

Agnieszka Bialek, Andrzej Tokarz

WPŁYW SPRZĘŻONYCH DIENÓW KWASU LINOŁOWEGO NA DYNAMIKĘ PROCESÓW PEROKSYDACJI LIPIDÓW W WARUNKACH PROCESU NOWOTWOROWEGO^{x)}

Katedra i Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. *A. Tokarz* prof. WUM

W pracy zweryfikowano wpływ podaży w diecie samic szczurów sprzężonych dienów kwasu linolowego na ryzyko procesu nowotworowego u ich potomstwa. Zaobserwowano wyraźne działanie prewencyjne CLA obniżające zapadalność na nowotwory sutka u zwierząt potomnych. Zbadano również wpływ sprzężonych dienów kwasu linolowego na proces peroksydacji lipidów w guzach nowotworowych.

Hasła kluczowe: sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA), gruczolakorak, peroksydacja lipidów, TBARS

Key words: conjugated linoleic acid (CLA), adenocarcinoma, lipids peroxidation, TBARS

Nowotwory złośliwe są drugą z najczęstszych przyczyn wszystkich zgonów w naszym kraju, zarówno wśród kobiet jak i wśród mężczyzn. Nowotwory piersi zajmują pierwsze miejsce wśród zachorowań diagnozowanych u kobiet w Polsce (1). Mimo iż etiologia większości przypadków raka piersi jest nieznaną, duże znaczenie wśród czynników wpływających na ryzyko zachorowania na tę chorobę mają zwłaszcza czynniki dietetyczne.

Podkreśla się zwłaszcza znaczenie kwasów tłuszczowych dla profilaktyki zachorowań na nowotwory (2). Wśród nich zaś duże znaczenie przypisuje się sprzężonym dienom kwasu linolowego, które są naturalnym składnikiem mleka wielu gatunków zwierząt (3).

Celem pracy było:

- zbadanie wpływu zwiększonej podaży sprzężonych dienów kwasu linolowego w dietach samic szczurzych na powstawanie nowotworów sutka u ich potomstwa.

^{x)} Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego promotorskiego nr N N405 362137 finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i projektu młodego badacza WUM nr FW12/PM1/11.

- poszukiwanie zależności pomiędzy zastosowaną modyfikacją diety, a poziomami tych kwasów tłuszczowych w gruczolakorakach sutka;

- poszukiwanie zależności pomiędzy zastosowaną modyfikacją diety, a poziomami produktów peroksydacji lipidów w gruczolakorakach sutka.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono po uzyskaniu akceptacji Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach. Samice szczurów szczepu Sprague-Dawley zostały losowo podzielone na dwie grupy eksperymentalne, z których grupa kontrolna (K) była suplementowana olejem roślinnym, a grupa badana (O) - preparatem zawierający CLA - Bio-C.L.A. (Pharma Nord Denmark) w ilości 0,15 cm³/dzień przez 10 dni przed kojarzeniem, podczas ciąży i karmienia, aż do separacji potomstwa w 30 dniu życia. Samice potomne zostały w obrębie grup suplementowanych podzielone losowo na dwie grupy. U jednej z nich zastosowano kontynuację suplementacji w etapie życia dorosłego olejem roślinnym (K1) lub preparatem CLA (O1), podczas gdy druga (K2, O2) spożywała paszę hodowlaną Labofeed H i wodę w ilości *ad libitum*. Wszystkim zwierzętom podano w 50. dniu życia 7,12-dimetylobenz(a) antracen w dawce 80 mg/kg masy ciała w celu indukcji procesu nowotworowego.

Zawartość sprzężonych dniów kwasu linolowego w tkankach nowotworowych oznaczono techniką chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną, po uprzedniej izolacji tłuszczu metodą ekstrakcyjno-wagową wg procedury *Folch'a* (4). Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych oraz warunki analizy opisano uprzednio (5). Ilość TBARS w gruczołakorakach oznaczano metodą spektrofotometryczną (6).

