

Ocena wpływu owocu habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) na stan błony śluzowej przewodu pokarmowego oraz narządy mięszone u szczurów

M. Gołyński, I. Balicki, K. Lutnicki, A. Śmiech, Ł. Adamek, M. Szczepanik,
P. Wilkołek, A. Brodzik, Ł. Adaszek

Owoce habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) są powszechnie wykorzystywane jako przyprawa a ich wyjątkowo ostry smak powoduje znaczna zawartość kapsaicyny. Spożywane w wysokich dawkach mają działanie prozdrowotne, przy czym nie do końca poznane są ich skutki uboczne. Informacje o działaniu przeciwnowotworowym kapsaicyny, pochodzące z medycyny ludowej znalazły potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych raka prostaty, niedrobnokomórkowego raka płuc, raka żołądka, sutka i trzustki oraz białaczki i glejaka – dzisiaj wiadomo, że substancja ta indukuje apoptozę komórek nowotworowych (1, 2, 3). Stwierdzono, że jej zastosowanie w dawce 10 mg/kg m.c. u myszy po implantacji ludzkiego raka drobnokomórkowego płuc istotnie zmniejszyło rozmiary guza, nie wywołując przy tym skutków ubocznych (1). W innych badaniach, po implantacji komórek ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy stosowano dootrzewnowe podawanie kapsaicyny w dawce 1-3mg/kg m.c. co 3 dni. W tym 30-dniowym eksperymencie zaobserwowano zahamowanie wzrostu guza i nie stwierdzono skutków ubocznych prowadzonej terapii (4). Działanie przeciwnowotworowe kapsaicyny uwarunkowane jest również hamowaniem angiogenezy *in vitro* i *in vivo* poprzez obniżenie wydzielania vascular endothelial growth factor (VEGF) (5). Stwierdzono również, że kapsaicyna stosowana w dawce 1mg/kg m.c. redukowała poziom cytokin prozapalnych a stymulowała wydzielanie IL-10 wykazując działanie przeciwzapalne (6).

Kapsaicyna zawarta w przemysłowo przetworzonych produktach żywnościowych spożywana jest przez ludzi w Europie i USA średnio w ilości 0,77 mg/osobę/dzień i maksymalnie 2,64 mg/osobę/dzień. Zalecany limit zawartości kapsaicyny wynosi 5mg/kg gotowego produktu żywnościowego (7). Jednak w krajach o najwyższym, kulturowo uwarunkowanym spożyciu ostrych przypraw (Tajlandia, Meksyk, Indie), dzienne spożycie kapsaicynoidów wynosi 0,5 – 4 mg/kg m.c., co daje w przeliczeniu 25-200 mg/os./dzień zakładając, że średnia masa ciała wynosi 50kg (8). Według obserwacji dotyczących występowania nowotworów w tej grupie ludzi, zbyt wysokie spożycie kapsaicyny zwiększa znacznie ryzyko zachorowalności na raka żołądka, ale już w ilości poniżej 30mg/osobę/dz. (0,6 mg/kg m.c./dzień) ryzyko wystąpienia choroby jest bardzo małe (9).

Mimo wszystko jest to dawka wyższa od maksymalnej spożywanej w Europie i USA ponad 24 razy.

Literatura medyczna dysponuje szczegółowym opisem przypadku, 66-letniego mężczyzny, u którego stwierdzono raka gruczołu krokowego poddającego się działaniu spożywanego owocu habanero. Istotny w przebiegu nowotworu wskaźnik PSA spadał u pacjenta zawsze po spożyciu sosu z habanero w ilości do 15 ml/dziennie w 2 dawkach podzielonych (10). Zawartość kapsaicyny w owym sosie określono na poziomie 0,454 mg/ml co daje dawkę kapsaicyny 6,81 mg/osobę/dzień, w przeliczeniu około 0,11mg/kg m.c./dzień. Biorąc pod uwagę zawartość kapsaicyny w suchej masie (s.m.) owocu habanero pacjent przyjmował dziennie około 1,58 g s.m. owocu habanero w 2 dawkach podzielonych. Daje to około 0,026 g s.m. owocu habanero /kg m.c. dziennie.

