ekstraktami.



Rys. 3b. Wpływ ekstraktu z papryczek habanero vs czysta kapsaicyna na proliferację komórek linii DAN po 96 h inkubacji komórek z badanymi ekstraktami.

Udowodniono, że kapsaicyna moduluje metabolizm związków rakotwórczych i mutagennych, w związku z czym alkaloid ten stał się obiektem badań onkologów, zaczęli oni upatrywać w niej substancję, która mogłaby być wykorzystywana w prewencji i terapii nowotworów [5]. W medycynie ludzkiej wykazano skuteczność kapsaicyny w terapii nowotworów m.in.: piersi, trzustki, pęcherza moczowego czy prostaty [6-8]. W medycynie weterynaryjnej dotychczasowe badania nad ekstraktem z papryczek habanero oraz samą kapsaicyną ograniczały się do oceny bezpieczeństwa ich stosowania u zwierząt laboratoryjnych [9, 10].

Celem tego artykułu była ocena skuteczności przeciwnowotworowej ekstraktu z papryczek habanero, zawierającego kapsaicynę, w sto-

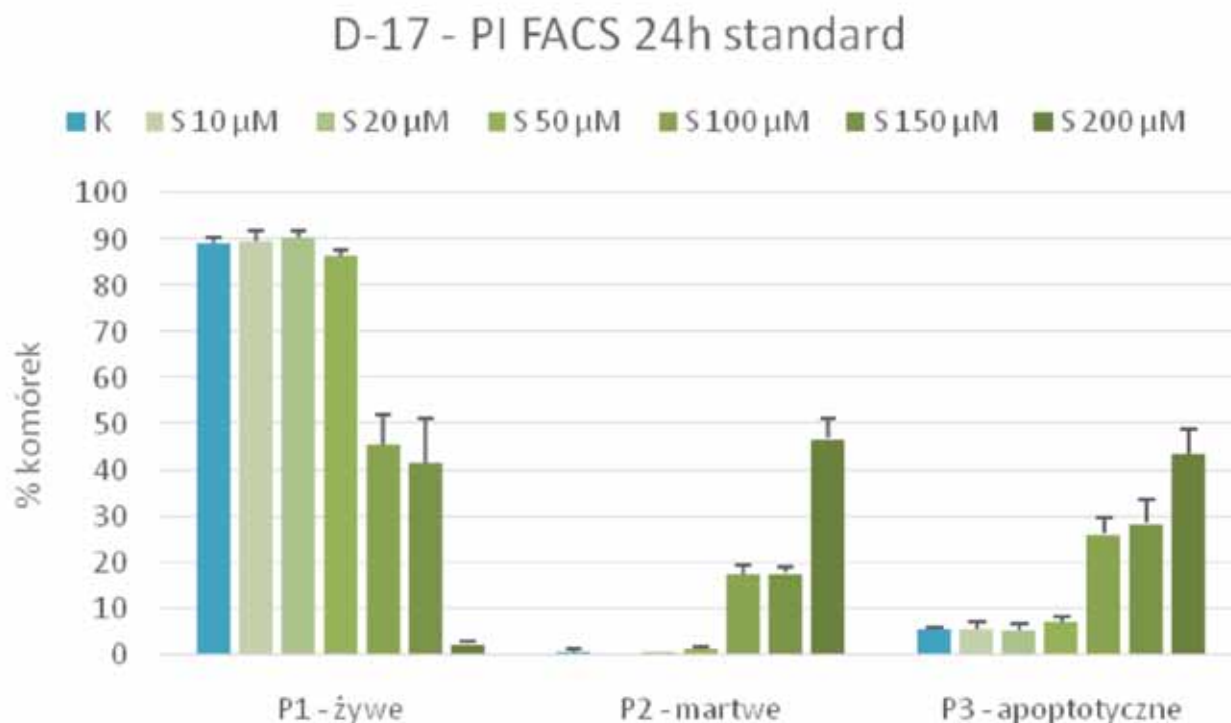
sunku do dwóch linii nowotworów psów: DAN (fibroblasty izolowane z kostniakomięsaka) i D-17 (komórki epitelialne kostniakomięsaka pobrane z guzów przerzutowych z płuc) w warunkach *in vitro*.