W analizie statystycznej posłużono się testem nieparametrycznym *Kruskala-Wallis*a, a wyniki uzyskane tym testem zostały zweryfikowane testem *Dunna*. Jako krytyczny poziom istotności przyjęto $p = 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

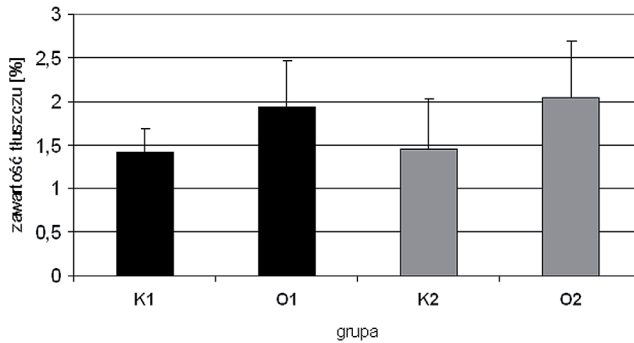
Dzięki zastosowanej suplementacji zwierzęta potomne miały zapewnioną zwiększoną podaż sprzężonych dniów kwasu linolowego z mlekiem matek już na wczesnym etapie życia. Obserwowano wyraźne hamowanie procesu karcinogenezy w obu grupach poddanych działaniu CLA. Bardzo efektywnie wystąpiło ono w grupie O2, tj. w przypadku zwierząt potomnych, których jedynie matki otrzymywały dietę wzbogaconą w sprzężone dieny kwasu linolowego. Inne parametry, takie jak łączna masa i liczba guzów w grupie czy średnia ilość guzów u jednego osobnika, oceniane w grupach O1 i O2, były znacznie niższe niż w grupach K1 i K2 (tabela 1).

Na ryc. 1 przedstawiono wyniki oznaczeń zawartości tłuszczu w gruczołakorakach sutka. Obserwowano nieco wyższą zawartość tłuszczu w grupach suplementowanych CLA, tj. guzy nowotworowe pozyskane z grup O1 i O2 zawierały więcej tłuszczu niż guzy z grup K1 i K2.

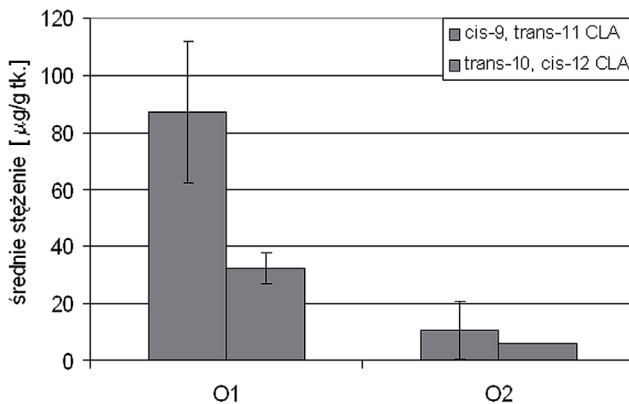
Na rycinach 2 - 3 przedstawiono zawartość sprzężonych dniów kwasu linolowego w nowotworach sutka. Jedynie w guzach pochodzących z grup O1 i O2 było możliwe oznaczenie zawartości izomerów CLA, podczas gdy guzy z grup suplementowanych olejem nie zawierały ich w ilościach co najmniej równych granicy oznaczalności.

Tab e l a 1. Charakterystyka grup eksperymentalnych
 Table 1. Characteristic of experimental groups

