

*Renata B. Kostogryś<sup>1)</sup>, Anna Drahun<sup>2)</sup>, Magdalena Franczyk-Żarów<sup>2)</sup>,  
Adam Florkiewicz<sup>3)</sup>, Agnieszka Filipiak-Florkiewicz<sup>4)</sup>, Kinga Topolska<sup>4)</sup>,  
Izabela Czyżyńska-Cichoń<sup>2)</sup>, Marek Sady<sup>5)</sup>, Iwona Wybrańska<sup>1)</sup>*

## OCENA WPŁYWU PODAWANIA JAJ WZBOGACONYCH W SPRZĘŻONE TRIENY KWASU LINOLENOWEGO (CLnA) NA WYTRZYMAŁOŚĆ KOŚCI I ZAWARTOŚĆ W NICH WAPNIA U MYSZY GENETYCZNIE ZMODYFIKOWANYCH APOE/LDLR<sup>-/-</sup>

- 1) Katedra Biochemii Klinicznej, Zakład Diagnostyki Genetycznej i Nutrigenomiki,  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Kierownik: dr hab. I. Wybrańska
- 2) Katedra Żywienia Człowieka, Wydział Technologii Żywności,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. inż. T. Leszczyńska
- 3) Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Technologii Żywności,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. inż. T. Fortuna
- 4) Katedra Technologii Gastronomicznej i Konsumpcji, Wydział Technologii Żywności,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. inż. E. Cieślik
- 5) Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Technologii Żywności,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Kierownik: prof. dr hab. inż. J. Domagała

*Celem pracy było określenie wpływu jaj wzbogaconych w sprzężone trieny kwasu linolenowego (CLnA) na wybrane parametry kości udowej u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Stwierdzono, że 8-tygodniowe podawanie diety z dodatkiem liofilizatu żółtek jaj wzbogaconych w izomery sprzężonego kwasu linolenowego nie wpłynęło na zmianę masy ciała myszy oraz na masę i długość ich kości udowych. Dodatek do diety liofilizatu żółtek jaj wzbogaconych w CLnA, jak również oleju z nasion granatu nie miał również znaczącego wpływu na wytrzymałość mechaniczną kości oraz zawartość w nich wapnia.*

Słowa kluczowe: jaja, myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>, twardość kości  
Key words: eggs, ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice, hardness of bone

Sprzężone trieny kwasu linolenowego (ang. Conjugated Linolenic Acid, CLnA) to geometryczne i pozycyjne izomery kwasu oktadekadienowego (C18:3) posiadające podwójne wiązania sprzężone przy 9, 11, 13 lub 8, 10, 12 atomie łańcucha węglowego. Szczególnie bogate w kwasy CLnA są nadziemne części niektórych roślin, nasiona, jak również produkowane z nich oleje. Sprzężone trieny znajdujące się w olejach stanowią od 30 do nawet 80% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych

(1). Choć w przyrodzie naturalnie wytwarzanych jest kilka izomerów z rodziny CLnA, związkami mającymi największe znaczenie zdrowotne, a także cieszącymi się największym zainteresowaniem są: kwas  $\alpha$ -eleostearynowy (9c, 11t, 13t), kwas katalpowy (9t, 11t, 13c), kwas kalendulowy (8t, 10t, 12c) i kwas jakarandowy (8c, 10t, 12c) oraz kwas punicynowy (9c, 11t, 13c) (2, 3). Badania pokazały, że olej z nasion granatu, którego głównym składnikiem jest kwas punicynowy wykazuje silne właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne i może przeciwdziałać m.in. procesom zaangażowanym w powstawanie osteoporozy. *Spilmonta* i wsp. (4) wykazali, że spożywanie oleju z nasion granatu przez okres 30 dni korzystnie wpływało na mineralną gęstość kości u myszy, jak również hamowało niekorzystne zmiany w mikroarchitekturze beleczek kości. Zdaniem ww. autorów może to być wynikiem transkrypcyjnych zmian w tkance kostnej związanych zarówno z zahamowaniem tworzenia osteoklastów, jak i poprawą osteoblastogenezy.