OBSERWACJE WŁASNE

Badania przeprowadzono na ekstrakcie z papryczek habanero zawierającym w 1 g suchej masy 7,64 mg kapsacynoidów (kapsaicyna i dihydrokapsaicyna). Skuteczność działania przeciwnowotworowego owego ekstraktu porównywano z oczyszczoną kapsaicyną (standard) *in vitro* na liniach komórkowych DAN i D-17. Skuteczność przeciwnowotworową ekstraktu z papryczek habanero określano w teście MTT (ocena cytotoksyczności i wpływ na proliferację komórek nowotworowych) oraz z wykorzystaniem cytometrii prze-

żywowej (ocena żywotności komórek). Do hodowli komórkowych wprowadzano ekstrakty z papryczek zawierające kapsaicynę w stężeniu 10, 20, 50, 100, 150 i 200 μM , po czym całość inkubowano (37°C , 5% CO_2). Cytotoksyczność ekstraktu określano po 24 i 48 h inkubacji, natomiast wpływ na proliferację komórek nowotworowych – po 96 h inkubacji linii komórkowych z ekstraktem.

W teście MTT wykazano, że cytotoksyczność ekstraktu z papryczek habanero oraz hamowanie proliferacji komórek nowotworowych przewyższają cytotoksyczność oraz zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych, jakie wykazuje czysta kapsaicyna. Istotnie statystycznie silniejsze działanie przeciwnowotworowe ekstraktu z papryczek od czystej kapsaicyny



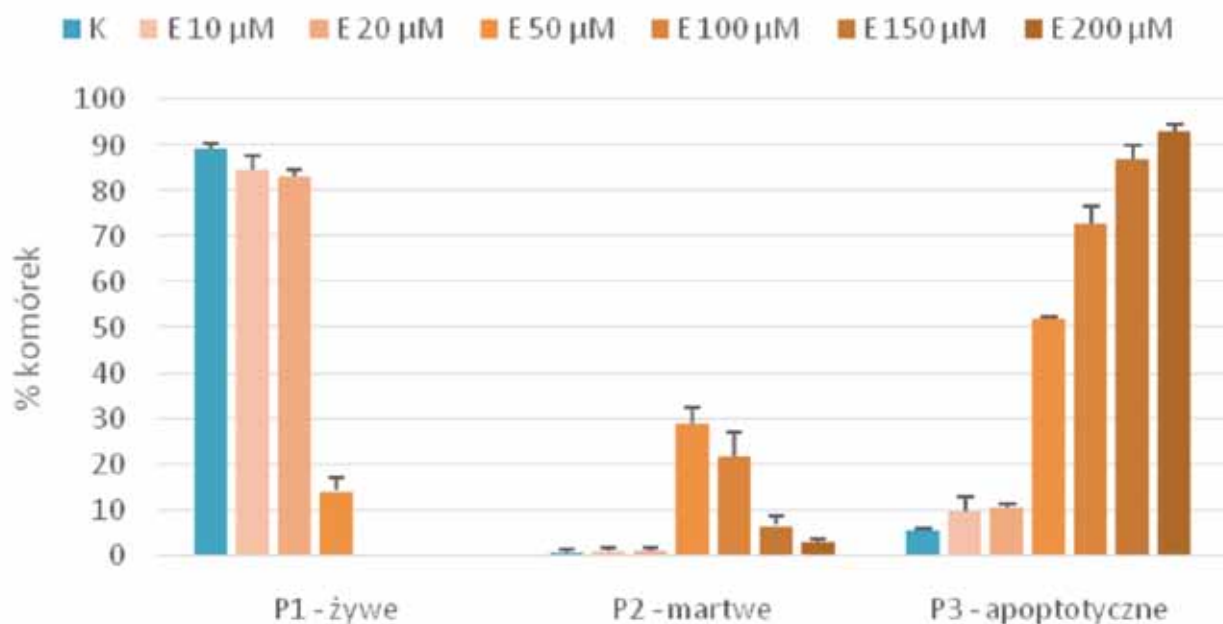
Rys. 4. Wyniki badania cytometrycznego obrazującego wpływ ekstraktu z papryczek habanero, zawierającego różne stężenia kapsaicyny (10-200 μM), vs standard kapsaicyny na komórki nowotworowe linii D-17 i DAN.