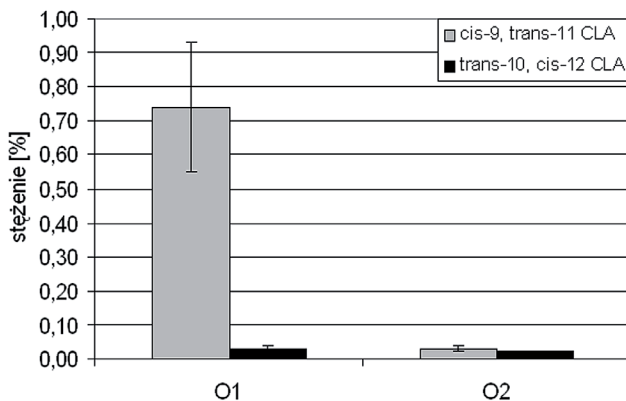
Nazwa grupy	K1	O1	K2	O2
Dieta matki	Lab. H + olej	Lab. H + CLA	Lab. H + olej	Lab. H + CLA
Dieta dziecka	Lab. H + olej	Lab. H + CLA	Lab. H	Lab. H.
Zapadalność	80%	25%	78%	33%
Łączna suma mas guzów w grupie (g)	78,55	12,80	50,95	9,57
Łączna liczba guzów w grupie	14	4	11	5
Śr. ilość guzów u jednego osobnika	1,4	0,5	1,2	0,6



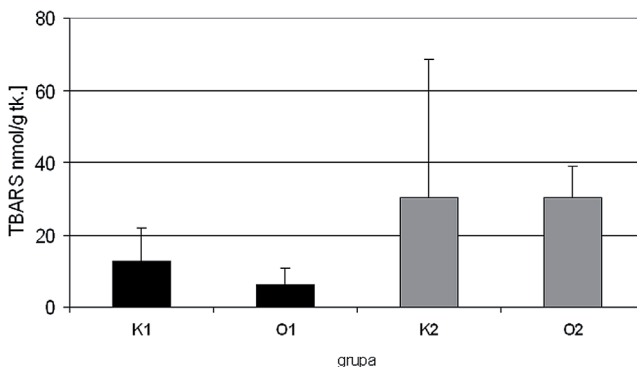
Rycina 1. Średnia zawartość tłuszczu w guzach nowotworowych.
 Figure 1. Mean content of fat in mammary tumors



Rycina 2. Średnia zawartość izomerów CLA w tłuszczu guzów nowotworowych.
 Figure 2. Mean content of CLA isomers in fat of mammary tumors



Rycina 3. Średnia zawartość izomerów CLA w guzach sutka
Figure 3. Mean content of CLA isomers in mammary tumors



Rycina 4. Średnia zawartość TBARS w guzach nowotworowych.
Figure 4. Mean content of TBARS in mammary tumors.

Zawartość sprzężonych dienów kwasu linolowego w guzach grupy O1 była zdecydowanie wyższa niż w przypadku grupy O2, choć również w tej drugiej grupie kwasy te występowały w guzach nowotworowych w mierzalnych ilościach. Zwiększona podaż tych związków w diecie matek podczas ciąży i karmienia skutkowała ich wbudowaniem do tkanek u dzieci. Ponadto zawartość izomeru *cis-9, trans-11* CLA w tkance nowotworowej była w obu grupach znacznie wyższa niż izomeru *trans-10, cis-12* CLA, mimo iż w stosowanym suplemencie diety wzajemny stosunek tych dwóch izomerów CLA wynosił 1:1 (7). *Tsuzuki* sugeruje, że obserwowane różnice nie są wynikiem różnic w biodostępności tych izomerów,

mogą jednak wpływać z różnic w ich metabolizmie. Kwas *trans-10*, *cis-12* oktadekadienowy znacznie silniej aktywuje szlak β -oksydacji, przez co samodzielnie ułatwia swój metabolizm, jest także łatwiej utleniany (8). Sprzężone dieny kwasu linolowego łatwiej ulegają wbudowaniu do triacylogliceroli niż do fosfolipidów, o czym świadczą m.in. znacznie wyższe poziomy tych związków oznaczane w lipidach neutralnych, pozyskanych z gruczołów sutkowych szczurów, niż w fosfolipidach (9), czy w triacyloglicerolach i estrach cholesterolu, niż w fosfolipidach większości tkanek świń doświadczalnych suplementowanych CLA (10). *Ip i wsp.* stwierdzili w fosfolipidach jedynie obecność kwasu żwaczowego (11).

