

Aneta Koronowicz, Karolina Żwawa¹⁾, Beata Szymczyk²⁾, Paweł Pisulewski,
Piotr Laidler¹⁾

WPŁYW LIPIDÓW ŻÓŁTKA JAJA KURZEGO NATURALNIE WZBOGAZONEGO W IZOMERY SPRZĘŻONEGO KWASU LINOŁOWEGO NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK CZERNIAKA LUDZKIEGO

Katedra Żywienia Człowieka Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. inż. P.M. Pisulewski

¹⁾ Katedra Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. P. Laidler

²⁾ Instytut Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie
Dyrektor: prof. dr hab. J. Krupiński

Celem przeprowadzonych badań była wstępna ocena wpływu lipidów żółtka jaja kurzego wzbogaconego w CLA na proliferację komórek czerniaka ludzkiego.

Żółtko jaja kurzego zostało wzbogacone w izomery CLA w sposób naturalny na drodze żywieniowej, poprzez modyfikację mieszanki paszowej dla niosek mieszaniną izomerów CLA: cis9,trans11 i trans10,cis12 (1). Komórki czerniaka ludzkiego (WM793 i WM3211) inkubowano z hydrolizatem lipidów żółtka, po czym mierzono ich proliferację w zakresie stężeń nie wywierających nekrotycznego wpływu na komórki.

Na podstawie uzyskanych wyników, można wnioskować, że lipidy żółtka jaja kurzego z wbudowanymi izomerami CLA są efektywne w hamowaniu proliferacji komórek czerniaka ludzkiego. Przedstawione wyniki potwierdzają korzystny wpływ funkcjonalnej żywności, jako potencjalnego źródła do walki z nowotworami.

Hasła kluczowe: sprzężony kwas linolowy (CLA), cis9,trans11-CLA, trans10,cis12-CLA, żywność funkcjonalna, czerniak, proliferacja.

Key words: Conjugated linoleic acid (CLA), cis9,trans11-CLA, trans10,cis12-CLA, functional food, melanoma, cell proliferation.

Korzystne, prozdrowotne oddziaływanie sprzężonych dienów kwasu linolowego od dawna jest przedmiotem badań wielu ośrodków naukowych w Polsce i na świecie. Wraz z odkryciem przesłanek antynowotworowego działania CLA (2) rozpoczęto badania nad wpływem CLA na komórki nowotworowe, głównie piersi (3), prostaty (4) oraz okrężnicy (5). Badania na liniach czerniaka ludzkiego do tej pory są nieliczne (6, 7). Prowadzone obecnie prace badawcze kierują się raczej w stronę modyfikowania zawartości CLA w wielu produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego, takich jak: mięso, jaja, masło. Ma to duże znaczenie praktyczne, ponieważ żywność funkcjonalna może zapobiegać i wspomagać leczenie wielu przewlekłych chorób

niezakaźnych, w tym także chorób nowotworowych. W kontekście tych informacji celem przeprowadzonych badań, była wstępna ocena wpływu lipidów żółtka jaja kurzego, naturalnie wzbogaconego w izomery CLA: *cis9,trans11* i *trans10,cis12*, na proliferację komórek czerniaka ludzkiego: WM793 i WM3211.

MATERIAŁ I METODY

1. Hodowla komórek czerniaka ludzkiego

Komórki WM793 i WM3211 (Wistar Institute, USA) hodowano w medium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), w obecności 10% FBS (Gibco) i antybiotyku (Sigma-Aldrich). Komórki hodowano na szalkach 10 \bar{R} (BD Biosciences) w warunkach hodowli komórkowej (37°C, 5% CO₂). Do eksperymentu używano komórki maksymalnie po 6–7 pasażach.

2. Hydrolizat lipidów żółtka jaja kurzego

Tłuszcz otrzymano metodą ekstrakcji ciekłym CO₂ na analizatorze tłuszczu (LECO), a następnie zmydlnono KOH. Profil kwasów tłuszczowych ustalono przy pomocy GC-MS (Shimadzu QP 5050A) (tab. I). Wolne kwasy tłuszczowe rozpuszczono w etanolu i przechowywano w temperaturze –20°C.