P1 – populacja komórek żywych

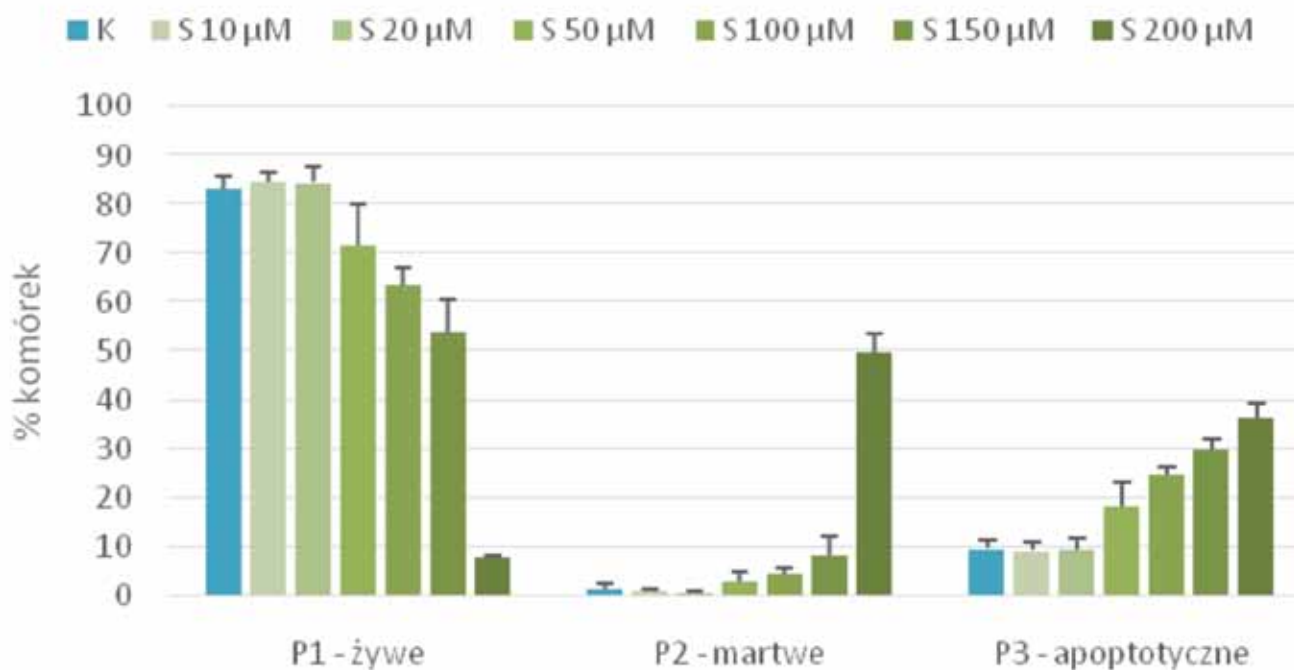
P2 – populacja komórek martwych

P3 – populacja komórek apoptotycznych

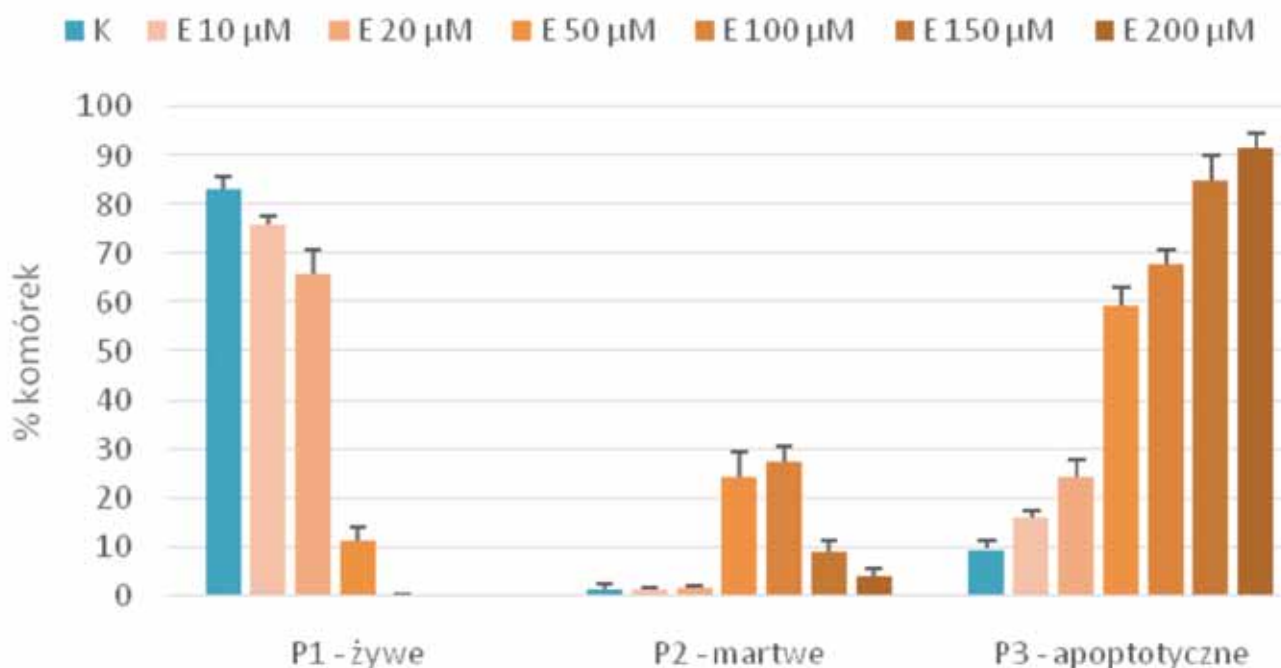
D-17 - PI FACS 24h ekstrakt



DAN - PI FACS 24h standard



DAN - PI FACS 24h ekstrakt



obserwowano, gdy do hodowli wprowadzono ekstrakt zawierający kapsaicynę w stężeniu $50 \mu\text{M}$, lub wyższym (rys. 1, 2 i 3).

Wyniki badań prowadzonych na hodowlach komórkowych potwierdzono cytometrycznie. Wprowadzenie do hodowli komórek DAN i D-17 ekstraktu z papryczek zawierającego kapsaicynę indukowało, niezależnie od stężenia alkaloidu, znacznie silniej apoptozę komórek nowotworowych w hodowli aniżeli czysta kapsaicyna (standard) (rys. 4).

OMÓWIENIE

Kapsaicyna może być wykorzystywana w zapobieganiu rozwojowi nowotworów, aczkolwiek wykazuje także korzystne oddziaływanie i pewnego stopnia skuteczność w stosunku do już istniejących chorób nowotworowych. W tym aspekcie jej działanie związane jest z indukowaniem apoptozy komórek nowotworowych w wyniku hamowania ostatniego etapu procesu oddychania komórkowego zachodzącego w mitochondriach. Apop-

