

Agnieszka Stawarska, Agnieszka Bialek, Marcin Łukasik¹, Andrzej Tokarz

WPŁYW SUPLEMENTACJI DIETY SPRZĘŻONYMI DIENAMI KWASU LINOLOWEGO NA AKTYWNOŚĆ DESATURAZ (Δ^6 , Δ^5) W MIKROSOMACH WĄTROBOWYCH SZCZURÓW Z INDUKOWANYM PROCESEM NOWOTWOROWYM

Zakład Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. *A. Tokarz*

¹ Zakład Toksykologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. *M. Szutowski*

Zbadano wpływ suplementacji diety sprzężonymi dienami kwasu linolowego (CLA) na aktywność enzymów uczestniczących w powstawaniu kwasu arachidonowego, a także określono zależności pomiędzy aktywnością tych enzymów w warunkach procesu nowotworowego. Aktywność enzymów wyznaczano w sposób pośredni, gdyż ich miarą była ilość powstającego in vitro kwasu arachidonowego, tworzącego się z kwasu linolowego, określana w mikrosomach wątrobowych szczurów szczepu Sprague-Dawley. Wyznaczono ponadto indeksy aktywności: Δ^6 -desaturazy (D6D) oraz Δ^5 -desaturazy (D5D), przy zastosowaniu metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV/VIS.

Hasła kluczowe: kwas arachidonowy, Δ^6 -desaturaza, Δ^5 -desaturaza, sprzężone dieny kwasu linolowego, nowotwory

Key words: arachidonic acid, Δ^6 -desaturase, Δ^5 -desaturase, conjugated linoleic acids, tumors

Sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) stanowią grupę izomerów pozycyjnych i stereozomerów kwasu oktadekadienowego, o sugerowanym wielokierunkowym korzystnym działaniu prozdrowotnym. Aktywność biologiczną wykazano dotychczas dla dwóch izomerów kwasu oktadekadienowego: *cis*-9, *trans*-11 (kwas żwaczowy) i *trans*-10, *cis*-12. Głównym naturalnym źródłem CLA jest mleko i produkty mleczarskie oraz mięso różnych gatunków zwierząt przeżuwających (1). W organizmach ludzkich około 90% całkowitej puli CLA jest pochodzenia egzogenne, tak więc odpowiednio komponując posiłki lub suplementując dietę, można wpływać na zawartość CLA w tkankach.

Spośród wielu właściwości biologicznych CLA, na szczególną uwagę zasługują właściwości przeciwnowotworowe (2-5). Sugerowane są liczne potencjalne mechanizmy działania przeciwnowotworowego CLA, spośród których niezwykle interesującym wydaje się być zdolność konkurowania z innymi kwasami tłuszczowymi w szlakach metabolicznych, ze względu na podobieństwo w budowie (6). Nieliczne opublikowane badania wskazują na CLA, jako na jeden z potencjalnych czynników wpływających na aktywność desaturacji kwasów tłuszczowych (7,8).

Celem pracy było zbadanie wpływu suplementacji diety kwasem linolowym w postaci sprzężonej (CLA) na aktywność enzymów biorących udział w syntezie kwasu arachidonowego (AA), jak również zbadanie zależności między ich aktywnością a procesem nowotworowym. Oznaczano zarówno ilość tworzącego się w czasie inkubacji AA, jak również wyznaczano indeksy aktywności Δ^6 -desaturazy (D6D) oraz Δ^5 -desaturazy (D5D).

MATERIAŁ I METODY

Badania uzyskały akceptację Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (34/2008).

W trakcie trwania eksperymentu wszystkie zwierzęta (samice szczurów *Sprague-Dawley*) miały zapewniony ciągły dostęp do wody i paszy (pasza hodowlana Labofeed H) oraz przebywały w pomieszczeniu o stałej wilgotności i temperaturze (23°C), w którym zachowano 12-godzinny cykl światła i ciemności.

W 37. dniu życia zwierzęta zostały losowo przyporządkowane do jednej z sześciu grup eksperymentalnych. Podawano im sondą dożołądkową preparat Bio-C.L.A. (Pharma Nord Denmark) w ilości 0,3 cm³/dzień (2% udział CLA w diecie), w następującej sekwencji – od 37. do 50. dnia życia [C2, E2], od 50. dnia życia do momentu dekapitacji [C1, E1] lub przez cały okres życia [C3, E3]. Grupom C1, C2 i C3 podano dodatkowo w 50. dniu życia czynnik kancerogeny: 7, 12-dimetylobenz[a] antracen (DMBA), w ilości 80 mg/kg m.c. Ponadto, co tydzień, badano zwierzęta palpacyjnie, w celu stwierdzenia obecności guzów. Dekapitowano je w 21. tygodniu eksperymentu, a do badań pobierano wątrobę, z której izolowane mikrosomy (9), do czasu analizy przechowywano w temp. -70°C.

Preparat Bio-C.L.A (firmy Pharma Nord Denmark) zawierał w swoim składzie mieszaninę izomerów: *cis*-9, *trans*-11 CLA i *trans*-10, *cis*-12 CLA w stosunku 1:1 (10).

Aktywność enzymów wyznaczano w sposób pośredni, gdyż ich miarą była ilość powstającego *in vitro* AA, tworzącego się z kwasu linolowego (LA), określana w mikrosomach wątrobowych szczurów (11).

Do badań pobierano po 0,2 cm³ zawiesiny mikrosomów i poddawano je inkubacji w mieszaninie reakcyjnej (12). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły następujące składniki, których końcowe stężenie w 1 cm³ wynosiło: 5 μM ATP; 0,1 μM CoA; 1,25 μM NADH; 0,5 μM nikotynamidu; 2,25 μM glutationu; 5 μM MgCl₂; 62,5 μM NaF; 200 nM kwasu linolowego.

Z mikrosomów wątrobowych wyekstrahowano lipidy metodą *Folcha* (13). Określano różnicę stężeń AA w próbkach poddanych inkubacji (1,5 h, w temp. 37°C) i nieinkubowanych. Zawartość kwasów tłuszczowych oznaczano metodą HPLC z detekcją UV/VIS, po uprzedniej ich estryfikacji (12) (aparatury Merck Hitachi, pompa L-7100, detektor UV/VIS L-74200, kolumna YMC-Pack ODS-AM S-5 μm, temp. kolumny 30°C, długość fali λ=198 nm). Każdorazowo określano w mikrosomach wątrobowych zawartość białka metodą *Lowriego* (14), a stężenie AA wyrażano w przeliczeniu na 100 mg białka. Wyznaczono ponadto indeks aktywności Δ^6 -desaturazy (D6D), jako stosunek stężenia kwasu

γ -linolenowego (GLA, C18:3, n-6) do stężenia kwasu linolowego (LA, C18:2, n-6) w mikrosomach wątrobowych i indeks Δ^5 -desaturazy (D5D), wyrażony stosunkiem stężenia kwasu arachidonowego (AA, C20:4, n-6) do stężenia kwasu dihomo- γ -linolenowego (DGLA, C20:3, n-6).

Otrzymane wyniki poddano ocenie statystycznej przy zastosowaniu programu Statistica 10.0 (analiza wariancji – ANOVA, test *Tukey'a*).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

U zwierząt z grupy nie poddanych działaniu 7,12-dimetylobenz[*a*]antracenu nie stwierdzono w czasie trwania eksperymentu spontanicznych nowotworów, niezależnie od zastosowanej modyfikacji diety. Podanie czynnika nowotworowego skutkowało występowaniem guzów nowotworowych gruczołów sutkowych, które zostały zidentyfikowane w badaniu histopatologicznym jako gruczolakoraki sutka. Jednocześnie zaobserwowano hamowanie indukcji procesu nowotworowego w dwóch grupach, w których dieta była wzbogacana w CLA. Najsilniejszy efekt ochronny stwierdzono w grupie C3, w której suplementacja sprzężonymi dienami kwasu linolowego trwała najdłużej. W grupie tej, jedynie u jednego z dziewięciu zwierząt pojawiły się gruczolakoraki sutka. Nie stwierdzono powyższej zależności w przypadku krótkotrwałego wzbogacania diety w CLA (C2 – od 37. do 50. dnia życia), kiedy nastąpiła najwyższa zapadalność na nowotwory, bo aż 100% (tab. I).

W przeprowadzonym doświadczeniu zaznacza się wyraźny przyrost zawartości AA w grupach z chemicznie indukowanym nowotworem (najwyższy w C1 – $0,82 \pm 0,15$ mg/100 mg białka), w porównaniu do analogicznych grup bez dodatku DMBA. Podobna tendencja zarysowała się w przypadku aktywności D6D, która w grupie C1 wyniosła $(3,81 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$, a najniższa była w grupie E3 – $(2,29 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$. Aktywność D5D była natomiast nieco niższa w grupach, którym podano czynnik nowotworowy. Nasiloną konwersją do AA, katalizowaną przez badane desaturazy, uznawana jest za niekorzystną dla organizmu, ponieważ może prowadzić do zwiększonej produkcji eikozanoidów, których prekursorem jest AA. Do związków tych zaliczana jest m.in. prostaglandyna E₂ (PGE₂), której przypisywane jest działanie prozapalne i pronowotworowe (4,15). Zwiększoną aktywność tych enzymów w procesie nowotworzenia wykazano między innymi w badaniu przeprowadzonym przez *He* i wsp. (16).

Oceniając wpływ czasu podawania CLA na poziom AA, stwierdzono, że w grupie suplementowanej najdłużej (E3), bo od 37. dnia życia do momentu dekapitacji, następowało znaczne obniżenie stężenia AA, w odniesieniu do zwierząt krócej suplementowanych. W tej grupie również aktywności D6D i D5D były najniższe. Wskazuje to na hamujący wpływ sprzężonych dienów kwasu linolowego na aktywność badanych desaturaz. Podobne wyniki uzyskali *Bretillon* i wsp. (8) oraz *Thijssen* i wsp. (7).

W procesie metabolicznym, CLA konkuruje z LA o aktywność kluczowych enzymów sterujących jednocześnie przemianami obydwu związków. Konsekwencją powyższego działania CLA jest zmniejszenie poziomu metabolitów LA, w tym AA i powstających z niego prostaglandyn serii 2 (4,15).

Table 1. Charakterystyka badanych grup i wpływ diety na aktywność desaturaz

Table 1. Characteristic of experimental groups and influence of the applied diet on the desaturases activity

Grupa	Liczebność	Dieta 37-50 dzień życia	DMBA	Dieta od 50. dnia życia + 2% CLA	Zapadalność [%]	Przyrost AA $\bar{x} \pm SD$ (mg/100 mg białka)	D6D $\bar{x} \pm SD$	D5D $\bar{x} \pm SD$
E1	5	Labofeed H	-	Labofeed H + 2% CLA	0	0,70 ± 0,09 ^g	(3,32 ± 0,04)*10 ^{-3a,h}	1,95 ± 0,01 ^{a,d,g}
E2	8	Labofeed H + 2% CLA	-	Labofeed H	0	0,65 ± 0,06 ^{a,c,e,h}	(3,01 ± 0,06)*10 ^{-3b,d,f,i}	1,94 ± 0,00 ^{b,e,h}
E3	8	Labofeed H + 2% CLA	-	Labofeed H + 2% CLA	0	0,51 ± 0,13 ^{b,d,f,g,h}	(2,29 ± 0,02)*10 ^{-3c,e,g,h,i}	1,92 ± 0,00 ^{c,f,i}
C1	9	Labofeed H	+	Labofeed H + 2% CLA	33%	0,82 ± 0,15 ^{a,b}	(3,81 ± 0,12)*10 ^{-3a,b,c}	1,74 ± 0,04 ^{a,b,c}
C2	10	Labofeed H + 2% CLA	+	Labofeed H	100%	0,79 ± 0,09 ^{c,d}	(3,58 ± 0,17)*10 ^{-3d,e}	1,74 ± 0,04 ^{d,e,f}
C3	9	Labofeed H + 2% CLA	+	Labofeed H + 2% CLA	11%	0,78 ± 0,13 ^{e,f}	(3,69 ± 0,21)*10 ^{-3f,g}	1,75 ± 0,07 ^{g,h,i}

* Grupy z tym samym indeksem – różnice istotne statystycznie przy p<0,05

WNIOSKI

1. Zastosowane w doświadczeniu warunki eksperymentalne z wykorzystaniem mikrosomów wątrobowych szczurów i HPLC umożliwiają pośrednie oznaczenie aktywności Δ^5 - i Δ^6 -desaturazy.
2. Długotrwałe podawanie w diecie sprzężonych dienów kwasu linolowego obniżało aktywność enzymów wątrobowych – szczególnie Δ^6 -desaturazy i ilość powstającego AA u szczurów w stanie fizjologicznym.
3. Obecność nowotworu indukowała aktywność D6D, co wpływało stymulująco na przyrost AA w strukturach komórkowych.

A. Stawarska, A. Białek, M. Łukasik, A. Tokarz

THE INFLUENCE OF DIET SUPPLEMENTATION WITH CONJUGATED
LINOLEIC ACIDS ON DESATURASES (Δ^6 , Δ^5) ACTIVITY IN RAT HEPATIC
MICROSOMES IN CANCEROUS STATE

Summary

The aim of this study was to determine the effect of dietary CLA supplementation on the activity of enzymes involved in the synthesis of arachidonic acid (AA) and to determine the relationship between the activity of the enzymes and tumors. We used HPLC with UV/VIS detection to determine desaturases activity in rat hepatic microsomes. The desaturases activity was determined indirectly by measuring the amount of AA formed from linoleic acid *in vitro* by the action of the enzymes. In addition, the indices of Δ^6 -desaturase (D6D) and Δ^5 -desaturase (D5D) were determined. Statistically significant differences in the desaturases activity were found among the experimental groups. DMBA significantly increased the activity of the enzymes. A negative correlation was observed between the supplementation of CLA, and the enzymes' activity.

PIŚMIENNICTWO

1. Bast A., Haenen G.R.M.: Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 963(3): 558-561. -2. Bhattacharya A., Banu J., Rahman M., Causey J., Fernandes G.: Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr. Biochem.*, 2006; 17: 789-810. -3. 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; 43(3): 314-322. -4. Park H.S., Ryu J.H., Ha Y.L., Park J.H.: Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine – treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br. J. Nutr.*, 2001; 86: 549-555. -5. Huang G., Zhong X., Cao Y., Chen Y.: Antiproliferative effects of conjugated linoleic acid on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2007; 16(Suppl. 1): 432-436. -6. Pariza M.W., Park Y., Cook M.E.: Conjugated linoleic acid and the control of cancer and obesity. *Toxicol. Sci.*, 1999; 52(Suppl. 1): 107-110 (doi: 10.1093/toxsci/52suppl_1.107). -7. Thijssen M.A., Malpuech-Brugere C., Gregoire S., Chardigny J.M., Sebedio J.L., Mensink R.P.: Effect of specific CLA isomers on plasma fatty acid profile and expression of desaturases in humans. *Lipids*, 2005; 40(2): 137-145. -8. Bretillon L., Chardigny J.M., Gregoire S., Berdeaux O., Sebedio J.L.: Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities *in vitro*. *Lipids*, 1999; 34 (9): 965-969. -9. Stawarska A, Białek A, Stanimirova I, Stawarski T, Tokarz A.: The effect of conjugated linoleic acids (CLA) supplementation on the activity of enzymes participating in the formation of arachidonic acid in liver microsomes of rats – probable mechanism of CLA anticancer activity. *Nutr. Cancer*, 2015; 67(1): 145-155 (doi: 10.1080/01635581.2015.967875). -10. 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 Health Dis.*, 2010; 9: 126 (doi:10.1186/1476-511X-9-126).

11. *Warensjö E., Riserus U., Gustafsson I.-B., Mohsen R., Cederholm T., Vessby B.*: Effects of saturated and unsaturated fatty acids on estimated desaturase activities during a controlled dietary intervention. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* (doi:10.1016/j.numecd.2007.11.002). -12. *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. -13. *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. -14. *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. -15. *Lee W.K., Lee H.J., Cho H.Y., Kim Y.J.*: Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2005; 45(2): 135–144. -16. *He C., Qu X., Wan J., Rong R., Huang L., Cai C., Zhou K., Gu Y., Qian S.Y., Kang J.X.*: Inhibiting delta-6 desaturase activity suppresses tumor growth in mice. *PLoS One*, 2012; 7(10): e 47567 (doi: 10.1371/journal.pone. 0047567)

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