

*Е.А. Губарева, А.В. Панченко, Е.И. Федорос, М.А. Майдин*

### **Влияние полифенольной композиции ВР-СЗ на динамику повреждений эпителия тонкой кишки мышей, вызванных 5-фторурацилом**

ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава РФ,  
Санкт-Петербург

Применение ряда химиотерапевтических препаратов негативно влияет на активно пролиферирующие нормальные ткани, в частности, эпителий тонкой кишки, что значительно ухудшает качество жизни онкологических пациентов. Препараты на основе природных полифенольных соединений, обладающие антиоксидантным и противовоспалительным действием, являются перспективным сопроводительным средством при химиотерапии. В данной работе нами показано, что однократное внутривенное введение полифенольной композиции ВР-СЗ за 2 часа до введения 5-фторурацила уменьшает выраженность повреждения эпителия тощей кишки мышей C57Bl/6 через 3,5, 24 или 72 часа. Действие препарата выражалось в снижении уровня апоптоза, увеличении митотической активности эпителия в фазе регенерации и в защите LGR5-позитивных стволовых клеток крипт тощей кишки.

**Ключевые слова:** химиотерапия, 5-фторурацил, токсичность, кишечный эпителий, стволовые клетки, полифенолы, мыши

#### **Введение**

Повреждение нормальных пролиферативно-активных тканей, таких как эпителий желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), костный мозг, кожа, часто сопровождает противоопухолевую химиотерапию (ХТ), в состав которой входит 5-фторурацил (5-ФУ) и другие цитостатики [15]. Эпителий тонкой кишки полностью обновляется за 3-5 суток [1]. Применение противоопухолевых препаратов значительно нарушает трофическую и барьерную функции кишечного эпителия, что вызывает ухудшение качества жизни пациентов за счет развития мукозита и других гастроинтестинальных нарушений [15].

Установлено, что в кишечном эпителии существует несколько популяций стволовых клеток (СК), причем некоторые СК в норме находятся в состоянии покоя и являются резервными, тог-

да как другие делятся постоянно, и их потомки формируют основной клеточный пул в системе «крипта-ворсинка». Проллиферативно-активные СК находятся на дне крипт среди клеток Панета и экспрессируют мембранный маркер LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) [1]. Показано, что восстановление кишечного эпителия после повреждающего воздействия ХТ или радиотерапии (РТ) зависит от сохранности именно этой популяции клеток [6, 12].

Поиск средств снижения токсичности химиотерапевтического воздействия является важным прикладным аспектом сопроводительного лечения онкологических пациентов, поскольку побочные эффекты лечения приводят к увеличению интервала между циклами химиотерапии или требуют уменьшения доз, что негативно сказывается на результатах лечения [5]. Средства сопроводительной терапии не должны иметь собственных побочных эффектов и снижать эффективность основной терапии. Перспективными в этом отношении являются природные растительные полифенольные вещества, которые обладают антиоксидантным и противовоспалительным действием, а также способны тормозить рост опухолей и сенсibilизировать опухолевые клетки к ХТ или РТ [7, 10]. В экспериментах установлено, что введение препаратов, содержащих полифенолы, снижает выраженность кишечного мукозита при применении 5-ФУ [4, 13].

Препарат ВР-СЗ является многокомпонентной смесью, получаемой путем гидролиза лигнина, и включает широкий спектр полифенольных молекул (производные флавоноидов, фенантронов и т.д.), соединения железа и селена, аскорбиновую кислоту, ретинол [11].

Ранее было показано, что препарат улучшает выживаемость кишечных крипт при применении как в лечебном, так и в профилактическом режиме применения на моделях РТ [2] и ХТ [8].

В данной работе мы исследовали механизм влияния однократного введения ВР-СЗ на динамику повреждений кишечного эпителия, вы-

званных введением высоких доз 5-ФУ у мышей. На нескольких сроках оценивалось среднее число митозов, апоптотических клеток и LGR5-позитивных стволовых клеток на крипту.

