

Małgorzata Jelińska, Andrzej Tokarz, Katarzyna Prusakowska

WPLYW TŁUSZCZÓW DIETY NA ZAWARTOŚĆ KWASÓW HYDROKSYEIKOZATETRAENOWYCH W SUROWICY KRWI SZCZURÓW

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

Celem badań było oszacowanie wpływu tłuszczów diety na zawartość kwasów 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowych (12 i 15-HETE) w surowicy krwi szczurów. Zaobserwowano, że stężenie HETE podlega działaniu oleju, choć nie zawsze koreluje z zawartością obecnych w nim prekursorów eikozanoidów.

Hasła kluczowe: kwasy hydroksyeikozatetraenowe, kwas arachidonowy, tłuszcze, karcinogeneza.

Key words: hydroksyeicosatetraenoic acids, arachidonic acid, fat, carcinogenesis.

Badania epidemiologiczne i eksperymentalne wykazały zależność między dietą a schorzeniami, w patologii których uczestniczą eikozanoidy, pochodne 20-węglowych kwasów tłuszczowych (1). Do najlepiej przebadanych eikozanoidów należą związki powstające na szlaku cyklooksygenazy, zwłaszcza metabolity kwasu arachidonowego, takie jak prostaglandyna E₂ (PGE₂), czy tromboksan A₂ (TXA₂). Zaobserwowano pozytywną korelację między zawartością w diecie kwasu linolowego a stężeniem PGE₂ w tkankach. Znacznie mniej danych dotyczy relacji między składem kwasów tłuszczowych diety a obecnością lipoksygenazowych (LOX) metabolitów kwasu arachidonowego, przy czym dostępne informacje odnoszą się głównie do leukotrienów. Brak jest natomiast wiedzy, na temat wpływu obecnych w diecie kwasów tłuszczowych na zawartość innych metabolitów kwasu arachidonowego powstających na szlaku LOX – kwasów hydroksyeikozatetraenowych (HETE). Kwasy te uczestniczą w licznych procesach patologicznych, takich jak stany zapalne, miażdżyca, łuszczyca (2). Wysokie stężenia HETE wykryto w nowotworach, szczególnie w odznaczających się zdolnościami do tworzenia przerzutów. HETE zwiększają ruchliwość i adhezję komórek nowotworowych hamując jednocześnie ich apoptozę, co sprzyja rozwojowi choroby (3, 4, 5).

HETE są grupą związków badanych pod kątem możliwości wykorzystania ich w charakterze biowskaźników stanów patologicznych. Celem badań było zwrócenie uwagi przede wszystkim na ewentualność oddziaływania czynników dietetycznych (tłuszcze ogrzewane i nieogrzewane), a także karcinogennych na proces powstawania kwasów 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowych (12- i 15-HETE) w surowicy krwi szczurów.

MATERIAŁY I METODY

Badania wykonano na samicach szczurów *Sprague-Dawley*. Zwierzętom podzielonym na 7 grup podawano od 40. dnia życia dożołądkowo olej (słonecznikowy, rzepakowy lub oliwę) w ilości 0,4 ml/dobę, nieogrzany lub ogrzewany 10 min w temp. 200°C. Jedna z grup żywiona była *ad libitum* wyłącznie paszą dla zwierząt Lab-H. W 50. i 80. dniu życia części zwierząt w każdej grupie wprowadzono 7,12-dimetylobenz(a)antracen (DMBA) (80 mg/kg m.c.) w celu wywołania nowotworów sutka. Po 20 tyg. zwierzęta dekapitowano i pobierano krew. Surowicę przygotowano przez wirowanie krwi 10 min przy 3000 obr./min.

Ekstrakcję HETE przeprowadzono na kolumnkach Bakerbond C18 500 mg/3 cm³ (SPE). Analizę ich zawartości w surowicy krwi metodą HPLC wykonano na aparaturze Shimadzu (pompa LC-10AS, detektor UV-VIS SPD-10AV), na kolumnie Nucleosil 100-5 C18, przy dł. fali 235 nm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu, wody i kwasu octowego (75:25:0,01) (6).

Stężenie 12- i 15-HETE w surowicy krwi odczytano z krzywych wzorcowych zależności pola powierzchni piku odpowiedniego kwasu od stężenia (ng/cm³ surowicy). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe.

