

Katarzyna Skórkowska-Telichowska^{1,3}, Karolina Hasiewicz-Derkacz²,
Tomasz Gębarowski¹, Helena Moreira¹, Katarzyna Gębczak¹,
Anna Kulma², Kazimierz Gąsiorowski¹

PROZDROWOTNE DZIAŁANIA OLEJÓW Z LNU. WNIOSKI Z BADAŃ W HODOWLACH KOMÓRKOWYCH*

¹Katedra i Zakład Podstaw Nauk Medycznych, Uniwersytet Medyczny
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr hab. *K. Gąsiorowski*

²Zakład Biochemii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski

Kierownik: prof. dr hab. *.J. Szopa*

³Klinika Chorób Wewnętrznych 4 Wojskowego Szpitala

Klinicznego we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr hab. *A. Szuba*

Celem pracy było ocena aktywności biologicznej olejów otrzymanych z nasion roślin lnu transgenicznego. Wprowadzone modyfikacje genetyczne zwiększają zawartość polifenoli w olejach uzyskanych z nasion tych roślin. W pracy wykazano, że inkubacja komórek z badanymi olejami nasilała proliferację fibroblastów chomika chińskiego, natomiast hamowała proliferację ludzkich komórek monocytoidalnych i wywierała efekt modulujący generowanie rodników szeregu tlenowego: zwiększała produkcję rodników w komórkach spoczynkowych, a obniżała poziom wolnych rodników w komórkach stymulowanych do ich wytwarzania.

Słowa kluczowe: olej z nasion lnu, len modyfikowany genetycznie, hodowle komórkowe

Key words: flax seeds oils, genetically modified flax, cell cultures

Olej lniany zawiera lipidorozpuszczalne antyoksydanty takie jak γ -tokoferol, plastochromanol-8 i luteina, a także wodorozpuszczalne antyoksydanty w tym związki polifenolowe (1). Nasiona lnu są bogatym źródłem kwasu ω -3 – kwasu α -linolenowego (ALA), i zawierają także inne wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które stanowią razem około 73% frakcji lipidowej oleju (1). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe, szczególnie kwasy ω -3, wykazują efekty antyoksydacyjne (2) przeciwzapalne i anty-apoptotyczne (3). Jednocześnie, kwasy ω -3 są podatne na oksydację i jełczenie (4) dlatego produkty spożywcze bogate w te kwasy powinny zawierać w naturalne antyoksydanty.

* Praca wykonana w ramach realizacji grantu NCBiR Nr PBS1/A9/17/2012

W celu zwiększenia zawartości polifenoli w roślinach i nasionach lnu dokonano modyfikacji genetycznej, wprowadzając do roślin lnu oleistego odmiany *Linola* (*Linum usitatissimum* var. *Linola*) geny enzymów szlaku fenylopropanoidów (5, 6). Z nasion roślin modyfikowanych genetycznie uzyskano olej, który zawierał zwiększoną ilość polifenoli (7).

Celem niniejszej pracy była wstępna ocena potencjalnie prozdrowotnych właściwości olejów z nasion lnu modyfikowanego genetycznie i lnu niemodyfikowanego w wybranych testach oceny aktywności biologicznej *in vitro* na liniach komórek ludzkich (komórki monocytoidalne THP1) i zwierzęcych (fibroblasty płucne chomika chińskiego V79).

