

Дослідження впливу екстракту фенугрека на ріст карциноми молочної залози Ca755 у мишей

В.В.Жиленко, С.П.Залеток

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології», кафедра біохімії, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є.Кавецького НАН України, відділ біохімії пухлинного росту
Київ, Україна

У статті наведені результати вивчення протипухлинних властивостей екстракту фенугрека (*Trigonella Foenum Graecum L.*) у тварин з карциномою молочної залози Ca755. Виявлено, що екстракт фенугрека інгібує ріст пухлин та проявляє антиоксидантні властивості. Показано, що споживання тваринами екстракту фенугрека супроводжується пригніченням транслокації субодиниць фактора транскрипції NF-κB в ядра пухлинних клітин, зменшенням вмісту поліамінів у тканині карциноми Ca755 та зниженням експресії білків, продуктів, залежних від NF-κB генів (*bcl-xl, cox-2 і c-myc*). Це свідчить, що в механізми протипухлинної дії фенугрека залучені ПА- і NF-κB- залежні сигнальні шляхи.

Ключові слова: пухлинний ріст, екстракт фенугрека (*Trigonella Foenum Graecum L.*), поліаміни, фактор транскрипції NF-κB.

ВСТУП

Злоякісні новоутворення та серцево-судинні захворювання є провідними серед причин смертності населення. Щорічно у світі помирає понад 6 млн онкохворих та реєструється біля 10 млн людей з цим діагнозом [5]. Тому лікування хворих зі злоякісними новоутвореннями — одна з найважливіших проблем онкології. Враховуючи те, що основні методи терапії онкологічних хворих (хірургічні, хіміо- та променева терапія) залишаються недостатньо ефективними і мають суттєві негативні побічні прояви, все більшого значення набуває пошук та застосування нових протипухлинних агентів рослинного походження.

Прикладом таких агентів є рослинні поліфеноли різноманітної природи. До них належать гінестеїн, даїдзеїн сої; резвератрол червоного винограду; катехіни зеленого чаю; в-каротини моркви; лікопін помідорів; лимонен цитрусових; капсаїцин червоного перцю чілі; діосгенін пажитника та інші [24]. Було показано також, що в насінні та окремих компонентах фенугрека або пажитника (*Trigonella foenum graecum L.*) міститься велика кількість стероїдних сапонінів (діосгеніну, протодіосцину та їх ізомерних форм: ямогеніну, гітогеніну, тігогеніну), які широко використовується для профілактики і лікування судинно-серцевих захворювань [14, 15].

У сучасній літературі є також дані щодо протипухлинних властивостей активних компонентів фенугрека по відношенню до різних типів злоякісних пухлин. Такі дослідження в основному були сконцентровані на вивченні *in vitro* різних пухлинних моделей: клітинній лінії раку молочної залози MCF-7 [14, 18, 20, 22] та MDA-MB-231, T47D, SKBR3 [20], карциномі легень A-549 [17], аденокарциномі товстої кишки HT-29 [16, 17] та 502713 [17], мієлобластомі KG-1 [3], раку шлунка KATO-III [11], лімфобластній лейкемії CCRF-HSB-2 [19], лейкемії HL-60 [11], раку передміхурової залози DU-145, LNCaP, PC-3 [20], раку підшлункової залози MiaPaCa, HS766T, Panc1, L3.6PL та VXPC3 [20], нейробластомі IMR-32 [17].

Деякі роботи були проведені *in vivo* на експериментальних тваринах з перещепленими пухлинами та при хімічному канцерогенезі. Так, Sur P., Prabhu A., Ardelan A. та їх співавт. вивчали вплив фенугрека на розвиток асцитної карциноми Ерліха у мишей [6, 13, 23] і показали, що екстракт фенугрека продовжує тривалість життя тварин і проявляє антиканцерогенні властивості. J.Raju і співавт. виявили, що споживання діосгеніну (сапоніну, виділеному із

фенугрека) призводить до пригнічення загальної кількості абберантних крипт товстої кишки при азоксиметаніндукованому канцерогенезі у щурів [16], а А.Амін та співавт. показали, що фенугрек проявляє протипухлинні властивості у щурів з пухлинами молочної залози, індукованими диметилбензантраценом [4].

Разом з тим робіт *in vivo* проведено небагато і більшість питань щодо механізмів протипухлинних ефектів фенугрека і його біологічно активних компонентів недостатньо вивчені і потребують подальшого дослідження.