### Материалы и методы

#### Животные

Исследования выполнены на инбредных мышках-самцах C57Bl/6 (питомник лабораторных животных Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область). Животные содержались при режиме освещения 12:12 часов и температуре 21±2°C с доступом к корму и воде ad libitum. Все манипуляции с животными были одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» (Протокол №1, от 13.02.2014).

#### Препараты

BP-C3 предоставлен ООО «Нобель» (Россия), водный раствор 5 мг/мл, серия 110117A1.

5-Фторурацил-Эбеве, концентрат для приготовления инфузий 50 мг/мл, серия EW4102, ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х. Нфг.КГ, Австрия.

Натрия хлорид (NaCl) 0,9% раствор для инфузий, серия 10890816, ООО «Гематек», Россия.

#### Дизайн исследования

В опыте были использованы 60 мышей линии C57Bl/6 (самцы). Дизайн эксперимента приведен в табл. 1. Все животные путем внутрижелудочного зондирования получили питьевую воду или BP-C3 (80 мг/кг) за 2 часа до введения 5-ФУ или плацебо. Мыши из групп 5-ФУ и BP-C3+5-ФУ получили инъекцию цитостатика на 0 сутки опыта (150 мг/кг внутривенно однократно). Мыши в группах контроля получили инъекции плацебо (0,9% раствора NaCl) внутривенно. Через 3,5, 24 или 72 часа животные были подвергнуты эвтаназии путем цервикальной дислокации. Незамедлительно проводили аутопсию, извлекали и фиксировали в 10% забуференном формалине тощую кишку. После фиксации из каждого фрагмента кишечника вырезали по 10 колечек высотой 4-5 мм без лимфоидных фолликулов. После гистологической проводки материала изготавливали парафиновые срезы для рутинной патоморфологической диагностики, окрашенные гематоксилином-эозином (Г-Э) и срезы для оценки LGR5+ стволовых клеток, окрашенные методом иммуногистохимии (ИГХ). Для ИГХ-окраски использовали поликлональные кроличьи антитела к LGR5 (Bioss, США), затем вторичные козы антитела против антител кролика, конъюгированные с полимером, несущим пероксидазу хрена (Dako EnVision System). Визуализацию реакции проводили с помощью 3,3'-диаминобензидина (Dako, Дания).

Таблица 1. Дизайн исследования

Название	Воздействие	Срок эвтаназии	n
Контроль	Инъекция раствора NaCl, питьевая вода	3,5ч	5
		24ч	5
		72ч	5
BP-C3	Инъекция раствора NaCl, BP-C3	3,5ч	5
		24ч	5
		72ч	5
5-ФУ	Инъекция 5-ФУ, питьевая вода	3,5ч	5
		24ч	5
		72ч	5
BP-C3+5-ФУ	Инъекция 5-ФУ, BP-C3	3,5ч	5
		24ч	5
		72ч	5

#### Оценка апоптоза и митотической активности

На гистологических препаратах, окрашенных Г-Э, подсчитывали число апоптотических клеток и митотических фигур. Для каждого животного оценивалось 50 продольно срезанных крипт (как в работе Potten et al. [9]), далее данные по группе усреднялись.

#### Оценка стволовых клеток

Количество СК оценивали на срезах кишечника, окрашенных антителами к маркеру стволовых клеток Lgr5+. Для каждого животного СК подсчитывали в 50 продольно срезанных крипах (как было описано ранее в работе Vukov et al. [2]), далее данные по группе усреднялись.

#### Выживаемость кишечных крипт

У животных, подвергнутых эвтаназии через 72 часа после введения 5-ФУ, оценивали выживаемость крипт по методике Withers, Elkind (1970): подсчитывали количество крипт (не менее 10 клеток с базофильным ядром, лежащих рядом) не менее, чем на 6 поперечных срезах от каждого животного [14], далее данные по группе усреднялись.

#### Статистический анализ

Статистическую оценку полученных результатов проводили в программе GraphPad Prism 6.0 с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорными множественными сравнениями с поправкой по Холм-Шидаку. Данные представлены в виде M±m.