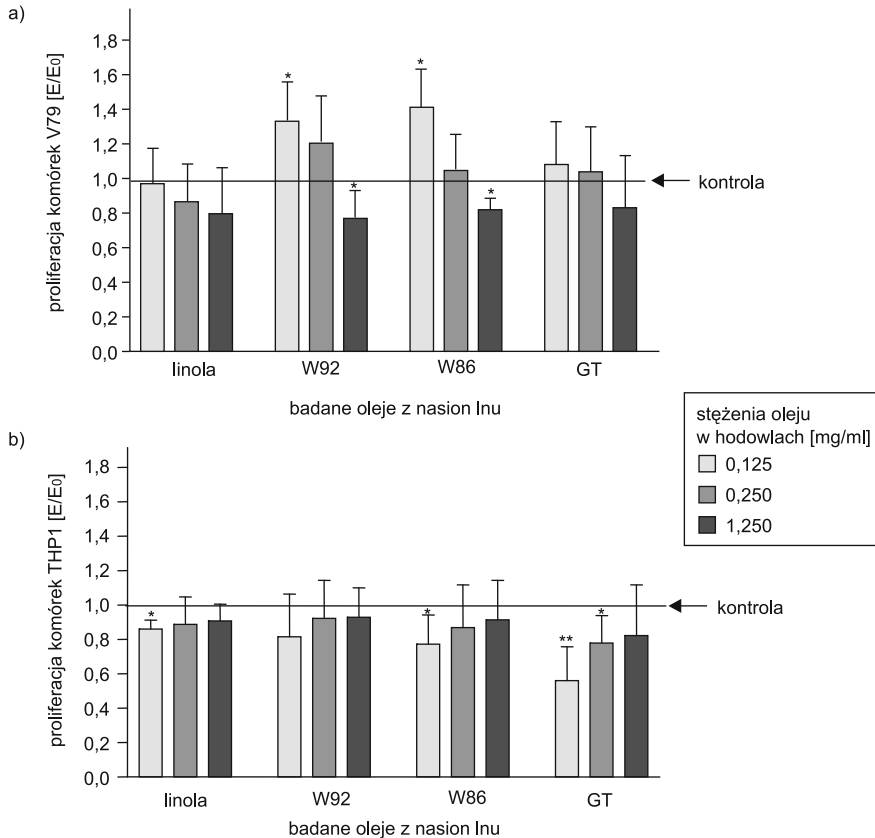
MATERIAŁ I METODY

Procedury modyfikacji genetycznych roślin lnu odmiany *Linola* przedstawione zostały we wcześniejszych pracach (5, 6); pokrótce obejmowały one: wprowadzenie genu syntetazy chalkonu (len W86), jednoczesne wprowadzenie trzech genów enzymów szlaku fenylopropanoidów: syntetazy chalkonu, izomerazy chalkonu oraz reduktazy 4-dihydroflawonolu (len W92) oraz, dodatkowo, wprowadzenie genu 7-O-glukozylotransferazy, w celu ustabilizowania syntezy fenylopropanoidów (len GT). Uzyskany z nasion tych roślin olej lniany był bardziej odporny na oksydację ze względu na wyższy poziom związków polifenolowych, które jak wykazano przechodzą do oleju (7).

Ocenę aktywności biologicznej *in vitro* badanych olejów przeprowadzono na linii komórek V79 (fibroblasty płucne chomika chińskiego) i linii ludzkich komórek monocytoidalnych THP1. Komórki hodowano w pożywce MEM (V79), lub RPMI 1640 (THP1), z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, 2mM L-glutaminy oraz antybiotyków (LONZA). Hodowle prowadzone było w 37°C, w inkubatorze CO₂. Przygotowanie oleju do badań: w 25 ml oleju pochodzącego z transgenicznych nasion lnu i roślin kontrolnych (*Linola*) rozpuszczono lecytynę sojową (10 g) i Tween 80 (5 ml). Następnie dodano 50 ml 25% glicerolu, mieszano, wirowano przez 5 minut i znów mieszano stosując mieszadło magnetyczne na noc. Następnie materiał sonifikowano przez 20 minut i filtrowano przez sterylne filtry 0,45µm i preparat uzupełniono do 1000 ml wodą. Końcowe stężenia olejów w hodowlach komórkowych wynosiły: 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml i 1,25 mg/ml płynu hodowlanego. Preparaty były inkubowane z komórkami przez 48 godzin na płytkach 6-studzienkowych. Komórki monocytoidalne THP1 były stymulowane do generowania rodników szeregu tlenowego poprzez inkubację z PMA (octan mirystenianu forbolu) [250 nM, 37°C, 30 min]. Proliferację komórek oszacowano na podstawie pomiarów całkowitej liczby komórek w hodowlach (Absolute Cell Count), komórki w apoptozie identyfikowano po wybarwieniu hodowli mieszaniną fluorochromów: aneksyna V-FITC/jodek propidyny, zawartość wewnątrzkomórkową rodników szeregu tlenowego oceniano testem utleniania dioctanu dichlorofluoresceiny (DCF-DA), zgodnie z metodą podaną w piśmiennictwie (8). Przedstawione w pracy wyniki były uzyskane w cytofotometrii przepływowej (Partec Cube; Partec, Niemcy).