Метою дослідження було вивчити вплив фенугрека на ріст карциноми молочної залози Ca755 у мишей та дослідити деякі механізми його протипухлинної дії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженнях був використаний порошок екстракт фенугрека, люб'язно наданий Ш.Макаєм (Університет Західної Угорщини, Інститут рослинництва, відділення медичних і ароматичних рослин). Експерименти проведені на мишах-самцях лінії C57Bl/6 віком 2-2,5 місяця, масою 19-20 г розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України. В якості пухлинної моделі використана карцинома молочної залози Ca755, надана банком пухлинних штамів і клітинних ліній ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України. Усі досліди проводили керуючись Міжнародними правилами проведення робіт з експериментальними тваринами.

Пухлини перещеплювали підшкірно на праву дорзолатеральну поверхню тіла тварин. Для трансплантації використовували 25% суспензію

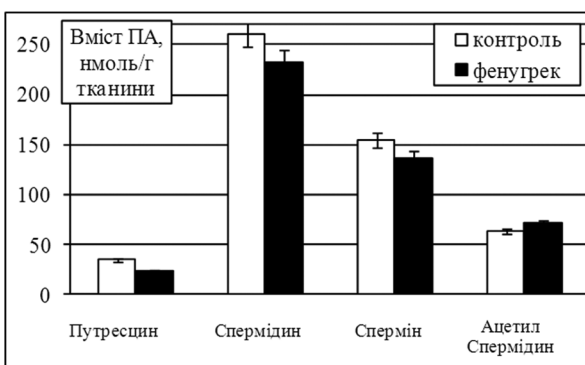


Рис. 1. Вплив споживання екстракту фенугрека на вміст ПА в тканині карциноми Ca755 у мишей.

подрібненої пухлинної тканини в ізотонічному розчині натрію хлориду (0,2 мл на тварину).

Порошковий екстракт фенугрека дослідні тварини отримували щоденно разом із стандартним комбікормом (по 250 мг/кг маси) з моменту перещеплення пухлин до кінця експерименту (протягом 17 днів). Контрольні тварини з перещепленою карциномою Ca755 споживали стандартний комбікорм (без додавання екстракту фенугрека). Тварин забивали під глибоким ефірним наркозом, пухлини видаляли, зважували і використовували для подальших біохімічних досліджень.

Оцінку протипухлинного ефекту проводили за відсотком гальмування росту пухлин. Для визначення антиоксидантних властивостей фенугрека в печінці тварин визначали рівень малонового діальдегіду (МДА) за методом [2]. У пухлинній тканині досліджували вміст поліамінів за допомогою методу рідинної хроматографії високого тиску на хроматографі Agilent 1200 (США) [10]. Для цього поліаміни після їх екстракції із зразків пухлин піддавали дансилюванню за допомогою дансилхлориду (Serva, США). В якості стандартів служили гідрохлориди поліамінів фірми Calbiochem (США). Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [7].

У клітинних та ядерних екстрактах пухлин досліджували рівень експресії білків, продуктів деяких генів, залучених у процеси росту та проліферації (с-мус, сох-2, р53). Клітинні та ядерні екстракти готували за методом [21]. Рівні експресії білкових продуктів генів визначали методами Western-blotting та поверхневого плазмонного резонансу (ППР) [8, 25]. У дослідженнях використано спектрометр ППР «Plasmon SPR-05» і супутнє обладнання (сенсорні чіпи, проточні кювети), розроблені в Ін-