### Результаты

Введение 5-ФУ вызывало морфологические изменения в эпителии тощей кишки на всех исследованных сроках. Через 3,5 часа после начала опыта среднее число апоптотических клеток в крипте у животных группы, получавшей 5-ФУ, возрастало приблизительно в 6 раз по сравнению со значением показателя в контрольной группе (3,27±0,11 и 0,57±0,05, p<0,0001 соответственно). Уровень гибели клеток в группе 5-ФУ увеличился еще больше к 24 часу опыта (5,97±0,29). Однократное введение BP-C3 достоверно снижало число апоптотических клеток на крипту у животных группы BP-C3+5-ФУ по сравнению с 5-ФУ на сроках 3,5 часа (2,43±0,10, p<0,0001) и 24 часа (4,08±0,13, p<0,0001). На сроке 72 часа наблюдалась регенерация эпителия и уровень апоптоза не отличался от контроля в обеих опытных группах, получавших цитостатик (рис.1 А). Следует отметить, что введение только BP-C3 не оказывало влияния на уровень апоптоза в крипах по сравнению с контролем.

Введение цитостатика значительно снижало митотическую активность в крипах кишечного эпителия. Так, у животных контрольной группы на сроке 3,5 часа насчитывалось 2,30±0,07 митотических фигур на крипту, а в опытных группах значение показателя составило 0,54±0,06 и 0,65±0,04 для групп 5-ФУ и 5-ФУ+BP-C3, соответственно (отличие от контроля статистически значимо для обеих групп, p<0,0001, рис. 2). Через 24 часа после введения цитостатика наблюдалось дальнейшее снижение пролифера-

тивной активности; значения показателя составили  $0,39 \pm 0,03$  для группы 5-ФУ и  $0,51 \pm 0,04$  для группы 5-ФУ+BP-C3. Эти различия в числе митозов на крипту на ранних сроках опыта носили характер тенденции. При этом через 72 часа после введения 5-ФУ у животных, профилактически получивших BP-C3, среднее количество митотических фигур в криптах было выше, чем у мышей, получивших только 5-ФУ ( $1,57 \pm 0,07$  и  $0,94 \pm 0,05$ ,  $p < 0,0001$ ), хотя и было снижено по сравнению с контрольными животными ( $2,18 \pm 0,07$  в контроле,  $p < 0,0001$ ). Монотерапия BP-C3 не влияла на значение данного показателя по сравнению с контролем ( $2,33-2,42$  на разных сроках опыта, рис.1 Б).

Гибель стволовых клеток оценивали по числу клеток, экспрессирующих маркер LGR5. LGR5 позитивные клетки выявлялись на дне крипт среди клеток Панета и в единичных случаях — на других клеточных позициях в эпителии крипт (рис. 2). У мышей контрольной группы этот показатель составлял  $2,98-3,12$  СК на крипту, и введение BP-C3 не вызвало его существенного изменения ( $2,96-3,16$ ). У животных, получивших 5-ФУ, встречались апоптотические тельца, позитивно окрашенные антителами к данному маркеру, что свидетельствует о гибели СК под воздействием 5-ФУ. Подсчет выживших клеток, экспрессирующих LGR5, показал статистически значимое снижение их среднего числа в крипте у