WYNIKI

Wpływ badanych olejów z nasion lnu na proliferację fibroblastów linii V79 oraz komórek monocytoidalnych THP1 przedstawiono w histogramach na rycinie 1 A i B.



Ryc. 1. Wpływ badanych olejów z nasion lnu na proliferację *in vitro* fibroblastów płucnych chomika chińskiego linii V79 (Rycina 1A) i ludzkich komórek monocytoidalnych linii THP1 (Rycina 1B). Istotność statystyczną wyników oszacowano w porównaniu do wyników uzyskanych w odpowiednich hodowlach kontrolnych komórek inkubowanych bez olejów z nasion lnu; test *t* sparowany (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Fig. 1. Impact of the tested oils from flax seeds on proliferation *in vitro* of chinese hamster fibroblasts of V79 line (Figure 1A) and on human monocytoid cells of THP1 line (Figure 1B). Statistical significance of the results was calculated in comparison to the results obtained in relative control cultures of cells incubated without the tested oils; paired *t* test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

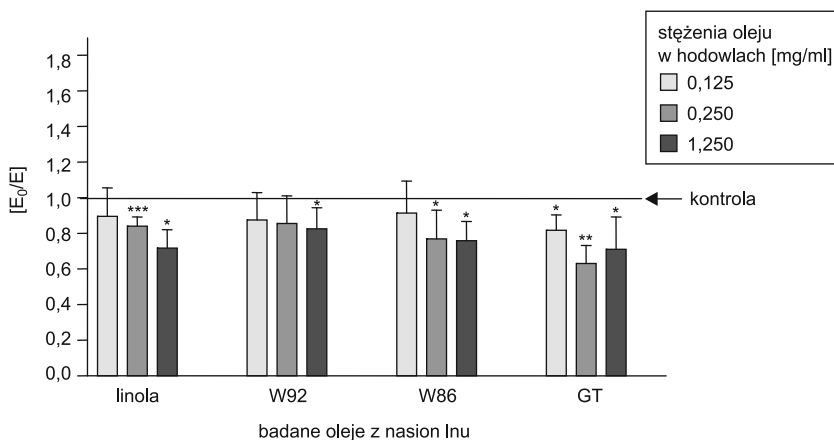
Histogramy na rycinie 1A pokazują, że oleje lnu modyfikowanego genetycznie okazywały statystycznie znamiennej wpływ na proliferację fibroblastów linii V79; efekt zależny był od stężenia olejów w hodowlach: w najmniejszych badanych stężeniach oleju (0,125 mg/ml) obserwowane było nasilenie proliferacji o 34% (W92),

o 42% (W86) i o około 10% (GT), a w stężeniach olejów 10-krotnie większych (1,25 mg/ml) stwierdzono znamienne statystycznie zahamowanie proliferacji w porównaniu do hodowli komórek V79 nie inkubowanych z badanymi olejami. Nie obserwowano stymulacji proliferacji fibroblastów w przypadku oleju Linola z nasion lnu niemodyfikowanego genetycznie, natomiast przy wyższych stężeniach oleju stwierdzono zahamowanie proliferacji o 20% w porównaniu do kontroli.