toza komórek nowotworowych jest konsekwencją hamowania przez kapsaicynę transportu elektronów z NADH do ubichinonu lub też jej bezpośrednim wiązaniem z koenzymem Q, co powoduje zmianę kierunku przepływu elektronów i powstawanie reaktywnych form tlenu w nadmiarze. Konsekwencją tego jest rozproszenie transbłonowego potencjału w mitochondriach, mającego podstawowe znaczenie dla funkcjonowania tych organelli [11]. Apoptoza rozpoczyna się od załamania potencjału transbłonowego, natomiast aktywne formy tlenu mogą powodować uszkodzenie struktury i zaburzenie funkcji mitochondriów, a w konsekwencji śmierć komórki nowotworowej.

Apoptoza komórek nowotworowych zachodząca pod wpływem działania kapsaicyny związana jest z pobudzeniem przez ten alkaloid transkrypcji m.in. genu p53. Taki mechanizm działania, któremu towarzyszyła fragmentacja DNA w komórkach nowotworowych, potwierdzono w warunkach *in vitro* w przypadku komórek raka żołądka [12].

W badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach nowotworowych T24 pęcherza moczowego u myszy wykazano, iż w zależności od dawki kapsaicyna może pro-

wadzić do depolaryzacji błony mitochondriów, efektem czego jest śmierć komórki (nie jest to apoptoza). Sugeruje się więc, że alkaloid ten może być stosowany w terapii raka pęcherza moczowego [13].