Wyniki licznych badań świadczą o występowaniu wyższych poziomów MDA czy TBARS w surowicy pacjentów chorych na choroby nowotworowe wielu organów, w tym: raka piersi, płuc, żołądka, dwunastnicy (12, 13). *Czczot i wsp.* oznaczyli, w porównaniu do tkanek kontrolnych, wyższe stężenia TBARS we wszystkich badanych typach nowotworów poza złośliwymi nowotworami wątroby. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że agresywność i proliferacja komórek są związane z niskim poziomem peroksydacji lipidów (14). Wyniki zawartość TBARS przeliczono na zawartość w tłuszczu, jako że ich ilość jest wskaźnikiem intensywności procesów peroksydacji lipidów oraz na masę guza. Najniższe poziomy TBARS oznaczono w guzach nowotworowych z grupy O1, suplementowanej CLA. Guzy z grupy K1, suplementowanej olejem, również charakteryzowały się niewielką zawartością tych związków, znacznie niższą niż w grupach K2 i O2, w przypadku których nie stosowano dwuetapowego wzbogacania diety (ryc. 4). Wyniki wielu badań wskazują na właściwości przeciwutleniające sprzężonych dienów kwasu linolowego. *Ha i wsp.* już w 1990 roku donosili o antyoksydacyjnym potencjale CLA, który w ich eksperymencie okazał się tak efektywny jak α -tokoferol i prawie tak silny jak butylohydroksytoluen (15). *Ip i wsp.* potwierdzili zdolność hamowania peroksydacji lipidów przez CLA, na co wskazywało zmniejszenie poziomu MDA w tkankach (16). Mieszanina izomerów CLA podawana zwierzętom, które nie otrzymały DMBA, choć nie wpływała wyraźnie na zawartość TBARS w wątrobie, znacząco jednak zmniejszała ich stężenie w homogenatach otrzymanych z tkanki gruczołów sutkowych, co zdaniem autorów wskazuje na działanie przeciwutleniające tych związków (11). Z kolei *Turpeinen i wsp.* donosili o zwiększonej peroksydacji lipidów po zastosowaniu zarówno mieszaniny jak i pojedynczego izomeru *trans-10*, *cis-12* CLA (17). W badaniach *Chen i wsp.* także obserwowano zwiększenie poziomów TBARS w osoczu myszy cierpiących na nowotwory przewodu pokarmowego, zarówno po podaniu kwasu żwaczowego, jak i po podaniu kwasu *trans-10*, *cis-12* CLA. Zdaniem autorów zwiększoną peroksydację lipidów można powiązać, zarówno w tym modelu, jak i w przypadku nowotworów sutka, z wywieraniem przez CLA efektu cytotoksycznego w kierunku komórek nowotworowych (18). Z kolei *Ip i wsp.*, którzy najsilniejsze działanie przeciwnowotworowe obserwowali przy dawce 1,0% CLA, podczas gdy powstawanie TBARS w tkankach sutków najsilniej hamowała dawka 0,25% CLA, dlatego rozgraniczają oni mechanizm działania przeciwutleniającego od mechanizmu działania toksycznego na komórki rakowe (11).

WNIOSKI

1. Zwiększona podaż sprzężonych dienów kwasu linolowego w diecie samic szczurów może zmniejszać ryzyko raka sutka u ich potomstwa.
2. Zawartość poszczególnych izomerów CLA w tkankach rakowych zależy od ich spożycia z dietą i różnic w metabolizmie i dystrybucji.
3. Prewencyjnemu działaniu sprzężonych dienów kwasu linolowego nie towarzyszy hamowanie procesu peroksydacji lipidów.

A. Białek, A. Tokarz

INFLUENCE OF CONJUGATED LINOLEIC ACID ON LIPIDS PEROXIDATION
IN CANCEROUS PROCESS

Summary

This study investigated the influence of increased CLA supply in diet of rats females at formation of mammary tumors in their offspring and the search of relationship among diet modification and these fatty acids concentration and lipids peroxidation in adenocarcinomas.