Kapsaicyna stosowana u szczurów dożołądkowo, nawet w dawce 50mg/kg m.c./dzień przez 60 dni wykazywała nieznaczny wpływ na te zwierzęta. Jedynym ubocznym skutkiem było zahamowanie wzrostu (11). Typowe objawy zatrucia to drgawki, konwulsje, podniecenie, skurcze mięśni, ale stwierdza się je dopiero po dootrzewnowym podaniu kapsaicyny w dawce 9,5 mg/kg m.c. lub po podaniu doustnym w dawce 154 mg/kg m.c. (LD50) (12, 13). Bezpieczeństwo dożołądkowego stosowania kapsaicynoidów w dużej mierze zależy od stężenia substancji w aplikowanej mieszaninie. Podanie tą drogą czystej kapsaicyny w roztworze 0.014% w soli fizjologicznej powodowało uszkodzenie błony śluzowej dwunastnicy w postaci zmian w mitochondriach, rybosomach i siateczce endoplazmatycznej (14).

Cel badań

Celem badań była ocena wpływu dożołądkowego podawania suszonego owocu habanero na stan błony śluzowej przewodu pokarmowego oraz narządów mięsnych szczurów.

Materiał i metody

Zwierzęta. Experiments on animals were conducted with due approval of the procedures by the Local Animal Ethics Committee with regard to the care and use of animals. Badania przeprowadzono na 72 Wistar male albino rats (120 - 125 g), które pochodziły z hodowli zwierząt laboratoryjnych. Przetrzymany były w klimatyzowanym pomieszczeniu Wiwarium Klinik Weterynaryjnych UP w Lublinie o wilgotności względnej powietrza wynoszącej 45-47% oraz temperaturze 22-23°C z cyklem świetlnym wynoszącym 12h światło/12h ciemność. Żywiące były komercyjną karmą dla zwierząt laboratoryjnych (LSM, Agropol Motycz, Poland) oraz otrzymywały wodę wodociągową do picia ad libitum. Okres aklimatyzacji wynosił 16 dni przed eksperymentem. Zwierzęta podzielone zostały na 3 grupy eksperymentalne (E1, E2 i E3) oraz 1 grupę kontrolną (C), liczące po 18 osobników.

Substancja badana. Substancją badaną był zmielony suchy owoc habanero o określonej metodą HPLC zawartości kapsaicynoidów 7,64 mg/g s.m. (kapsaicyna i dihydrokapsaicyna). Zawieszony był on w oleju arachidowym i podawany dożołądkowo w następujących dawkach dziennych: dawka niska - 0,025g s.m. owocu habanero /kg m.c. (grupa E1), dawka średnia - 0,05g s.m. owocu habanero /kg m.c. (grupa E2) oraz dawka wysoka - 0,08g s.m. owocu habanero /kg m.c. (grupa E3). Wymienione dawki dzienne podzielone były na 2 równe dawki stosowane co 12 godzin. Stężenia zawiesin przygotowano tak, aby każde zwierzę otrzymywało po około 0,5 ml każdorazowo. Po unieruchomieniu zwierzęcia chwytem grzbietowym aplikacja zawiesiny odbywała się przy użyciu atraumatycznej plastikowej sondy dożołądkowej dla gryzoni Instech-Solomon 15 ga. Zwierzęta kontrolne otrzymywały tą samą metodą po około 0,5 ml czystego oleju arachidowego.

Pobieranie krwi do badań. W 8, 15 i 29 dniu doświadczenia po przeprowadzeniu 12-godzinnej głodówki i wykonaniu badania klinicznego, 6 sztuk szczurów z każdej z 4 grup (E1, E2, E3, C) znieczulano przy użyciu ketaminy podawanej domięśniowo w dawce 80 mg/kg m.c.. W znieczuleniu ogólnym pobierano krew poprzez nakłucie prawej komory serca z użyciem igły 0,8 mm. Do próbek z K2EDTA pobierano krew w celu wykonania badania hematologicznego a w celu uzyskania surowicy do próbek na skrzep. Zwierzęta poddawano następnie eutanazji z użyciem pentobarbitalu sodu. Surowica była otrzymywana poprzez wirowanie próbek w 4°C przez 30 minut przy 4000 obr/min.

Badanie hematologiczne. Badanie krwi przeprowadzono przy użyciu analizatora hematologicznego Scil Vet ABC Plus firmy HORIBA uzyskując liczbę krwinek białych (WBC), krwinek czerwonych (RBC), zawartość hemoglobiny (HGB), wartość hematokrytu (HCT) oraz liczbę trombocytów (PLT). Rozmazy krwi barwiono metodą May- Grünwald i oglądano pod mikroskopem świetlnym obliczając odsetek poszczególnych leukocytów.

Badanie biochemiczne surowicy krwi. Oznaczenia aktywności transaminazy alaninowej (ALT), transaminazy asparaginowej (AST) oraz poziomów glukozy (GLU), cholesterolu (CHOL), bilirubiny (BIL), mocznika (U) i kreatyniny (CREA) wykonywano metodą kolorymetryczną z użyciem analizatora biochemicznego BS-130 firmy MINDRAY.