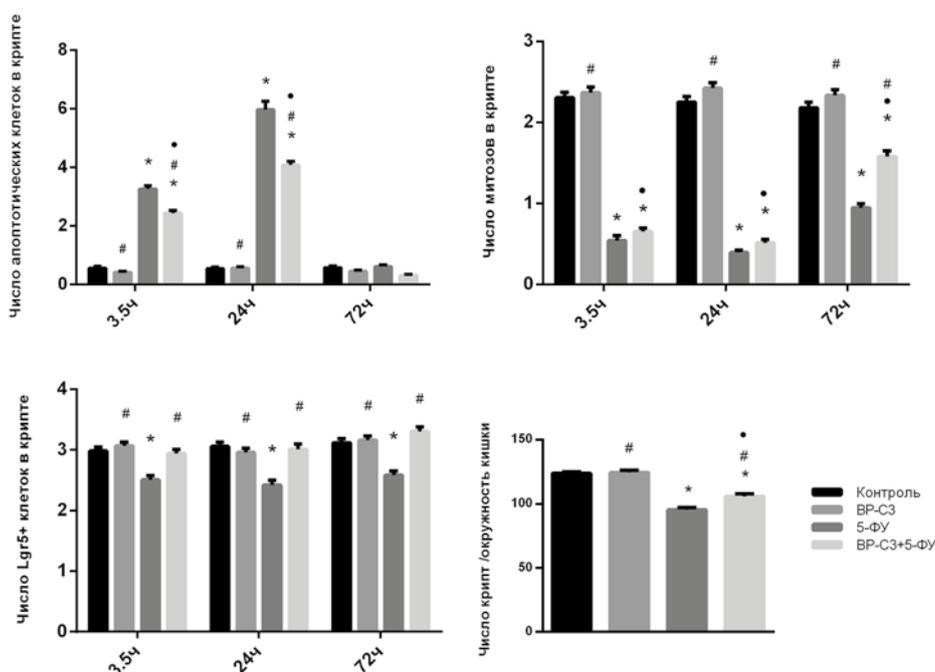


Рис. 1. Влияние BP-C3 на показатели повреждения эпителия тощей кишки, вызванного 5-ФУ. А — среднее число апоптотических клеток в крипте, Б — среднее число митотических фигур в крипте, В — среднее число LGR5-позитивных клеток в крипте, Г — среднее число выживших крипт на окружность кишки через 72 часа после введения 5-ФУ.  
\* — отличия от контроля, # — отличия от 5-ФУ, ● — отличия от BP-C3

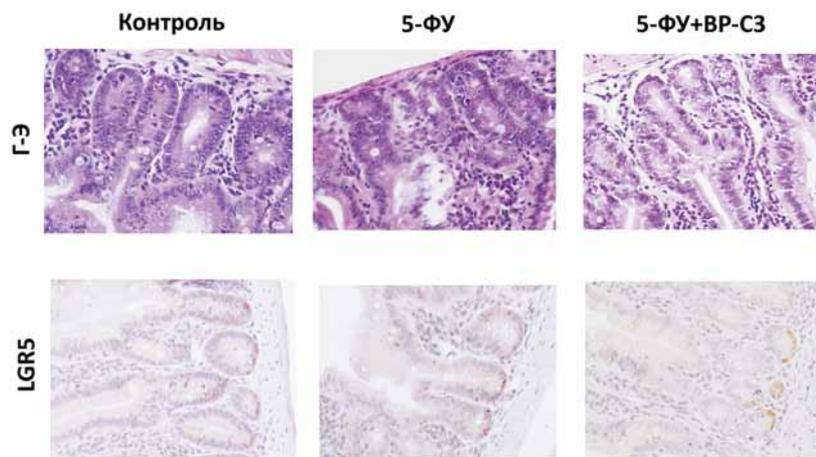


Рис. 2. Влияние BP-C3 на морфологические изменения в криптах тощей кишки и выживание LGR5-позитивных стволовых клеток через 24 часа после введения 5-ФУ (x400)

животных группы 5-ФУ до  $2,50 \pm 0,07$ ,  $2,42 \pm 0,08$  и  $2,58 \pm 0,07$  на сроках 3,5, 24 и 72 часа, соответственно ( $p < 0,01$  по сравнению с контролем для всех сроков). Таким образом, введение цитостатика вызывает гибель части (15–20%) СК кишечного эпителия, и через 3 суток их восстановление еще не наблюдается. У мышей, получивших ВР-С3 перед введением 5-ФУ, не наблюдалось снижения числа стволовых клеток ни в одной из временных точек по сравнению с контролем; при этом значение показателя было на всех сроках статистически значимо выше, чем в группе 5-ФУ ( $2,94 \pm 0,07$ ,  $3,01 \pm 0,09$ ,  $3,30 \pm 0,08$ ,  $p < 0,0001$ , рис. 1В). По-видимому, изучаемый препарат защищает СК тонкой кишки от гибели, вызванной введением цитостатика 5-ФУ в высокой дозе.