Obecnie na rynku dostępnych jest wiele produktów wzbogacanych w biologicznie aktywne związki. Wśród nich nie ma jednak produktów wzbogacanych w CLnA, gdyż do tej pory nie poznane zostały dokładnie mechanizmy odpowiedzialne za metabolizm i oddziaływanie tych izomerów na organizm człowieka. Dodatkowo, przeprowadzone dotychczas na modelach zwierzęcych badania odnośnie efektów suplementacji CLnA nie dały jednoznacznych wyników. Mimo to, część naukowców zajmuje stanowisko, iż powinna być wprowadzona suplementacja żywności w CLnA, chociażby ze względu na to, że stanowią one cenne, pośrednie źródło sprzężonych dienów kwasu linolowego (CLA) (5). Liczne badania dowodzą bowiem, że CLnA mogą być skutecznie wchłaniane, a następnie przekształcane do CLA (5, 6). W badaniach prowadzonych nad wchłanianiem i metabolizmem kwasu punicynowego i  $\alpha$ -eleostearynowego w jelicie szczurów *Tsuzuki* i wsp. (5) zaobserwowali, że oba izomery były powoli wchłaniane w postaci niezmienionej, a następnie przekształcane w CLA.

Celem pracy było określenie wpływu jaj wzbogaconych w sprzężone trieny kwasu linolenowego (CLnA) na wybrane parametry kości udowej myszy genetycznie zmodyfikowanych ApoE/LDLr<sup>-/-</sup>.

## MATERIAŁ I METODY

W doświadczeniu, przeprowadzonym za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej nr 1 w Krakowie, wykorzystano 30 samic myszy genetycznie zmodyfikowanej szczepu Apolipoprotein E-deficient and Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice (ApoE/LDLr<sup>-/-</sup>) o początkowej masie ciała 23±2,7g, w wieku 4 miesięcy. Zwierzęta zostały podzielone losowo na trzy grupy i umieszczone w klatkach z trocinami, z nieograniczonym dostępem do wody destylowanej i diety. Źródło tłuszczu stanowiło żółtko jaja kurzego oraz olej lniany. Zwierzęta żywiono dietą AIN-93G przez okres 8 tygodni w różnych kombinacjach:

- dieta „Jaja standardowe” (J) – AIN’93G zawierająca liofilizat jaj standardowych (5%),
- dieta „Jaja wzbogacone” (J+PSO) – AIN’93G zawierająca liofilizat jaj standardowych (5%) z dodatkiem oleju z nasion granatu (PSO) (0,12%),

- dieta „Jaja standardowe z PSO” (JWz) – AIN’93G zawierająca liofilizat jaj (5%) wzbogaconych na drodze żywieniowej w sprzężone trieny kwasu linolenowego CLnA (tab. I).

Tabela I. Skład diet eksperymentalnych [%]

Table I. The composition of the experimental diets [%]

Składnik	Jaja standardowe (J)	Jaja standardowe +PSO (J+PSO)	Jaja wzbogacone (JWz)
skrobia kukurydziana	52,513	52,512	50
kazeina	18,282	18,282	18,340
sacharoza	10	10	10
olej sojowy	4,453	4,351	4,396
Liofilizat żółtek jaj	5	5	5
celuloza	5	5	5
Mieszanka mineralna*	3,5	3,5	3,5
Mieszanka witaminowa*	1	1	1
cholina	0,25	0,25	0,25
tert-butylohydrochinon	0,00014	0,00014	0,00014
Olej z nasion granatu	–	0,12	–

J – dieta AIN’93G zawierająca liofilizat jaj standardowych

J+PSO – dieta AIN’93G zawierająca liofilizat jaj standardowych z dodatkiem oleju z nasion granatu (PSO)

JWz – dieta AIN’93G zawierająca liofilizat jaj wzbogaconych na drodze żywieniowej w sprzężone trieny kwasu linolenowego CLnA

\* Skład mieszanki mineralnej i mieszanki witaminowej wg AIN-93G

Co tydzień kontrolowano przyrosty masy ciała zwierząt. Myszy przebywały w pomieszczeniu o temperaturze 22-25°C i odpowiedniej wilgotności, z zachowaniem 12-godzinnego cyklu światła i ciemności.

Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta zostały nastrzyknięte heparyną, a następnie poddane eutanazji poprzez podanie thiopentalu (40mg/100g m.c.). Zwierzęta zważono i pobrano od nich prawą kość udową.

Pobrane kości udowe wypreparowano (tj. oczyszczono z tkanki mięśniowej), po czym zważono, zmierzono ich długość i zabezpieczono do czasu wykonania dalszych analiz w temperaturze –20°C.

Wytrzymałość mechaniczną kości (wyrażoną jako siłę potrzebną do złamania kości w połowie jej długości) zbadano przy użyciu teksturometru (TA-XTplus Texture Analyser firmy Stable Micro Systems), z przystawką *Warnera-Bratzlera*, testem trzypunktowego zginania. Prędkość przesuwu noża wynosiła 5,0 mm/s.

Oznaczenie zawartości wapnia w kości udowej wykonano metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu FAAS (Varian AA240FS firmy Varian) wg normy PN-EN 15505:2009. Mineralizacja została przeprowadzona metodą mikrofalową ciśnieniową na mokro (MarsXPres firmy CEM) z użyciem kwasu azotowego 65% (Suprapur firmy MERCK nr katalogowy 1.00441) dodanego w ilości 10 ml na 0,5 g naważki próbki. Proces prowadzony był w pojemnikach teflonowych

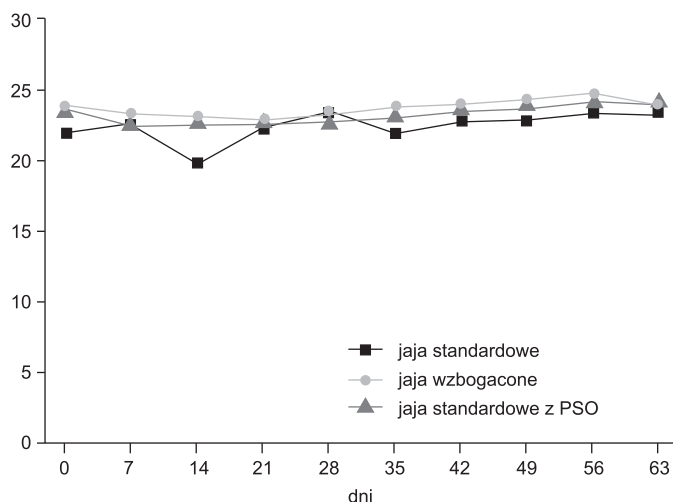
o objętości 55 ml, z ustawieniem temperatury maksymalnej na poziomie 200°C i czasem mineralizacji 40 minut. Przy oznaczaniu dodano roztwór buforowy wg *Schinkela* (cesium chloride and lanthanum chloride o stężeniu 10g/l CsCl i 10g/l La) firmy MERCK nr katalogowy 1.16755 w ilości 8 ml do kolby miarowej 25 ml.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, z wykorzystaniem testu ANOVA (STATISTICA v. 10.0), po wcześniejszym sprawdzeniu założeń testu, przy poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na podstawie uzyskanych wyników, podczas 8-tygodniowego doświadczenia żywieniowego, (ryc. 1) nie wykazano istotnych statystycznie różnic w masie ciała myszy ApoE/LDLr<sup>-/-</sup>. Podobnie, brak wpływu na masę ciała, jak również masę tkanki tłuszczowej zwierząt doświadczalnych zaobserwowali *Arao* i wsp. (7), którzy podawali szczurom z zaburzeniami lipidowymi kwas punicynowy w ilości 1% przez okres 2 tygodni. Znane są jednak prace, w których stwierdzono istotny wpływ CLnA na poziom tkanki tłuszczowej (8, 9). Według ww. autorów sprzężone trieny kwasu linolenowego przyczyniają się do redukcji masy tkanki tłuszczowej, a tym samym wpływają na masę ciała i dodatkowo na masę kostną. Wykazano bowiem, że izomeiry kwasu linolenowego częściowo przekształcane zostają w CLA (5). Dodatkowo, w badaniach prowadzonych przez *Koba* i wsp. (10) nad skutecznością CLA i CLnA w obniżaniu masy ciała, stwierdzono, że po 4 tygodniach lepsze rezultaty osiągnięto w przypadku podawania CLnA.

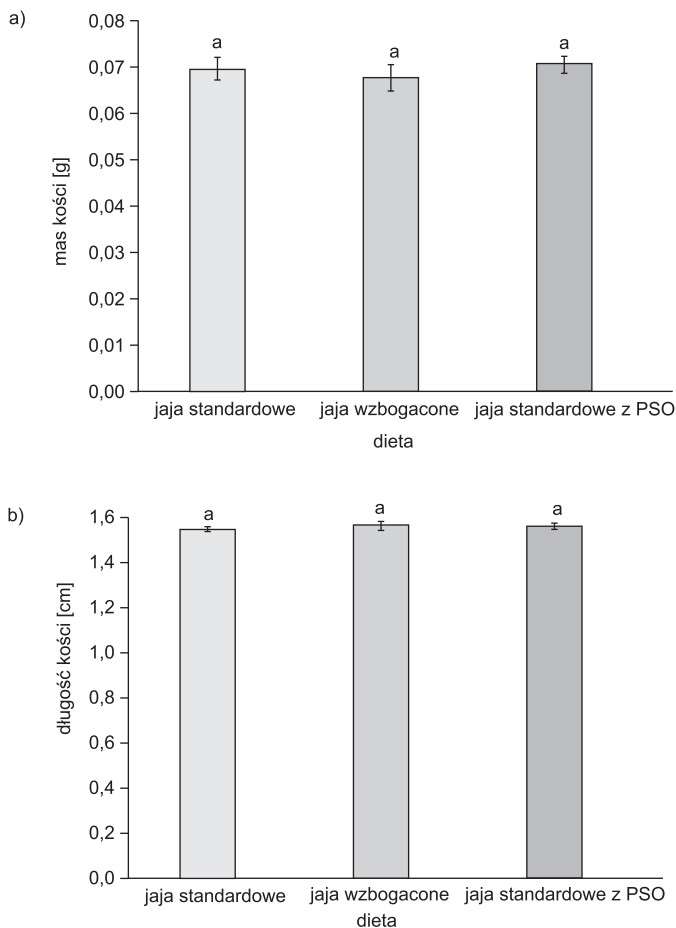
Brak wpływu diet doświadczalnych na zmianę masy ciała zwierząt może być związany ze zbyt niską zawartością CLnA w dietach, bądź niewystarczającym czasem trwania doświadczenia, aby wykazać efekt funkcjonalny.