Badania morfologiczne. W badaniach anatomopatologicznych wykonanych natychmiast po eutanazji pobierano wycinki żołądka, dwunastnicy, wątroby oraz nerek. Materiał utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie i poddawano standardowej obróbce histologicznej. Skrawki o grubości 4 µm barwiono hematoksyliną i eozyną i oglądano w mikroskopie świetlnym.

Analiza statystyczna. For all parameters, the mean, and standard deviation (SD) were calculated. Statistical analysis was conducted by the Mann-Whitney U test at p-values of $p \leq 0.05$ (Statistica 10.0 software). For each parameter, statistically significant differences were calculated between control and experimental groups in day 8, 15 and 29.

Wyniki

Wyniki badań hematologicznych przedstawiono w tab.1 i 2. W grupie C liczba WBC podczas całego doświadczenia była na względnie stałym poziomie. W grupie E1 zaobserwowano nieznaczny jej spadek w 15 dniu, podobnie jak w grupach E2 i E3 w 29 dniu doświadczenia. Zaobserwowano stopniowy nieznaczny wzrost liczby RBC we wszystkich grupach badanych proporcjonalnie do dawki substancji badanej w 15 dniu doświadczenia. W grupie otrzymującej najwyższą dawkę habanero (E3) zawartość HGB wykazywała niewielki spadek w 29 dniu badania. Wartość HCT była we wszystkich grupach względnie stała. W grupie E1 w 15 dniu zaś w grupie E3 w 29 dniu zaobserwowano spadek liczby PLT. Badanie rozmazów krwi nie wykazywało również istotnych zmian w odsetku poszczególnych leukocytów, natomiast w ostatnim dniu badania we wszystkich grupach stwierdzono pojawienie się eozynofiliów. Pomiędzy grupami badanymi a grupą C nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic we wszystkich badanych parametrach hematologicznych, co wskazuje na brak wpływu substancji badanej.

Wyniki badania biochemicznego surowicy krwi przedstawiono w tab.3. Aktywność transaminaz ALT i AST jak i stężenie CHOL, BIL, GLU oraz U i CREA w surowicy krwi nie wykazywały statystycznie istotnych zmian, pomiędzy poszczególnymi grupami.

Zwłoki wszystkich zwierząt natychmiast po eutanazji badano anatomopatologicznie. Sekcja wykonana według ogólnie przyjętego schematu wykazała brak zmian patologicznych w narządach badanych szczurów.

Badanie mikroskopowe uzyskanych preparatów wykazało, że żołądek i dwunastnica miały prawidłową strukturę histologiczną, z prawidłowym ukształtowaniem poszczególnych warstw żołądka i wyraźnymi gruczołami właściwymi oraz śluzowymi. Gruczoły dwunastnicze zajmujące obszar błony podśluzowej cechowały się prawidłową strukturą mikroskopową. Mikroskopowy obraz wątroby nosił cechy prawidłowego narządu, bez patologicznych zmian. Hepatocyty o kwasochłonnej cytoplazmie układały się w beleczki wątrobowe, które biegiły promieniście ku żyłom środkowym. Granice zrazików wątrobowych wyznaczały linie łączące sąsiednie przestrzenie bramno-żółciowe. W przestrzeniach widoczne były przekroje przez tętnice, żyły oraz przewody żółciowe międzyczazikowe. Nie zaobserwowano różnic w strukturze mikroskopowej nerek szczurów pobranych z grup kontrolnych oraz doświadczalnych. Wykazywały one prawidłowe ukształtowanie miąższu zarówno w części korowej i rdzennej. Kanaliki kręte I rzędu, proksymalne wysłane nabłonkiem jednowarstwowym sześciennym ułożone były regularnie. Centralnie w komórkach nabłonka widoczne było wyraźne jądro, otoczone kwasochłonną cytoplazmą. Światło kanalików było gwiazdkowate, przysłonięte rąbkiem szczoteczkowym. Kanaliki kręte II rzędu dystalne cechowały się regularnym, okrągłym lub owalnym światłem. Komórki nabłonka posiadały słabo zaznaczone granice.

Dyskusja

Badania dotyczące spożywania roślin jadalnych są powszechnie stosowane w celu oceny ryzyka u zwierząt i ludzi, co jest szczególnie ważne w przypadku papryki zawierającej znaczne ilości kapsaicynoidów (15). W doświadczeniu wykorzystano dawki opracowane w oparciu o kulturowo uwarunkowane wysokie spożycie habanero przez ludzi oraz dane wskazujące na działanie przeciwnowotworowe kapsaicyny zawartej w substancji badanej (7, 8, 9, 10). Badania wykazały, że dożołądkowe podawanie owocu habanero nie powoduje u szczurów zmian hematologicznych, biochemicznych oraz anatomo- i histopatologicznych.