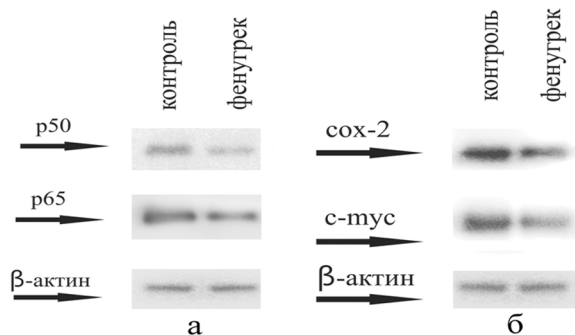
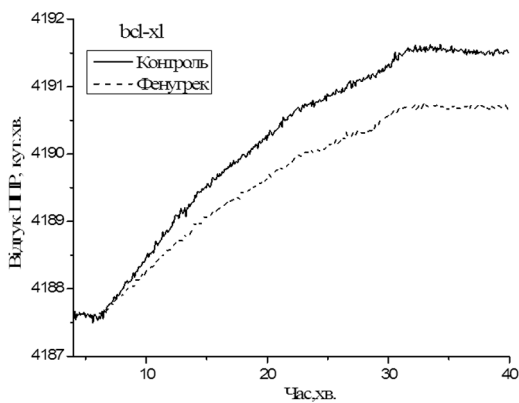
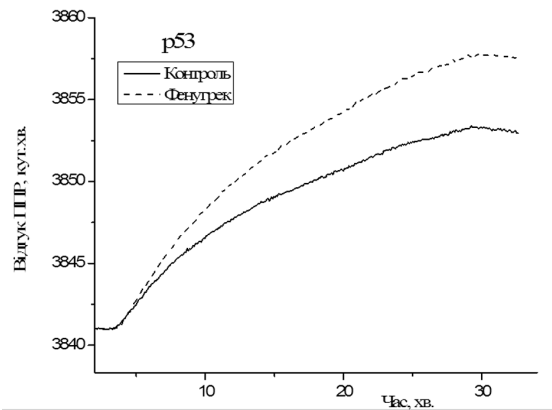


Рис. 2. Вплив споживання тваринами екстракту фенугрека на рівень експресії субодиниць NF-κВ (білків p50 та p65) в ядрах клітин (а) та рівень експресії білків с-мус і сох-2 в клітинах (б) карциноми молочної залози Ca755 (дані отримані методом Western-blotting).



A



B

Рис. 3. Вплив споживання тваринами екстракту фенугрека на рівень експресії білків bcl-xl та p53 в клітинах карциноми молочної залози Ca755 (дані отримані методом ППР: А, Б – типові сенсори).

титуту фізики напівпровідників НАН України. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Виявлено, що маса пухлин у тварин, в корм яких був включений екстракт фенугрека, була значно меншою ($1,37 \pm 0,4$ г), порівняно з тваринами контрольної групи ($3,15 \pm 0,66$ г). Відсоток гальмування росту пухлин становив 56,5%. Отримані дані свідчать, що застосований порошковий екстракт фенугрека проявляє протипухлинну дію щодо експериментальної карциноми Ca755 у мишей.

Наступним нашим завданням було дослідження рівня малонового діальдегіду (МДА) у печінці піддослідних тварин. Було показано, що ріст карциноми Ca755 у мишей супроводжується підвищенням рівня МДА в тканині печінки ($3,72 \pm 0,03$ мкМоль/г тканини) порівняно з інтактними тваринами ($1,52 \pm 0,04$ мкМоль/г тканини). У той же час споживання тваринами екстракту фенугрека призводить до значного зменшення його рівня ($2,33 \pm 0,02$ мкМоль/г тканини).

Рівень МДА в гомогенаті тканини печінки у тварин, що споживали фенугрек, був на 37% нижчий, порівняно з контрольними тваринами. Отримані дані свідчать, що досліджений порошковий екстракт фенугрека проявляє антиоксидантні властивості.

Нами проведено дослідження рівня поліамінів (ПА) в пухлинах мишей контрольної і дослідної груп. Відомо, що ПА (спермін, спермідин, путресцин) є необхідними компонентами живих клітин і є маркерами росту і проліфера-

ції клітин. Зниження ж вмісту ПА в клітинах може свідчити про пригнічення їх росту [1, 9]. Визначення ПА показало, що споживання тваринами екстракту фенугрека призводить до зниження вмісту путресцину, спермідину та сперміну в тканині карциноми Ca755 на 34%, 11% і 12% відповідно порівняно з показниками пухлин у контрольних тварин (рис. 1).

Паралельно зі зниженням рівнів основних фракцій ПА (спермін, спермідину і путресцину) виявлено зростання (на 12%) ацетильованої форми спермідину, що є позитивною ознакою, оскільки ацетильований спермідин не здатний виконувати рістстимулюючі функції спермідину. Отже, отримані дані свідчать, що екстракт фенугрека, очевидно, не тільки пригнічує синтез поліамінів в пухлинних клітинах, а й впливає на активність ацетилтрансфераз поліамінів, що, в свою чергу, може призводити до зменшення концентрації спермідину і сперміну.