На сроке 72 часа была проведена оценка численности жизнеспособных крипт тонкого кишечника. У всех мышей, получивших 5-ФУ, по данным гистологического исследования наблюдались гибель части крипт, укорочение или потеря ворсинок, хроническая воспалительная реакция в слизистой оболочке кишки. Результаты подсчета выживших крипт представлены на рис. 1Г.

Через 3 суток после инъекций цитостатика число крипт на поперечный срез кишки у животных группы 5-ФУ статистически значимо уменьшилось ( $95,18 \pm 1,21$  против  $123,60 \pm 1,99$  в контроле,  $p < 0,0001$ ), а профилактическое введение ВР-С3 способствовало лучшему выживанию крипт ( $105,70 \pm 1,57$ ,  $p < 0,0001$  по сравнению с 5-ФУ). Применение только полифенольного препарата не оказывало влияния на данный показатель по сравнению с контролем ( $124,4 \pm 1,85$ ). Таким образом, препарат оказывает защитное действие в отношении эпителия тонкой кишки при повреждении 5-ФУ.

### Обсуждение

Результаты нашего исследования подтверждают возможность использования полифенольных веществ, в частности, полученных на основе природного лигнина, для предотвращения токсических эффектов химиотерапии в отношении желудочно-кишечного тракта. Введение ВР-С3 за 2 часа до 5-ФУ экспериментальным животным снижало уровень апоптоза в криптах тонкого кишечника через 3,5 и 24 часа после введения 5-ФУ, а также способствовало повышению пролиферативной активности кишечного эпителия в период регенерации (72 часа после введения цитостатика). Также наблюдалось достоверно большее число жизнеспособных крипт в тощей кишке мышей, получивших ВР-С3 в комбинации с 5-ФУ, по сравнению с животными группы, получавшей только цитостатик. Вероятно, влияние

препарата на пролиферацию клеток и регенерацию крипт обусловлено его защитным действием в отношении LGR5 позитивных стволовых клеток. Механизм защиты стволовых клеток от повреждения цитостатиком остается не полностью изученным, но можно предположить, что он обусловлен антиоксидантным и противовоспалительным действием, характерным для полифенольных соединений. К примеру, на модели индуцированного 5-ФУ мукозита тощей кишки у мышей было показано, что применение богатого полифенольными веществами средства традиционной японской медицины снижало экспрессию провоспалительных цитокинов [4]. При исследовании повреждений слизистой тонкого кишечника, вызванного иринотеканом, было показано, что полифенолы зеленого чая снижают уровень окислительного стресса в кишечном эпителии [13].

Противовоспалительный эффект препарата ВР-С3, вероятнее всего, обусловлен взаимодействием его компонентов с глюкокортикоидными, простагландинными, брадикининными и др. рецепторами [3].

Таким образом, препарат ВР-С3 является перспективным средством сопровождения противоопухолевой ХТ, основанной на применении 5-ФУ, для снижения его энтеротоксичности. Влияние препарата на эффективность ХТ должно быть дополнительно изучено на ряде экспериментальных моделей злокачественных опухолей.

### Выводы

Показано, что ВР-С3 на модели индуцированного 5-ФУ мукозита тонкого кишечника у мышей снижает уровень апоптоза в криптах, повышает митотическую активность энтероцитов регенерирующих крипт, предотвращает гибель LGR5-позитивных стволовых клеток кишечного эпителия и способствует сохранению большего числа жизнеспособных крипт. Поскольку снижение числа стволовых клеток крипт кишечника наблюдается как на ранних, так и на поздних сроках после введения цитостатика, оценка данного показателя может быть использована для тестирования препаратов, оказывающих защитное влияние на кишечный эпителий, при различных режимах их введения.

*Работа поддержана грантом «УМНИК» (договор №0020944, Губарева Е.А.)*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Barker N., van Oudenaarden A., Clevers H. Identifying the stem cell of the intestinal crypt: strategies and pitfalls // Cell Stem Cell. — 2012. — Vol. 11 (4). — P. 452–460.