Podobnie rzecz ma się z rakiem prostaty, w przypadku komórek którego alkaloid ten wykazuje silne działanie antyproliferacyjne. Kapsaicyna indukuje apoptozę zarówno w komórkach rakowych posiadających receptor androgenowy (AR), jak i pozbawionych AR. Zwiększa przy tym stężenie białek p53, Bax i p21, biorących udział w kontroli cyklu komórkowego. Omawiana substancja zmniejsza ekspresję swoistego antygenu sterczowego (PSA, z ang. *prostate-specific antigen*), będącego najlepiej poznaną ludzką proteazą serynową z rodziny kalikrein, wytwarzaną w gruczole krokowym i obecną we krwi w stężeniu podwyższonym m.in. w przypadku zapalenia gruczołu krokowego, łagodnego przerostu prostaty lub raka gruczołu krokowego [14].

Obserwacje te są potwierdzeniem wyników badań własnych, w których wykazano, że ekstrakt z papryczek habanero, zawierający w swym składzie kapsaicynę, wykazuje zarówno cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotwo-

rowych, jak i hamuje istotnie ich proliferację.

W badaniach własnych posłużono się dwiema liniami komórkowymi (D-17 i DAN), reprezentującymi jedno z częściej stwierdzanych nowotworów u psów. Potwierdzenie skuteczności przeciwnowotworowej badanego ekstraktu w stosunku do omawianych komórek stanowi punkt wyjścia do rozpoczęcia szerokich obserwacji klinicznych i jest dobrym prognostykiem dla przyszłych badań.

PIŚMIENNICTWO:

1. Cromer B.A., McIntyre P.: *Painful toxins acting at TRPV1*. „Toxicol”, 2008, 51, 163-173.
2. O’Neil R.G., Brown R.C.: *The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli*. „News Physiol. Sci.”, 2003, 18, 26-31.
3. Olszewska J.: *Kapsaicyna – lek czy trucizna?* „KO-SMOS”, 2010, 59, 133-139.
4. Winter J., Bevan S., Campbell E.A.: *Capsaicin and pain mechanisms*. „Br. J. Anaesth.”, 1995, 75, 157-168.
5. Surh Y.J., Lee S.S.: *Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen?* „Food Chem. Toxicol.”, 1996, 34, 313-316.
6. Diaz-Laviada I., Rodriguez-Henche N.: *The potential antitumor effects of capsaicin*. „Prog Drug Res.” 2014, 68, 181-208.
7. Gilardini Montani M.S. i wsp.: *Capsaicin-mediated apoptosis of human bladder cancer cells activates dendritic cells via CD91*. „Nutrition”. 2015, 31, 578-581.
8. Venier N.A. i wsp.: *Capsaicin: a novel radio-sensitizing agent for prostate cancer*. „Prostate”. 2015, 75, 113-125.
9. Saito A., Yamamoto M.: *Acute oral toxicity of capsaicin in mice and rats*. „J Toxicol Sci.” 1996, 21, 195-200.
10. Golyński M. i wsp.: *Systemic and local effects of intragastric administration of the habanero fruit (Capsicum chinense Jacquin c.v.) in rats*. „J. Physiol. Pharmacol.”, 2015, 66, 259-265.
11. Surh Y.J.: *More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide*. „J. Natl. Cancer Inst.”, 2002, 94, 1263-1265.
12. Kim J.D. i wsp.: *Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1*. „Cancer Lett.”, 1997, 120, 235-241.
13. Yang Z.H. i wsp.: *Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization*. „Urology”, 2010, 75, 735-741.
14. Mori A. i wsp.: *Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells*. „Cancer Res.”, 2006, 15, 3222-3229.

REKLAMA



Dostępny w hurtowniach weterynaryjnych na terenie całego kraju

PRZECIWNOWOTWOROM

SKUTECZNOŚĆ POTWIERDZONA
BADANAMI NAUKOWYMIProducent: ARKONA, Nasutów 99 C, 21-025 Niemce
tel.: 664 407 298, info@capsomasol.com

www.capsomasol.com