Одним із завдань нашого дослідження було вивчення впливу споживання екстракту фенугрека на експресію в пухлинних клітинах фактора транскрипції NF-κB. Відомо, що фактор NF-κB відіграє важливу роль у розвитку пухлин, оскільки регулює експресію багатьох залучених у пухлинний ріст генів. Інгібування активації NF-κB, як показано нами та іншими дослідниками, призводить до гальмування росту пухлин [12, 25].

В ядрах клітин карциноми молочної залози Ca755 за допомогою методу Вестерн блоттингу ми визначили рівні експресії білків фактора NF-κB, а в клітинних екстрактах пухлин – білків c-myc, sox-2 і p53. Результати наших досліджень показали, що в ядерних екстрактах пухлин тварин, у кормовий раціон яких був включений фенугрек, рівні експресії субодиноць NF-

кВ (білків p50 та p65) нижчі порівняно з тваринами, які споживали стандартний комбікорм (рис. 2а). У клітинних екстрактах пухлин тварин, що споживали фенугрек, виявлено зменшення рівнів експресії білків, продуктів NF-кВ-залежних генів (*c-myc* і *cox-2*) (рис. 2б).

Дослідження експресії білка *bcl-xl* та білка p53 проводили за допомогою методу ППР. Виявлено, що рівень білка *bcl-xl* в клітинах карциноми Ca755 мишей, які споживали екстракт фенугрека, знижується, а рівень білка p53 підвищується (рис. 3).

ВИСНОВОК

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що екстракт фенугрека пригнічує ріст карциноми Ca755 у мишей, проявляє антиоксидантні властивості і знижує рівень МДА в тканині печінки досліджуваних тварин. Виявлено, що споживання тваринами екстракту фенугрека супроводжується пригніченням транслокації субодиниць фактора транскрипції NF-кВ в ядра пухлинних клітин, що може призводити до зниження його транскрипційної активності. Виявлене нами зменшення вмісту ПА в тканині карциноми Ca755, а також дані щодо зниження експресії білків фактора транскрипції NF-кВ та білків, продуктів залежних від нього генів (*bcl-xl*, *cox-2* і *c-myc*) свідчить, що в механізми протипухлинної дії фенугрека залучені ПА- і NF-кВ-залежні сигнальні шляхи.

ЛІТЕРАТУРА

- Бердинских Н.К., Залеток С.П. Полиамины и опухолевый рост. — Киев: Наукова думка, 1987. — 141 с.
- Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. Ореховича В.Н. — М.: Медицина, 1977. — С. 66-68.
- Alizadeh S., Jahanmehr S.A., Ardjmand A.R. et al. Antineoplastic Effect of Fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum*) Seed Extract against Acute Myeloblastic Leukemia Cell Line (KG-1) // Iranian J. of Blood and Cancer. — 2009. — Vol. 1. — №4. — P. 139-146.
- Amin A., Alkaabi A., Al-Falasi S. et al. Chemopreventive activities of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) against breast cancer // Cell Biol. Int. — 2005. — Vol. 29. — №8. — P. 687-694.
- Amin A., Mousa M. Merits of anti-cancer plants from the Arabian Gulf region // Cancer Therapy. — 2007. — Vol. 5. — P. 55-66.
- Ardelean A., Pribac G., Hermenean A. et al. Cytostatic and Cytotoxic Effects of *Trigonella Foenum Graecum* (Fenugreek) Seed Extract // Publisher: Vasile Goldis University Press LA. — 2010. — Vol. 20. — №1. — P. 25-29.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248-254.
- Catimel B., Domagala T., Nerrie M. Recent applications of instrumental biosensors for protein and peptide structure-function studies // Protein Peptide Lett. — 1999. — Vol. 6. — P. 319-340.
- Fu S., Xiao C., Zhao W. et al. Polyamines analysis by HPLC and their application as tumor markers // Front Biosci. — 2012. — Vol. 1. — №4. — P. 1795-1801.
- Gerbaut L. Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography // Clin. Chem. — 1991. — Vol. 37. — №12. — P. 2117-2120.
- 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. — Vol. 11. — №1. — P. 23-26.
- Noguera L., Ruiz-Ontanoni P., Vazquez-Barquero A. et al. The NFκB pathway: a therapeutic target in glioblastoma // Oncotarget. — 2011. — Vol. 2. — №8. — P. 646-653.
- Prabhu A., Krishnamoorthy M. Anticancer activity of *Trigonella foenum-graecum* on Ehrlich Ascites carcinoma in *Mus musculus* system // J. Pharm. Res. — 2010. — Vol. 3. — №6. — P. 1181-1183.
- Pribac G.C., Ardelean A. Diosgenin, the active principle of *Trigonella* Sp. extracts may induce apoptosis on MCF7 cancer cells through caspase activation // Studies of Science and Culture. — 2008. — №3. — P. 7-11.
- Raju J., Mehta R. Cancer Chemopreventive and Therapeutic Effects of Diosgenin, a Food Saponin // Nutr. Cancer. — 2009. — Vol. 61. — №1. — P. 27-35.
- Raju J., Patlolla J.M., Swamy M.V. et al. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2004. — Vol. 13. — №8. — P. 1392-1398.
- Satish K.V., Santosh K.S., Mathur A. *In vitro* cytotoxicity of *Calotropis procera* and *Trigonella foenum graecum* against human cancer cell lines // J. Chem. Pharm. Res. — 2010. — Vol. 2. — №4. — P. 861-865.
- Sebastian K.S., Thampan R.V. Differential effects of soybean and fenugreek extracts on the growth of MCF-7 cells // Chem. Biol. Interact. — 2007. — P. 135-143.
- Shaban A., Jahanmehr S.A., Rezaeeian 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. — Vol. 2. — №4. — P. 438-443.
- Shabbeer S., Sobolewski M., Anchoori R.K. et al. Fenugreek: a naturally occurring edible spice as an anti-cancer agent // Cancer Biol. Ther. — 2009. — Vol. 8. — №3. — P. 272-278.