Obok dihydrokapsaicyny, nordihydrokapsaicyny czy homodihydrokapsaicyny najważniejszym składnikiem habanero w aspekcie toksykologicznym jest kapsaicyna. Zawieszona w oleju arachidowym i podawana szczurom dożołądkowo wchłania się szybko, nawet w około 94% i maksymalne stężenie osiąga we krwi już po 1 godzinie (16, 17). Dostaje się ona poprzez krążenie wrotne do wątroby, gdzie jest częściowo metabolizowana w mikrosomach a proces ten podobny jest u szczura, psa i człowieka (18). W niezmienionej postaci kapsaicyna wydalana jest w niewielkiej ilości (0,095 %) przez nerki oraz z kałem (6,3%) (16, 19). Niezbędne było zatem określenie wpływu substancji badanej na narządy mięszkowe przy czym w literaturze brak danych określających u zwierząt toksyczność owoców habanero. Z uwagi na zróżnicowany skład chemiczny owoców różnych papryk istnieją trudności w interpretacji uzyskanych wyników w układzie porównawczym.

Uzyskane wyniki badania hematologicznego we wszystkich grupach badanych nie wykazały zmian, co jest zgodne z wynikami Zimmer i wsp. dotyczącymi przewlekłego stosowania wyciągu z owoców *Capsicum baccatum* u myszy w dawce 200mg/kg m.c./dzień (19). Dowodzi to braku wpływu podawanej dożołądkowo papryki habanero na stan czynnościowy narządów hematopoetycznych. Ci sami autorzy nie stwierdzili również wpływu substancji badanej na parametry biochemiczne krwi (19). Jednak dodatek do diety *Capsicum annum* może wywoływać zależny od dawki niewielki wzrost poziomu CHOL w surowicy z uwagi na wysoką zawartość kwasów tłuszczowych w owocu, lecz nie stwierdzono znaczących skutków ubocznych przy stężeniu wynoszącym do 5% (20). Natomiast dożołądkowe podawanie wyciągu z owoców *Capsicum baccatum* w dawce 0,5g/kg m.c. dziennie powoduje po 4 tygodniach znaczne obniżenie poziomu azotu mocznika (BUN), GLU i CHOL (11). Podobnie jak badający *Capsicum frutescens* Anthony et al. (21) w naszych badaniach nie stwierdziliśmy wpływu habanero na parametry biochemiczne surowicy krwi. Dowodzi to wysokiego bezpieczeństwa stosowania substancji badanej w zaproponowanych dawkach. Potwierdzają to również wyniki badania anatomopatologicznego, które nie ujawniło żadnych zmian makroskopowych w obrębie narządów wewnętrznych. Nie wykazano również uszkodzeń w badanych preparatach mikroskopowych. Ponad 10% dodatek do diety zmielonego owocu *Capsicum frutescens* powoduje jednak u myszy wyczerpanie glikogenu i anizocytozę hepatocytów (22). Złuszczenie nabłonka do światła jelita oraz tłuszczową wakuolizację i martwicę hepatocytów w centrum zrazików stwierdzono u szczurów już

po 4 tygodniach spożywania takich samych ilości, natomiast 2% dodatek do diety nie powoduje już u nich jakichkolwiek skutków ubocznych (15, 20). Zawieszenie substancji badanej w oleju arachidowym powoduje dodatkowe potęgowanie naturalnych właściwości ochronnych papryki na błonę śluzową przewodu pokarmowego nie zmniejszając przy tym biodostępności składników (16, 23).

W przeprowadzonych badaniach dowiedziono wysokiego poziomu bezpieczeństwa farmakologicznego owocu habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) ponieważ u badanych zwierząt nie stwierdzono żadnych odchyłeń hematologicznych, biochemicznych oraz pośmiertnych. Przeprowadzone badania są pierwszą oceną stosowania owocu habanero u szczurów i stanowią mogą podstawę do dalszych rozważań na temat zastosowań klinicznych tej substancji badanej. Wymagają one jednak najpierw rozszerzenia o co najmniej badania genotoksyczności, wpływu na reprodukcję oraz rakotwórczości substancji badanej.