Ryc. 1. Zmiany przyrostu masy ciała myszy w zależności od diety

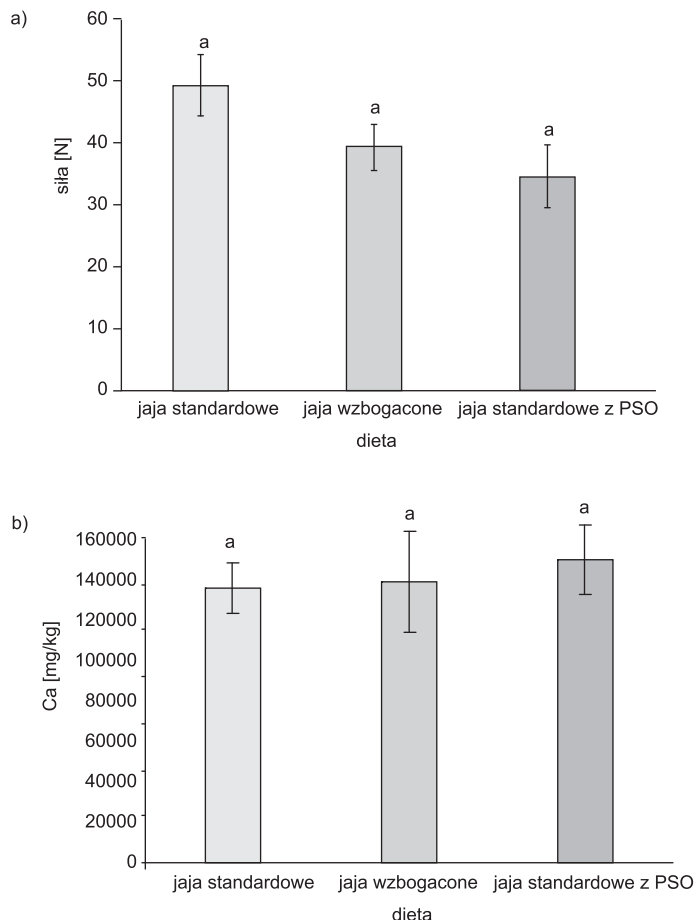
Fig. 1. The changes of mice body weight gain in dependence on diet

Przeprowadzona analiza statystyczna wyników nie wykazała istotnych statystycznie różnic w masie kości udowych zwierząt (ryc. 2). Masa kości udowych myszy żywionych dietą kontrolną z dodatkiem liofilizatu jaj standardowych wyniosła 0,07 g, a w grupie żywionej dietą zawierającą liofilizat żółtka jaj standardowych z dodatkiem oleju z nasion granatu – 0,71 g. Najniższy wynik otrzymano w grupie, której podawano dietę złożoną z liofilizatu żółtek jaj wzbogaconych w CLnA (0,068g). Po 8-tygodniowym okresie podawania zwierzętom żółtek jaj wzbogaconych w CLnA oraz diety z dodatkiem oleju z nasion granatu nie stwierdzono także istotnego wpływu żadnego z tych związków na długość kości udowej. Średnie wartości długości kości otrzymane dla diet eksperymentalnych i kontrolnej wynosiły odpowiednio: 1,564cm (JWZ), 1,56cm (J+PSO), 1,551 cm (JS).



Ryc. 2. Wpływ dodatku żółtek jaj wzbogaconych w CLnA oraz oleju z nasion granatu na masę (A) oraz długość (B) kości udowych

Fig. 2. Effect of the addition of egg yolks enriched in CLnA and oil from pomegranate seeds on weight (A) and length (B) of femora



Ryc. 3. Zmiany wytrzymałości kości udowych (A) oraz zawartości w nich wapnia (B) w zależności od diety

Fig. 3. The changes of femoral hardness (A) and their calcium content (B) in dependence on diet

W literaturze opisane są badania, w których obserwowano wpływ oleju z nasion granatu na procesy związane z tworzeniem kości, czy wzrost długości kości. W badaniach prowadzonych na myszach pozbawionych jajników, 2-tygodniowa suplementacja ekstraktem z granatu w znaczący sposób wpłynęła na zwiększenie objętości kości oraz liczby beleczek kostnych, a co za tym idzie na zmniejszenie odstępów między beleczkami. Oznacza to, że ekstrakt z granatu hamuje tempo przemiany kostnej u myszy (11). W innym badaniu, dotyczącym wpływu suplementacji olejem z nasion granatu (PSO) na zmiany kostne wykazano, że żywienie myszy dietą z 5% PSO znacznie poprawiło mineralną gęstość kości. Obserwowane korzystne zmiany w tkance kostnej mogły być związane z zahamowaniem tworzenia osteoklastów i poprawą osteoblastogenezy (4). W doświadczeniu, którego celem było określenie wpływu wyciągu z granatu na chondrogenezę i osteogenezę mysich embrionów