21. Sovac M., Bellas R., Kim D. et al. Abberant nuclear factor – κB/Rel expression and gathogenesis of breast cancer // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol. 100. – P. 2952-2960.
22. Sreeja S., Anju V.S., Sreeja S. In vitro estrogenic activities of fenugreek *Trigonella foenum graecum* seeds // Indian J. Med. Res. – 2010. – Vol. 131. – P. 814-819.
23. Sur P., Das M., Gomes A. et al. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent // Phytother. Res. – 2001. – Vol. 15. – №3. – P. 257-259.
24. Yadav V.R., Prasad S., Sung B. et al. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer // Toxins. – 2007. – Vol. 2. – P. 2428-2466.
25. Zaletok S., Alexandrova N., Berdinskykh N. et al. Role of polyamines in the function of nuclear transcription factor NF-κB in breast cancer cells // Exp. Oncol. – 2004. – Vol. 26. – №3. – P. 221-225.

В.В.Жиленко, С.П.Залеток. Изучение влияния экстракта фенугрека на рост карциномы молочной железы Ca755 у мышей. Киев, Украина.

Ключевые слова: опухолевый рост, экстракт фенугрека (*Trigonella Foenum Graecum L.*), полиамины, фактор транскрипции NF-κB.

В статье представлены результаты изучения противоопухолевых свойств экстракта фенугрека (*Trigonella Foenum Graecum L.*) у животных с карциномой молочной железы Ca755. Выявлено, что экстракт фенугрека ингибирует рост опу-

холей, обладает антиоксидантными свойствами. Показано, что потребление животными экстракта фенугрека сопровождается угнетением транслокации субъединиц фактора транскрипции NF-κB в ядра опухолевых клеток, уменьшением содержания полиаминов в ткани карциномы Ca755 и снижением экспрессии белков, продуктов NF-κB-зависимых генов (*bcl-xl, cox-2* и *c-myc*). Это свидетельствует, что в механизмы противоопухолевого действия фенугрека вовлечены ПА- и NF-κB-зависимые сигнальные пути.

V.V.Zhylenko, S.P.Zaletok. Effect of fenugreek extract on Ca755 mammary carcinoma growth. Kyiv, Ukraine.

Key words: tumor growth, fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum L.*) extract, polyamines, NF-κB transcription factor.

This paper deals with antitumor properties of a fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum L.*) extract as to the Ca755 mouse mammary carcinoma. Fenugreek extract was shown to inhibit growth of certain tumors and reveal antioxidant properties. Consumption of fenugreek extract is accompanied with suppressed translocation of the NF-κB factor subunits into the nuclei of tumor cells, decreased PA content in tumor tissue and diminished expression of protein products of NF-κB-dependent genes (*bcl-xl, cox-2* and *c-myc*). This indicates that PA- and NF-κB-dependent signal pathways are involved in mechanisms of antitumor effect of a fenugreek extract.

Надійшла до редакції 10.01.2012 р.