In all experimental groups because of DMBA treatment occurred mammary adenocarcinomas. We observed lower morbidity in offspring of mothers supplemented with CLA. Moreover there was strong inhibition of carcinogenesis in animals which mothers exclusively received diet enriched with conjugated linoleic acids. Such parameters as total mass and number of tumors as well as mean number of tumors per individual were comparable in CLA groups and much lower than in oil groups. *Cis-9, trans-11* CLA was the main isomer in analyzed material and its content was the highest in O1 group. Concentration of *trans-10, cis-12* CLA isomer in cancerous tissue was much smaller than concentration of ruminic acid. Products of lipids peroxidation were present in much smaller amounts in tumours of animals with two-step diet supplementation.

The proper supply of conjugated linoleic acids in fetal life and breastfeeding can influence the health of offspring, mainly their resistance to carcinogenesis.

PIŚMIENNICTWO

1. *Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński J.*: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2008 roku. Rejestracja nowotworów złośliwych Narodowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych. Warszawa 2010.-
2. *World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research*: Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer; a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007.-
3. *Tanaka K.*: Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Animal Science Journal* 2005; 76: 291-303.-
4. *Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H.*: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1956; 497-509.-
5. *Białek A., Tokarz A., Kazimierska W., Bielecki W.*: Wpływ suplementacji diety CLA na profil kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów w warunkach procesu nowotworowego. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010; 3: 314-322.-
6. *Tokarz A.*: Skrypt do ćwiczeń z bromatologii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Warszawa 2011.-
7. *Białek A., Tokarz A., Dudek A., Kazimierska W., Bielecki W.*: Influence of diet enriched with conjugated linoleic acids on their distribution in tissues of rats with DMBA induced tumors. *Lipids in Health and Disease*, 2010; 9: 126.-
8. *Tsuzuki T., Ikeda I.*: Slow absorption of conjugated linoleic acid in rat intestines, and similar absorption rate of 9c,11t-conjugated linoleic acid and 10t,12c-conjugated linoleic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(8): 2034-2040.-
9. *Ip C., Jiang C., Thompson H.J., Scimeca J.A.*: Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is

associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18(4): 755-759.- 10. *Kramer J.K., Sehat N., Dugan M.E.R., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Eulitz K., Aalhus J., Schaefer A.L., Ku Y.*: Distribution of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* 1998; 33: 549-558.- 11. *Ip C., Chin S.F., Scimeca J.A., Pariza M.W.*: Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 1999; 51: 6118-6124.- 12. *Gawel S., Wardas M., Niedworok E., Wardas P.*: Dialdehyd malonowy (MDA) jako wskaźnik procesów peroksydacji lipidów w organizmie. *Wiad Lek* 2004; 57(9-10): 453-455.- 13. *Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N.*: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovas* 2005; 15: 316-328.- 14. *Czczot H., Ścibor - Bentkowska D., Skrzycki M., Majewski M., Podsiad M.*: Poziom peroksydacji lipidów w nowotworach przewodu pokarmowego. *Pol Merk Lek* 2010; 29(173): 309-314.- 15. *Ha Y.L., Storkson J., Pariza M.W.*: Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 1990; 50: 1097-1101.- 16. *Ip C., Briggs S.P., Haegele A.D., Thompson H.J., Storkson J., Scimeca J.A.*: The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 1996; 17(5): 1045-1050.- 17. *Turpeinen A.M., von Willebrand E., Salminen I., Linden J., Basu S., Rai D.*: Effects of cis-9, trans-11 CLA in rats at intake levels reported for breast-fed infants. *Lipids* 2006; 41: 669-677.- 18. *Chen B.Q., Xue Y.B., Liu J.R., Yang Y.M., Zheng Y.M., Wang X.L., Liu R.H.*: Inhibition of conjugated linoleic acid on mouse forestomach neoplasia induced by benzo(a)pyrene and chemopreventive mechanisms. *World J Gastroenterology* 2003; 9(1): 44-49.-

Adres: 02 – 097 Warszawa, ul. Banacha 1.