Wszystkie badane oleje obniżały proliferację komórek monocytoidalnych THP1 (rycina 1B), szczególnie znacząco w najniższych badanych stężeniach (0,125 mg/ml). Największy efekt zahamowania proliferacji w porównaniu do hodowli kontrolnych stwierdzono w hodowlach w obecności oleju GT (o 44%) i oleju W86 (o 23%).

Oleje z nasion lnu nasilały generowanie reaktywnych form tlenu w komórkach linii monocytoidalnej THP1; zawartość produktów oksydacji DCF-DA (która odzwierciedla poziom wewnątrzkomórkowych rodników szeregu tlenowego) była większa o 30%-56% w porównaniu do hodowli kontrolnej komórek nie inkubowanych z badanymi olejami. Natomiast w hodowlach komórek THP1 stymulowanych do produkcji wolnych rodników szeregu tlenowego poprzez inkubację z PMA obecność olejów z nasion lnu prowadziła do znacząco mniejszego wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego wolnych rodników.

Porównanie wpływu olejów na komórki THP1 spoczynkowe/niestymulowane (E_0) i stymulowane przez PMA do produkcji rodników szeregu tlenowego (E) przedstawiono w postaci proporcji E/E_0 w histogramach na rycinie 2.



Ryc. 2. Wpływu olejów z nasion lnu na produkcję rodników szeregu tlenowego przez ludzkie komórki monocytoidalne linii THP1: komórki spoczynkowe/niestymulowane (E_0) i stymulowane przez PMA do produkcji rodników szeregu tlenowego (E). Wyniki przedstawione są w histogramach w postaci proporcji E/E_0 . Istotność statystyczną wyników oszacowano w porównaniu do wyników uzyskanych w odpowiednich hodowlach kontrolnych, komórek inkubowanych bez olejów z nasion lnu; test t sparowany (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Fig. 2. Impact of the tested oils from flax seeds on generation of oxygen free radicals by human monocyteoid cells of THP1 line: resting/not stimulated cells (E_0) and cells stimulated to generation of oxygen free radicals with the PMA (E). Results in histograms show the E/E_0 ratios. Statistical significance of the results was calculated in comparison to the results obtained in relative control cultures of cells incubated without the tested oils; paired t test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Oleje z nasion lnu prowadziły do mniejszego nasilenia procesów generowania rodników szeregu tlenowego i oksydacji DCF-DA w hodowlach komórek THP1 stymulowanych przez PMA aniżeli w komórkach niestymulowanych (spoczynkowych). Stwierdzono obniżenie wewnątrzkomórkowej zawartości rodników szeregu tlenowego (o 20% – 40%) w porównaniu do kontroli (komórki inkubowane z samym PMA i nieinkubowane z badanymi olejami). Wskazuje to, że badane oleje wywierają działanie modulujące funkcje wolnorodnikowe komórek monocytoidalnych: pobudzają monocyty spoczynkowe i ograniczają nadmierne generowanie rodników szeregu tlenowego w komórkach stymulowanych. Zwraca uwagę znaczny efekt modulujący funkcje wolnorodnikowe monocytów w przypadku oleju Linola (olej z lnu niemodyfikowanego), a spośród olejów z roślin lnu transgenicznego szczególnie duży efekt oleju z nasion GT.

Zarówno stwierdzony wpływ stymulujący proliferację fibroblastów jak i wpływ modulujący funkcje monocytów mogą pomóc w wyjaśnieniu mechanizmów korzystnego działania materiałów z lnu modyfikowanego genetycznie (opatrunki lniane, oleje, emulsje) na gojenie przewlekłych ran i odleżyn. Działanie poprawiające gojenie ran przewlekłych i owrzodzeń skóry zostało wykazane u ludzi we wstępnych badaniach klinicznych (9, 10).