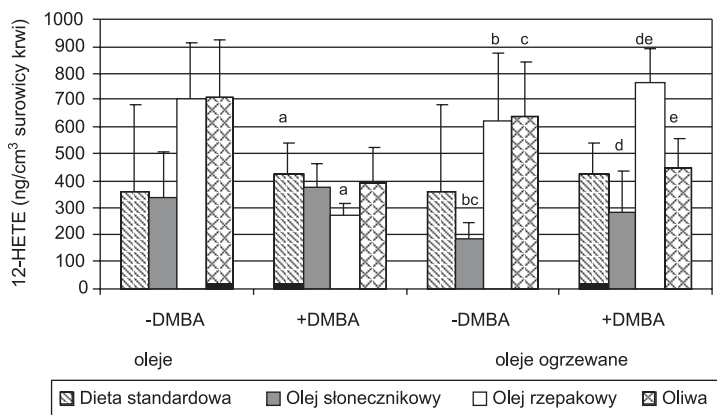
Do statystycznej analizy wyników wykorzystano program Statistica 8.0 PL, stosując testy nieparametryczne – jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) rang *Kruskala-Wallis*a lub test *U-Manna-Whitney*'a.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W surowicy krwi szczurów głównym izomerem spośród lipoksygenazowych metabolitów kwasu arachidonowego był kwas 12-HETE. Jego zawartość wahała się od ok. 185 ng/cm³ do ok. 700 ng/cm³ surowicy krwi (ryc. 1). Stężenie 15-HETE utrzymywało się na poziomie kilku nanogramów, natomiast trzeci metabolit – 5-HETE nie został w ogóle wykryty w większości prób.

U zwierząt, którym podawano oleje (zarówno nieogrzewane jak i ogrzewane) najniższą zawartość 12-HETE odnotowano w grupie otrzymującej olej słonecznikowy (ok. 300 ng/cm³ – olej nieogrzewany, ok. 200 ng/cm³ – olej ogrzewany) (ryc. 1). Olej ten jest bogatym źródłem kwasu linolowego (C 18:2 n-6, 63%), z którego pod wpływem desaturazy i elongazy syntetyzowany jest kwas arachidonowy. Statystycznie wyższe zawartości tego izomeru wykryto w surowicy krwi szczurów, których dietę suplementowano oliwą lub olejem rzepakowym – ok. 700 ng/cm³. Tłuszcze te są źródłem kwasu oleinowego (oliwa – ok. 68%, olej rzepakowy – 58%), natomiast zawartość kwasu linolowego jest w nich znacznie niższa niż w oleju słonecznikowym (odpowiednio 10% i 20%). Należałoby się zatem spodziewać, że w grupie suplementowanej olejem słonecznikowym zawartość 12-HETE będzie najwyższa. Podobne wyniki uzyskał też *Bell* i współpracownicy (7). Oznaczali oni zawartość 12-HETE, kwasu 12-hydroksyeikozapentaenowego (metabolit kwasu eikozapentaenowego) oraz leukotrienów B₄ i B₅ we krwi łososi, których dietę wzbogacono olejem rybnym lub słonecznikowym (7). Stężenia metabolitów kwasu arachidonowego – 12-HETE i LTB₄ były kilka razy niższe w przypadku podawania oleju słonecznikowego niż

rybnego, mimo wysokiej zawartości kwasu arachidonowego. Badacze tłumaczyli to znacznie wyższym stężeniem kwasu dihomog γ -linolenowego (DGLA, C 20:3, n-6), który również jest substratem dla lipoksygenaz. W innych badaniach DGLA hamował syntezę eikozanoidów pochodnych kwasu arachidonowego (8). 12-HETE może również reagować z 5-LOX, co prowadzi do powstawania kwasu 5,12-dihydroksyeikozatetraenowego (5,12-diHETE) (9).



Ryc. 1. Zawartość 12-HETE w surowicy krwi szczurów, którym podawano nieogrzewane i ogrzewane oleje oraz narażonych i nienarażonych na działanie DMBA (różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ oznaczono takim samym indeksem).

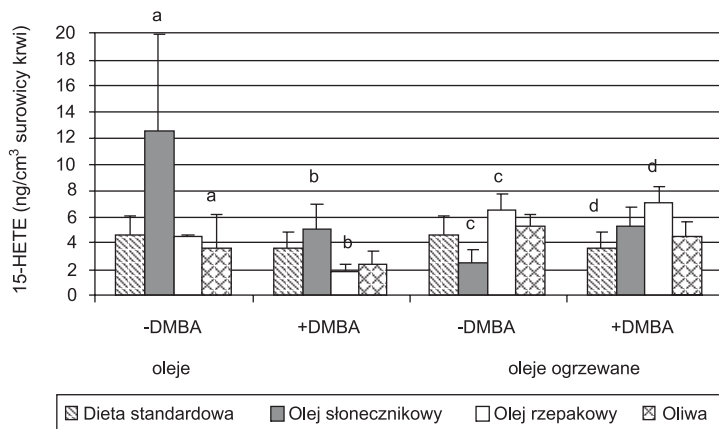
Fig. 1. 12-HETE concentration in serum of rats fed with various oils (cold and heated), treated and non-treated with DMBA (values sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$).

W grupach, w których wywoływano nowotwory, suplementowanych nieogrzewaną oliwą lub olejem rzepakowym zawartości 12-HETE były niższe w porównaniu do szczurów nienarażonych na działanie DMBA, co można tłumaczyć nasileniem metabolizmu hydroksykwasu lub syntezą PGE₂, której zawartość jest podwyższona w nowotworach.

W przypadku podawania tłuszczów ogrzewanych zawartość 12-HETE w surowicy krwi była nieco niższa w porównaniu z grupami suplementowanymi olejami nieogrzewanymi, choć nie były to różnice istotne statystycznie. W czasie ogrzewania oleju powstają izomery geometryczne wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, m.in. izomer kwasu linolowego – kwas Δ^9 cis,12trans-oktadecadienowy (10). Jest on przekształcany w organizmach szczurów do izomeru kwasu arachidonowego – kwasu Δ^5 cis,8cis,11cis,17trans-eikozatetraenowego (20:4, Δ^14 trans), co może ograniczać ilość substratu dla LOX (10).

Najwyższe stężenie 15-HETE odnotowano w grupach, których dietę suplementowano olejem słonecznikowym, zarówno w grupach narażonych jak i nienarażonych na działanie karcinogenu (ryc. 2).

Prowadzone badania wykazały, że podawane w diecie tłuszcze wpływają na stężenie HETE w surowicy krwi, choć nie zawsze koreluje ono z zawartością prekursorów tych kwasów w oleju.



Ryc. 2. Zawartość 15-HETE w surowicy krwi szczurów, którym podawano nieogrzewane i ogrzewane oleje oraz narażonych i nienarażonych na działanie DMBA (różnice istotne statystycznie przy $p < 0,05$ oznaczono takim samym indeksem).

Fig. 2. 15-HETE concentration in serum of rats fed with various oils (cold and heated), treated and non-treated with DMBA (values sharing a letter are statistically different, $p < 0.05$).

M. Jelińska, A. Tokarz, K. Prusakowska

EFFECT OF DIETARY FAT ON HYDROXYEICOSATETRAENOIC ACID CONCENTRATION IN RAT SERUM

Summary

The study was a trial of evaluation the influence of various dietary oils, cold or heated, on the concentration of 12- and 15-hydroxyeicosatetraenoic acids (arachidonic acid lipoxygenase metabolites) in serum of rats, a part of which was carcinogen-infected. HETEs were discovered to play a role in some pathological processes, such as atherosclerosis, psoriasis as well as cancers of lung, breast or prostate.

Serum of female Sprague-Dawley rats was used in the study. The animals divided into 7 groups were fed intragastrically sunflower, rapeseed or olive oil (0,4ml/24h). When 50 and then 80 days old, some rats from each dietary group were administered 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) to induce tumours. HETEs were isolated with the SPE method and determined using HPLC.

12-HETE was a major isomer in rat serum. It was observed that HETE concentration in rat serum changes depending on oil used, although often there is no correlation between HETEs and their precursors present in oils.

PIŚMIENICTWO

1. Kobayashi N., Barnard R.J., Henning S.M., Elashoff D., Reddy S.T., Cohen P., Leung P., Hong-Gonzalez J., Freedland S.J., Said J. i współpr.: Effect of altering dietary omega-6/omega-3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 4662-4670.
2. Reilly K.B., Srinivasan S., Hatley M.E., Patricia M.K., Lannigan J., Bolick D.T., Vandenhoff G., Pei H., Natarajan R., Nadler J.L., Hedrick C.C.: 12/15 lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 9440-9450.
3. Avis I., Hong S.H., Martínez A., Moody T., Choi Y.H., Trepel J., Das R., Jett M., Mulshine J.L.: Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J.*, 2001; 15: 2007-2009.
4. Ding X.Z., Tong W.G., Adrian T.E.:

12-lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE stimulates human pancreatic cancer cell proliferation via protein tyrosine phosphorylation and ERK activation. *Int. J. Cancer*, 2001; 94: 630-636. – 5. *Kandouz M., Nie D., Pidgeon G.P., Krishnamoorthy S., Maddipati K.R., Honn K.V.*: Platelet-type 12-lipoxygenase activates NF- κ B in prostate cancer cells. *Prostaglandins and other Lipid Mediators*, 2003; 71: 189-204. – 6. *Frohberg P., Drutkowski G., Wobst J.*: Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006; 41: 1317-1324. – 7. *Bell J.G., Raynard R.S., Sargent J.R.*: The effect of dietary linoleic acid on the fatty acid composition of individual phospholipids and lipoxygenase products from gills and leucocytes of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Lipids*, 1991; 261: 445-450. – 8. *Miller C.C., Ziboh V.A., Wong T., Fletcher M.P.*: Dietary supplementation with oils rich in (n-3) and (n-6) fatty acids influences in vivo levels of epidermal lipoxygenase products in guinea pigs. *J. Nutr.*, 1990; 120: 36-44. – 9. *Hwang D.W., Boudreau M., Chamugam P.*: Dietary linolenic acid and longer-chain n-3 fatty acids: comparison on effects on arachidonic acid metabolism in rats. *J. Nutr.*, 1988; 118: 427-437. – 10. *Berdeaux O., Chardigny J.M., S eb edio J.L., Mairot T., Poullain D., Vat ele J.M., No el J.P.*: Effects of a trans isomer of arachidonic acid on rat platelet aggregation and eicosanoid production. *J. Lipid Res.*, 1996; 37: 2244-2250.

Adres: 02-097 Warszawa, Banacha 1.