w kulturach *in vivo* i zawiązków kończyn *in vitro*, badaniem objętych zostało 15 ciężarnych myszy, którym podawano wyciąg z soku granatu, ekstrakt z łusek granatu lub ich mieszaninę. Suplementacja wyciągiem z soku granatu wpłynęła na zwiększenie zawartości wapnia w kościach, natomiast wszystkie suplementowane związki spowodowały wzrost kości udowej zarodków, jak również wzrost wskaźnika osteogenezy. Badania te sugerują, iż podawanie ekstraktu z granatu może wpłynąć na zwiększenie intensywności procesów kościotwórczych (12).

W niniejszych badaniach po 8-tygodniowym okresie podawania zwierzętom z dietą liofilizatu żółtek jaj wzbogaconych w CLnA bądź wprowadzenia do niej dodatku oleju z nasion granatu nie stwierdzono istotnego wpływu na zwiększenie odporności kości na złamanie (ryc. 3). Średnie wartości siły łamiącej otrzymane dla zwierząt spożywających diety eksperymentalne, czyli odpowiednio 39,38 N w grupie żywionej dietą zawierającą liofilizat żółtka jaj wzbogaconych w CLnA oraz 34,54 N w grupie żywionej dietą z dodatkiem jaj standardowych i oleju z nasion granatu, były niższe od wartości średniej siły niezbędnej do złamania kości w grupie kontrolnej (49,27 N).

Przeprowadzone badania nie wykazały również znaczących różnic w zawartości wapnia w badanych kościach. Badania przeprowadzone przez *Mori-Okamoto* i wsp. (11) wykazały, że przyjmowanie ekstraktu z granatu miało wpływ na poprawę mineralnej gęstości kości (BMD) u myszy po owarektomii. Również *Saravani* i wsp. (13) wykazali, że 67-dniowa suplementacja 10 ml oleju z nasion granatu wpłynęła na poprawę BMD kości odcinka lędźwiowego i krzyżowego kręgosłupa u szczurów.

## WNIOSKI

1. Podawanie diety z dodatkiem liofilizatu żółtek jaj wzbogaconych w izomery sprzężonego kwasu linolenowego CLnA, jak również jaj standardowych z dodatkiem oleju z nasion granatu nie wpłynęło na zmianę masy ciała myszy oraz na masę i długość ich kości udowych.
2. Wytrzymałość mechaniczna kości oraz zawartość w nich wapnia także nie była istotnie statystycznie zróżnicowana w obrębie badanych grup.

R.B. Kostogrys, A. Drahun, M. Franczyk-Żarów, A. Florkiewicz,  
A. Filipiak-Florkiewicz, K. Topolska, I. Czyżyńska-Cichoń, M. Sady,  
I. Wybrańska

THE EFFECT OF CONJUGATED LINOLENIC ACID (CLnA) ENRICHED EGGS  
INTAKE ON BONE HARDNESS AND THEIR CALCIUM CONTENT IN GENETICALLY  
MODIFIED MICE APOE/LDLR<sup>-/-</sup>