WNIOSKI

1. Badane oleje z nasion lnu roślin transgenicznych znacząco nasilały proliferację *in vitro* fibroblastów linii V79 i hamowały (w wyższych stężeniach) proliferację komórek monocytoidalnych THP1.
2. Oleje z nasion lnu wywierały działanie modulujące funkcje komórek monocytoidalnych THP1: nasilały generowanie rodników szeregu tlenowego w komórkach spoczynkowych i obniżały w monocytach aktywowanych przez PMA.
3. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na działanie nasilające regenerację/reparację tkanek oraz modulujące funkcje monocytów w odczynie zapalnym badanych olejów z nasion lnu.

K. Szopa-Skórkowska, K. Hasiewicz-Derkacz, T. Gębarowski,
H. Moreira, K. Gębczak, A. Kulma, K. Gąsiorowski

HEALTH PROMOTING EFFECTS OF FLAX SEEDS OILS. INDICATIONS FROM CELL CULTURE TESTS.

Summary

Flax seeds oils obtained from transgenic plants were tested in the aspect of their potentially health promoting effects. We showed that *in vitro* incubation with the tested oils caused enhanced proliferation of Chinese hamster pulmonary fibroblasts, whereas it decreased proliferation and modulated the oxygen free radical level of human monocyteoid cells. The results indicate that the tested oils could enhance regeneration/repairation of tissue damage (proliferation of fibroblasts) and could modulate the activity of monocytes during inflammatory reactions in the course of wound healing.

PIŚMIENNICTWO

1. *Goyal A., Sharma V., Upadhyay N., Gill S., Sihag M.*: Flax and flaxseed oil: an ancient medicine and modern functional food. *J. Food Sci. Technol.*, 2014; 51 (9): 1633-1653. – 2. *Richard D., Kefi K., Barbe U., Visioli F.*: Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009; 66 (20): 3277-3288. – 3. *Zendedel A., Habib P., Dang J., Lammerding L., Hoffmann S., Beyer C., Slowik A.*: Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate neuroinflammation and mitigate ischemic stroke damage through interactions with astrocytes and microglia. *J. Neuroimmunol.*, 2015; 278 (1): 200-211. – 4. *Im D.-S.*: Omega -3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs. *Prog. Lipid Res.*, 2012; 51 (3): 232-237. - 5. *Czemplik M., Szopa J.*: Optimizing biomedical and industrial products development based on flax. *CAB Rev., Persp. Agricult., Vet. Sci., Nutr., Nat. Resour.*, 2009; 4 (062):1-10. – 6. *Żuk M., Kulma A., Dymińska L., Szoltysek K., Prescha A., Hanuza J., Szopa J.*: Flavonoid engineering of flax potentiate its biotechnological application. *BMC Biotechnol.*, 2011; 11:10, doi: 10.1186/1472-6750-11-10. – 7. *Zuk M., Prescha A., Stryczewska M., Szopa J.*: Engineering flax plants to increase their antioxidant capacity and improve oil composition and stability. *J. Agricult. Food Chem.*, 2012; 60 (19): 5003-5012. – 8. *Eruslanov E., Kusmartsev S.*: Identification of ROS using oxidized DCF-DA and flow-cytometry. *Methods Mol. Biol.*, 2010; 594: 57-72. – 9. *Skórkowska-Telichowska K., Kulma A., Żuk M., Czuj T., Szopa J.*: The effects of newly developed linen dressings on decubitus ulcers. *J. Palliative Med.*, 2012; 15 (2):146-148. – 10. *Skórkowska-Telichowska K., Żuk M., Kulma A., Bugajska-Prusak A., Ratajczak K., Gąsiorowski K., Kostyn K., Szopa J.*: New dressing materials derived from transgenic flax products to treat long-standing venous ulcers. A pilot study. *Wound Repair Reg.*, 2010; 18 (2): 168-179.

Adres: ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław