

Agnieszka Stawarska, Andrzej Tokarz, Tomasz Seweryn

WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW DIETETYCZNYCH NA AKTYWNOŚĆ Δ^6 -DESATURAZY W MIKROSOMACH WĄTROBOWYCH SZCZURÓW

Katedra i Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. WUM dr hab. *A. Tokarz*

e-mail: agnieszka.stawarska@wum.edu.pl

Zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z detekcją UV/VIS do oznaczania aktywności Δ^6 -desaturazy w mikrosomach wątrobowych samców szczurów cmd:(WI)WU Wistar. W zastosowanych układach modelowych brano pod uwagę przyrost zawartości kwasu arachidonowego, powstającego z kwasu linolowego, którego proces elongacji i desaturacji stanowił miarę aktywności Δ^6 -desaturazy. Badane zwierzęta otrzymywały dietę wzbogaconą olejem słonecznikowym, preparatem „Omega-3” lub zredukowaną ilościowo o połowę.

Hasła kluczowe: Δ^6 -desaturaza, kwas linolowy, kwas arachidonowy, HPLC
Key words: Δ^6 -desaturase, linoleic acid, arachidonic acid, HPLC

Zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w strukturach komórkowych ssaków jest wypadkową między rodzajem WNKT dostarczonych w diecie, a ich endogenną syntezą i stopniem wykorzystania do budowy organizmu. Przebieg procesu elongacji i desaturacji zależy zatem od bezwzględnych ilości tych kwasów, jak i aktywności enzymów – desaturaz, sterujących między innymi tym szlakiem metabolicznym. Badając profil kwasów tłuszczowych w tkankach zwierząt, dla pełnego opisu ich metabolizmu, oprócz rodzaju diety należy uwzględnić w tym procesie także udział enzymów, tj. ich aktywność. Aktywność ta może podlegać oddziaływaniu różnych czynników dietetycznych (1-3).

Obniżoną aktywność Δ^6 -desaturazy stwierdzano u osób na diecie niskoenergetycznej, nie zapewniającej właściwej podaży białka oraz bogatej w nasycone kwasy tłuszczowe. Ponadto do czynników upośledzających aktywność tego enzymu należy hipercholesterolemia, alkohol, nikotyna, niedobory składników mineralnych i witamin, stres oraz współistnienie cukrzycy (4,5).

Zwiększenie podaży kwasu linolowego w diecie, powoduje również wzrost ilości kwasu arachidonowego, głównego substratu do syntezy prostaglandyn. Jednocześnie przemiany innych kwasów ulegają osłabieniu. Analogicznie, gdy rośnie spożycie kwasu α -linolenowego, to również wzrasta ilość kwasów n-3, przy jednoczesnym obniżeniu kwasów n-6. Przyczyną tego zjawiska jest konkurencja o te same enzymy. W konsekwencji kwas α -linolenowy silnie hamuje proces desaturacji i wydłużania

kwasy linolowego, podczas gdy kwas linolowy wywiera słabe działanie hamujące na konwersję kwasu α -linolenowego (6,7).

Do oznaczania aktywności desaturaz bardzo często wykorzystuje się metodę radiometryczną z użyciem kwasów znakowanych izotopami. Jest to niewątpliwie metoda czuła, wymagająca jednak odpowiedniego oprzyrządowania (8-10).

Celem podjętych badań było potwierdzenie, na materiale biologicznym, możliwości oznaczenia aktywności Δ^6 -desaturazy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Miarą aktywności Δ^6 -desaturazy była ilość tworzącego się kwasu arachidonowego z kwasu linolowego.

MATERIAŁ I METODY

Badania uzyskały akceptację II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (uchwała nr 25 z dn. 27.11.2007r.). W badaniach wykorzystano mikrosomy otrzymane z wątroby samców szczurów cmd:(WI)WU Wistar. Zwierzęta podzielono na cztery grupy, a każda z grup liczyła osiem osobników:

1. grupa kontrolna - bez ograniczeń dostępu do paszy i wody (pasza Labofeed H)
2. grupa „1/2” - dieta o obniżonej o połowę wartości energetycznej; każdy szczur otrzymywał 5g paszy na dobę (ponieważ przeciętne spożycie paszy wynosiło 10g/24 godz.)
3. grupa otrzymująca dodatkowo olej słonecznikowy
4. grupa otrzymująca dodatkowo preparat „Omega-3” (firmy Lysi).

Zarówno olej słonecznikowy, jak i preparat „Omega-3” podawane były sondą dożołądkową w ilości 0,4 cm³ dziennie, począwszy od 70. dnia życia przez kolejne 6 tygodni. Zwierzęta zabijano przez dekapitację, a do badań pobierano wątrobę, z której otrzymane mikrosomy (11), do czasu analizy przechowywano w temp. -70°C.

Do badań pobierano po 0,2 cm³ zawiesiny mikrosomów i poddawano je inkubacji w mieszaninie reakcyjnej (9). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły następujące składniki, których końcowe stężenie w 1 cm³ wynosiło:

5 μ M ATP; 0,1 μ M CoA; 1,25 μ M NADH; 0,5 μ M nikotynamidu; 2,25 μ M glutationu; 5 μ M MgCl₂; 62,5 μ M NaF; 200 nM kwasu linolowego.

Dalsze postępowanie analityczne polegało na wyekstrahowaniu lipidów z materiału biologicznego metodą *Folcha* (12). W zastosowanych układach modelowych określano różnicę stężeń kwasu arachidonowego w próbkach poddanych inkubacji (1,5 h, w temp. 37°C) i nie inkubowanych. Aktywność Δ^6 -desaturazy oznaczano w sposób pośredni, gdyż ilość powstającego *in vitro* kwasu arachidonowego z kwasu linolowego pozostawała w ścisłej korelacji z aktywnością enzymu i stanowiła jej miarę. Zawartość kwasów tłuszczowych oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV/VIS, po uprzedniej ich estryfikacji (aparatury Merck Hitachi, pompa L-7100, detektor UV/VIS L-74200, kolumna YMC-Pack ODS-AM S-5 μ m, temp. kolumny 30°C, długość fali $\lambda=198$ nm) (9). Każdorazowo określano w mikrosomach wątrobowych zawartość białka metodą *Lowriego* (13), a stężenie kwasu arachidonowego wyrażano w przeliczeniu na 100 mg białka.

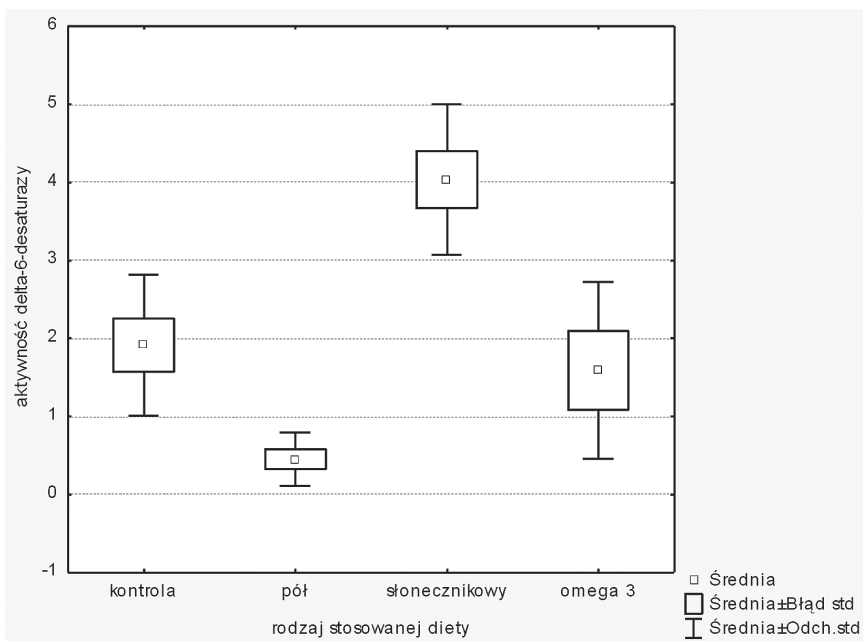
Otrzymane wyniki poddano ocenie statystycznej (analiza wariancji – ANOVA, test Tukey'a).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Tabela 1. Wpływ diety na aktywność Δ^6 -desaturazy.

Table 1. Influence of the diet on the Δ^6 -desaturase activity.

GRUPA	Przyrost stężenia kwasu arachidonowego (mg/100 mg białka) $X_{\text{śr}} \pm \text{SD}$
Kontrolna	1,92 \pm 0,90 ^{a,b}
1/2	0,45 \pm 0,34 ^{a,c,d}
Olej słonecznikowy	4,04 \pm 0,96 ^{b,c,e}
Omega – 3	1,59 \pm 1,10 ^{d,e}



a - różnica istotna statystycznie, test *Tukey'a*, $p=0,004314$

b - różnica istotna statystycznie, test *Tukey'a*, $p=0,000138$

c - różnica istotna statystycznie, test *Tukey'a*, $p=0,000000$

d - różnica istotna statystycznie, test *Tukey'a*, $p=0,034381$

e - różnica istotna statystycznie, test *Tukey'a*, $p=0,000076$

Ryc 1. Porównanie średnich aktywności Δ^6 -desaturazy

Fig. 1. Comparison of average activity of the Δ^6 -desaturase

Wyniki badań, przedstawione w tabeli I pozwalają stwierdzić, iż na aktywność Δ^6 -desaturazy miał wpływ rodzaj pożywienia otrzymywanego przez zwierzęta. Widać wyraźnie, że aktywność ta może być modyfikowana przez tłuszcze, a ściślej przez zawarte w nich nienasycone kwasy tłuszczowe.

Pierwsza grupa szczurów, kontrolna, żywiona była wyłącznie paszą standardową Labofeed H. Przyrost ilości kwasu arachidonowego, stanowiący miarę aktywności Δ^6 -desaturazy wynosił średnio w tej grupie 1,92 mg/100 mg białka.

Druga grupa szczurów również otrzymywała paszę Labofeed H, jednakże w ograniczonej ilości w porównaniu z grupą kontrolną (5g paszy na dobę). Zaobserwowano wyraźny spadek aktywności Δ^6 -desaturazy, wynoszący 72% w stosunku do grupy kontrolnej. Stężenie kwasu arachidonowego w grupie „1/2” wyniosło 0,45 mg/100mg białka. Wyniki te świadczą o tym, że poddawanie szczurów głodówce przyczyniło się znacząco do obniżenia aktywności badanego enzymu, co bezpośrednio przekłada się na zmniejszenie syntezy pochodnych kwasu arachidonowego, tym samym może przyczyniać się do zredukowania ryzyka wystąpienia nowotworu i zmian prozapalnych (14,15).

Trzecia grupa żywiona była również paszą Labofeed H, z tą różnicą, że począwszy od 70. dnia życia szczurów, ich dieta była suplementowana olejem słonecznikowym, w ilości 0,4 cm³/dziennie. Podanie szezuruom oleju słonecznikowego spowodowało wzrost aktywności Δ^6 -desaturazy, w porównaniu z grupą kontrolną.

Olej słonecznikowy charakteryzuje wysoka zawartość – 63% kwasu linolowego (n-6) i niewielka zawartość – 0,19% kwasu α -linolenowego (n-3) (16). Produktami otrzymywanymi w wyniku desaturacji i elongacji kwasu linolowego w organizmie są kolejno kwasy: γ -linolenowy i arachidonowy. W mikrosomach wątrobowych szczurów, otrzymujących olej słonecznikowy stwierdzono znaczący przyrost ilości kwasu arachidonowego - o 2,12 mg/100 mg białka, w porównaniu z grupą kontrolną. Nastąpił zatem wzrost aktywności Δ^6 -desaturazy o 110,4%.

Wskazuje to na fakt, że suplementowanie diety olejami bogatymi w kwasy n-6 stymuluje przemiany wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w kierunku tworzenia kwasu arachidonowego. To z kolei może sprzyjać wzmożonej syntezie eikozanoidów, pochodnych kwasu arachidonowego. Jednym z nich jest prostaglandyna PGE₂, posiadająca właściwości immunosupresyjne, a zatem hamująca tworzenie przeciwciał i komórek odpornościowych. Uważa się, że może stymulować proces karcinogenezy (17). Istotne znaczenie w tym procesie ma więc aktywność Δ^6 -desaturazy.

Preparat „Omega-3” (olej rybny) jest źródłem WNKT, należących do n-3, głównie kwasu eikozapentaenowego (EPA) i kwasu dokozaheksaenowego (DHA). W mikrosomach wątrobowych szczurów suplementowanych preparatem „Omega-3”, stwierdzono zmniejszenie przyrostu kwasu arachidonowego, zarówno w stosunku do grupy otrzymującej dodatkowo olej słonecznikowy (154%), jak i wobec grupy kontrolnej (110%). Można zatem przypuszczać, że zwiększenie w diecie udziału kwasów n-3 prowadzi do aktywowania Δ^6 -desaturazy w kierunku tworzenia produktów przemiany kwasu α -linolenowego, przy jednoczesnym spadku aktywności przemiany kwasów n-6, co potwierdza istnienie zjawiska konkurencyjności pomiędzy kwasami obydwu rodzin, w stosunku do Δ^6 -desaturazy.