### Summary

The aim of the study was to assess the effects of conjugated linolenic acid (CLnA) enriched eggs on selected parameters of the femur, i.e. bone weight, length, hardness and calcium content, in mice ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>. The feeding experiment was performed with female mice in the age of 4 months. The mice were divided into 3 groups and fed the diets: AIN-93G diet with 5% of standard eggs – (J), AIN-93 G diet with 5% of CLnA enriched eggs (JWz) and the same diet with 5% of standard eggs containing po-

megranate seed oil (J+PSO), for 8 weeks. The body weight of animals was measured weekly. At the end of the experiment the animals were euthanized. The right femurs were dissected. The measurements of the mass and length of the femurs were analyzed. To determine the hardness of the bone, a texturometer TA-XT2 was used. The calcium determination in the femur was performed using FAAS method, after wet mineralization. The results were subjected to the statistical analysis (ANOVA test, STATISTICA v.10.0). It was shown that the diets with pomegranate seeds oil (J+PSO and JWz) did not lead to statistically significant changes in bone hardness, as compared to the control group. No significant differences in the calcium content, as well as no physical parameters of femurs (length and weight) were observed in the mice fed on the experimental diet.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Melo I.L.P., Carvalho E.B.T., Mancini-Filho J.*: Pomegranate seed oil (*Punica Granatum L.*): A source of punica acid (Conjugated  $\alpha$ -linolenic Acid). *J. Hum. Nutr. Food Sci.*, 2014; 2(1):1024. – 2. *Hennesy A.A., Ross R.P., Devery R.*: The health promoting properties of the conjugated isomers of  $\alpha$ -linolenic acid. *Lipids*, 2011; 46: 105-119. – 3. *Bialek A., Teryks M., Tokarz A.*: Sprzężone trieny kwasu linolenowego (conjugated linolenic acid- CLnA, super CLA) – źródła i działanie biologiczne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 1238-1250. – 4. *Spilmonta M., Léotoing L., Davicco M.J., Lebecque P., Mercier S., Miot- Noirault E., Pilet P., Rios L., Wittrant Y., Coxam V.*: Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status. *J. Nutr. Bioch.*, 2013; 24: 1840-1848. – 5. *Tsuzuki T., Kawakami Y., Nakaqawa K., Koba K., Iwata T., Ikeda I., Miyazawa T.*: Conjugated linolenic acid is slowly absorbed in rat intestine, but quickly converted to conjugated linoleic acid. *J. Nutr.*, 2006; 136(8): 2153-2159. – 6. *Yuan G.F., Sun H., Sinclair A.J., Li D.*: Effects of conjugated linolenic acid and conjugated linoleic acid on lipid metabolism in mice. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 2009; 111: 537-545. – 7. *Arao K., Wang Y.M., Inoue N., Hirata J., Cha J.Y., Nagao K., Yanagita T.*: Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats. *Lipids Health Dis.*, 2004; 3: 1-7. – 8. *Koba K., Imamura J., Akashoshi A., Kohno-Murase J., Nishizono S., Iwabuchi M., Tanaka K., Sugano M.*: Genetically modified rapeseed oil containing cis-9,trans-11,cis-13-octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice. *J. Agricul. Food Chem.*, 2007; 55(9): 3741-3748. – 9. *Al-Muammar M.N., Khan F.*: Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition*, 2012; 28: 595-604. – 10. *Koba K., Akahoshi A., Yamasaki M., Tanaka K., Yamada K., Iwata T., Kamegai T., Tsutsumi K., Sugan M.*: Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids*, 2002; 37: 343-350.
11. *Mori-Okamoto J., Otawara-Hamamoto Y., Yamato H., Yoshimura H.*: Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J. Ethnopharmacol.*, 2004; 92(1): 93-101. – 12. *Monsefi M.I., Parvin F., Talaie-Khozani T.*: Effects of pomegranate extracts on cartilage, bone and mesenchymal cells of mouse fetuses. *Brit. J. Nutr.*, 2012; 107(5): 683-690. – 13. *Saravani M., Kazemi Mehrjerdi H., Mirshahi A., Afkhami Goli A.*: Protective effects of pomegranate seed oil on ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoporosis: A multi-detector computed tomography evaluation. *Vet. Res. Forum.*, 2014; 5: 263 – 267.

Adres: 31-501, ul. Kopernika 15 A