2. Bykov V.N., Drachev I.S., Kraev S.Y. et al. Radioprotective and radiomitigative effects of BP-C2, a novel lignin-derived polyphenolic composition with ammonium molybdate, in two mouse strains exposed to total body irradiation // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2017. — Published online. — P. 1–10.
3. Fedoros E.I., Orlov A.A., Zhrebker A.Y. et al. Novel water-soluble lignin derivative BP-Cx-1: identification of components and screening of potential targets in silico and in vitro // *Oncotarget.* — принято в печать.
4. Kato S., Hayashi S., Kitahara Y. et al. Saireito (TJ-114), a Japanese traditional herbal medicine, reduces 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting cytokine-mediated apoptosis in intestinal crypt cells // *PloS One.* — 2015. — Vol. 10 (1). — P. e0116213.
5. Keefe D., Brealey J., Goland G. et al. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans // *Gut.* — 2000 — Vol. 47 (5) — P. 632–637.
6. Metcalfe C., Kljavin N.M., Ybarra R. et al. Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration // *Cell Stem Cell.* — 2014. — Vol. 14 (2). — P. 149–159.
7. Mileo A.M., Miccadei S. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies. // *Oxid Med. Cell Longev.* — 2016 — Published online. — P. 1–17.
8. Panchenko A.V., Fedoros E.I., Pigarev S.E. et al. Effect of the polyphenol composition BP-C3 on haematological and intestinal indicators of 5-fluorouracil toxicity in mice // *Exp. and Therap. Med.* — принято в печать.
9. Potten C.S., Roberts S.A., Chwalinski S. et al. Scoring mitotic activity in longitudinal sections of crypts of the small intestine // *Cell Tissue Kinet.* — 1988. — Vol. 21. — P. 231–246.
10. Shakibaei M., Buhrmann C., Kraeche P. et al. Curcumin chemosensitizes 5-fluorouracil resistant MMR-deficient human colon cancer cells in high density cultures // *PLoS One.* — 2014. — Vol. 9 (1). — P. e85397.
11. Shipov V., Pigarev E., Fedoros E. EP Patent: 2831151 — Benzene Polycarboxylic Acid Compounds and Their Use as Drug // 2016.
12. Shivdasani R.A. Radiation redux: Reserve intestinal stem cells miss the call to duty // *Cell stem cell.* — 2014. — Vol. 14 (2). — P. 135–136.
13. Wessner B., Strasser E.-M., Koitz N. et al. Green tea polyphenol administration partly ameliorates chemotherapy-induced side effects in the small intestine of mice // *J. Nutr.* — Vol. 137 (3). — P. 634–640.
14. Withers H.R., Elkind M.M. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation // *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* — 1970. — Vol. 17 (3). — P. 261–267.
15. Yu J. Intestinal stem cell injury and protection during cancer therapy // *Transl Cancer Res.* — 2013. — Vol. 2 (5). — P. 384–396.

Поступила в редакцию 15.01.2018 г.

*E.A. Gubareva, A.V. Panchenko, E.I. Fedoros,  
M.A. Maidin*

**BP-C3 polyphenolic composition influence on dynamics of 5-fluorouracil induced damage in small intestine epithelium in mice**

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology St. Petersburg

Chemotherapeutic drugs negatively influence on normal tissues with high proliferative activity such as intestinal epithelium. The damage of chemotherapy to healthy tissues significantly reduces oncological patients' quality of life. Drugs based on polyphenolic natural compounds are a perspective mean of adjuvant therapy due to their antioxidant and anti-inflammatory properties. In this study we have showed that a single intragastric administration of BPC3 polyphenolic composition 2 hours before 5-fluorouracil treatment alleviates small intestine damage in C57Bl/6 mice after 3.5, 24 or 72 hours. BPC3 effect manifested in reduced apoptosis rate, increased mitotic activity of the epithelium in the regenerative phase and protection of LGR5-positive jejunum stem cells against 5-fluorouracil induced damage.

Key words: chemotherapy, 5-fluorouracil, toxicity, intestinal epithelium, stem cells, polyphenols, mice