Wydaje się, iż obecność w diecie WNKT należących do n-3, może istotnie wspomagać profilaktykę przeciwnowotworową.

WNIOSKI

1. Zastosowane warunki eksperymentalne z wykorzystaniem mikrosomów wątrobowych szczurów dały możliwość pośredniego oznaczenia aktywności Δ^6 -desaturazy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV/VIS.

2. Podawanie w diecie olejów bogatych w wielonienasycone kwasy tłuszczowe wpływało na aktywność Δ^6 -desaturazy w mikrosomach wątrobowych szczurów, przy czym aktywność ta zależała od rodzaju tłuszczu.

A. Stawarska, A. Tokarz, T. Seweryn

THE INFLUENCE OF SELECTED DIETARY FACTORS ON Δ^6 -DESATURASE ACTIVITY IN RAT HEPATIC MICROSOMES

Summary

We used HPLC with UV/VIS detection to determine Δ^6 -desaturase activity in rat hepatic microsomes. In the applied model systems the increase in arachidonic acid was taken into account to measure the activity of Δ^6 -desaturase. The animals received diets supplemented with sunflower oil, the „Omega – 3” preparation or quantitatively reduced by half. The influence of used dietary factors for Δ^6 -desaturase activity was observed

PIŚMIENNICTWO

1. *Behrouzian B., Baist P. H.*: Mechanizm of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 2003; 68: 107-112.
2. *Wadhvani N. S., Manglekar R. R., Dangat K. D., Kulkarni A. V., Joshi S. R.*: Effect of maternal micronutrients (folic acid, witamin B₁₂) and omega 3 fatty acids on liver fatty acid desaturases and transport proteins in Wistar rats. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 2012; 86: 21-27.
3. *Brenner R. R.*: Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Progr. Lipid Res.*, 1982; 20: 41-48.
4. *Brenner R. R.*: Regulatory function of delta-6-desaturase, key enzyme of polyunsaturated fatty acid synthesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977; 83: 85-101.
5. *Thomas L. H., Winter J. H.*: Ischaemic heart disease and consumption of hydrogenated marines oils. *Hum. Nutr. Food Sci. Nutr.*, 1987; 41F: 153.
6. *Connor W. E., DeFrancesco C. A., Connor S. L.*: N-3 fatty acids from fish oil, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1993; 683: 16-34.
7. *Bartnikowska E., Obiedziński M. W.*: Nienasycone kwasy tłuszczowe z rodzaju omega - 3. Cz. I. Struktura, źródła, oznaczanie, przemiany w organizmie. *Roczn. PZH*, 1997; 48(4): 381-398.
8. *Rodriguez A., Sarda P., Nessmann C., Boulot P., Leger C. L., Descomps B.*: Δ^6 - and Δ^5 -desaturase activities in the human fetal liver: kinetic aspects. *J. Lipid Res.*, 1998; 39(9): 1825-1832.
9. *Keelan M., Clandinin M. T., Thomson A. B., R.*: Dietary lipids influence the activity of Δ^5 -desaturase and phospholipid fatty acids in rat enterocyte microsomal membranes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997; 75: 1009-1014.
10. *Ozanne S. E., Martensz N. D., Petry C. J., Loizou C. L., Hales C. N.*: Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. *Diabet*, 1998; 41: 1337-1342.
11. *Bast A., Haenen G. R. M.*: Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 963: 558-561.
12. *Folch J., Lees M., Stanley*

Cr. H. S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals. *J. Biol. Chem.*, 1957; 226: 497-509. -13. *Lowry D. H., Rosenbrough J. J., Farr A. A., Randal R. J.*: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275. -14. *Marciniak-Lukasiak K.*: Rola i znaczenie kwasów tłuszczowych omega - 3. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011; 6 (79): 24-35. -15. *Dommels Y. E. M., Alink G. M., Bladern P. J., Ommen B.*: Dietary n-6 and n-3 fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2002; 12: 233-244. -16. *Jelińska M.*: Kwasy tłuszczowe – czynniki modyfikujące procesy nowotworowe. *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 2005; 1: 1-9. -17. *Bartach H., Nair J., Owen R. W.*: Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 2209-2218.

Adres: 02-097 Warszawa, ul. Banacha 1