Piśmiennictwo

1. Brown KC, Witte TR, Hardman WE, Luo H, Chen YC, Carpenter AB, et al. Capsaicin Displays Anti-Proliferative Activity against Human Small Cell Lung Cancer in Cell Culture and Nude Mice Models via the E2F Pathway. *PLoS ONE* 2010; 5: 1-15.
2. Gil YG, Kang MK. Capsaicin induces apoptosis and terminal differentiation in human glioma A172 cells. *Life Sci* 2008; 82: 997-1003.
3. Tsou MF, Lu HF, Chen SC, Wu LT, Chen YS, Kuo HM, et al. Involvement of Bax, Bcl-2, Ca²⁺ and caspase-3 in capsaicin-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. *Anticancer Res* 2006; 26: 1965-1971.
4. Lu HF, Chen YL, Yang JS, Yang YY, Liu JY, Hsu SC, et al. Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells in vitro and colo 205 tumor xenografts in vivo. *J Agric Food Chem* 2010; 22: 12999-3005.
5. Jeong-Ki M, Kyu-Yeon H, Eok-Cheon K, Young-Myeong K, Sae-Won L, Ok-Hee, et al. Capsaicin Inhibits in Vitro and in Vivo Angiogenesis. *Cancer Res* January 2004; 6: 644-51.
6. Demirbilek SM, Ersoy O, Demirbilek S, Karaman A, Gürbüz N, Bayraktar N, et al. Small-Dose Capsaicin Reduces Systemic Inflammatory Responses in Septic Rats. *Anesth Analg* 2004; 99: 1501-7.
7. CREDOC/OCA (Observatoire des Consommations Alimentaires) 1998. Estimation des niveaux d'ingestion de substances aromatisantes Safrole, Estragole, Coumarine et Capsaïcine. Note technique No. 98.25.
8. Council of Europe, 2001. Committee of experts on flavouring substances. Datasheet on capsaicin.

9. López-Carrillo L, Camargo MC, Schneider BG, Sicinski LA, Hernández-Ramírez RU, Correa P, et al. Capsaicin consumption, *Helicobacter pylori* CagA status and IL1B-31C>T genotypes: a host and environment interaction in gastric cancer. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 2118-22.
10. Jankovic B, Loblaw AD, Nam R. Capsaicin may slow PSA doubling time: case report and literature review. *Urol Assoc J* 2010; 4: 9–11.
11. Monsereenusorn Y. Subchronic toxicity studies of capsaicin and capsicum in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1983; 41: 95-110.
12. Saito A, Yamamoto M. Acute oral toxicity of capsaicin in mice and rats. *J Toxicol Sci* 1996; 21: 195-200.
13. TOXIA6 Toxicol. Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford, 1980; 18.
14. Nopanitaya W, Nye SW. Duodenal mucosal response to the pungent principle of hot pepper (capsaicin) in the rat: Light and electron microscopic study. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1974; 30: 149-61.
15. al-Qarawi AA, Adam SE. Effects of red chilli (*Capsicum frutescens* L) on rats. *Vet Hum Toxicol* 1999; 41: 293-5.
16. Suresh D, Srinivasan K. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. *Indian J Med Res* 2010; 131: 682-91.
17. Kawada T, Suzuki T, Takahashi M, Iwai K. Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 72: 449-56.
18. Chanda S, Bashir M, Babbar S, Koganti A, Bley K. In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 670-5.
19. Zimmer AR, Leonardi B, Zimmer ER, Kalinine E, de Souza DO, Portela LV, et al. Long-Term Oral Administration of *Capsicum baccatum* Extracts Does Not Alter Behavioral, Hematological, and Metabolic Parameters in CF1 Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, Publ online Dec 17.
20. Kanki K, Nishikawa A, Furukawa F, Kitamura Y, Imazawa T, Umemura T, et al. A 13-week subchronic toxicity study of paprika color in F344 rats. *Food Chem Toxicol*. 2003, 41: 1337-43.
21. Anthony OE, Ese1 AC, Lawrence EO. Regulated Effects of *Capsicum frutescens* Supplemented Diet (C.F.S.D) on Fasting Blood Glucose Level, Biochemical Parameters and Body Weight in Alloxan Induced Diabetic Wistar Rats. *Br J Pharm Res* 2013; 3: 496-507.
22. Jang JJ, Devor DE, Logsdon DL, Ward JM. A 4-week feeding study of ground red chilli (*Capsicum annum*) in male B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol* 1992; 30: 783–7.
23. Yeoh KG, Kang JY, Yap I, Guan R, Tan CC, Wee A, et al. Chili protects against aspirin-induced gastroduodenal mucosal injury in humans. *Dig Dis Sci* 1995; 40:580-3.