Tab e l a I. Profil kwasów tłuszczowych oznaczony na GC-MS (SHIMADZU QP 5050A)

Tab l e I. Lipid acid profile determined by GC-MS (SHIMADZU QP 5050A)

Żółtko jaja kurzego wzbogacone w CLA		Żółtko jaja kurzego nie wzbogacone CLA	
Kwasy tłuszczowe	Udział %	Kwasy tłuszczowe	Udział %
Tetradekanowy	0,65	Tetradekanowy	0,42
Pentadekanowy	0,09	Pentadekanowy	0,06
Heksadekanowy	27,19	Heksadekanowy	22,88
(Z)-9-heksadecenowy	1,05	(Z)-9-heksadecenowy	2,24
heptadekanowy	0,37	heptadekanowy	0,26
oktadekanowy	21,35	oktadekanowy	10,71
(Z)-9-oktadekaenowy	26,0	(Z)-9-oktadekaenowy	41,65
(Z,Z)-9,12-oktadekadienowy	18,38	(Z,Z)-9,12-oktadekadienowy	20,04
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienowy	1,13	(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienowy	0,8
<i>cis9,trans11</i> -CLA	2,3	<i>cis9,trans11</i> -CLA	0
<i>trans10,cis12</i> -CLA	0,9	<i>trans10,cis12</i> -CLA	0
eikozenowy	0,29	eikozenowy	0,39
eikozadienowy	0,17	eikozadienowy	0,25
arachidonowy	0,13	arachidonowy	0,30

3. Ocena cytotoksyczności hydrolizatu żółtka jaja kurzego

Wpływ hydrolizatu żółtka jaja kurzego na żywotność komórek oznaczano w zakresie badanych stężeń po 24, 48 i 72 godzinach, przy użyciu zestawu do badania cytotoksyczności (Cytotoxicity Detection Kit LDH – Roche) zgodnie z zaleceniami producenta.

4. Badanie proliferacji komórek

Proliferację komórek traktowanych hydrolizatem lipidów żółtka jaja kurzego wzbogaconego w izomery CLA (KT+CLA) i niewzbogaconego w izomery CLA (KT), oraz komórek kontrolnych ((kontrola), hodowanych w pożywce RPMI-1640 + 10 % FBS + 0,5% etanol) badano poprzez barwienie komórek fioletem krystalicznym.

Komórki hodowano w pożywce z hydrolizatem żółtka jaja kurzego o stężeniu 0,12 i 0,36 mg/ml przez 24–72 godzin. Po tym czasie komórki utrwalano alkoholem, barwiono 0,5 % roztworem fioletu krystalicznego, a następnie odbarwiano (0,069 M kwas octowy, 0,037M cytrynian sodu w H₂O/alkoholl) i mierzono absorbancję przy długości fali 540 nm.

5. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie oznaczenia były wykonane w trzech powtórzeniach, w trzech niezależnych doświadczeniach. Wartości na wykresach przedstawiono jako średnie ±SD. Istotność statystyczną sprawdzano testem U *Manna-Whitneya*. Różnice uznawano za znamienne statystycznie dla $P < 0,01$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

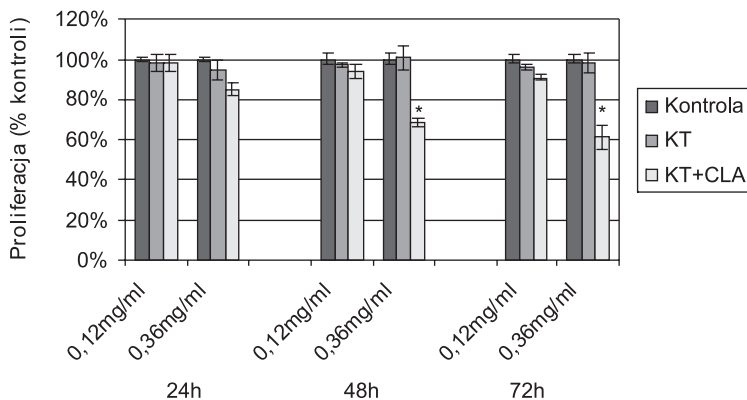
Ocena cytotoksyczności hydrolizatu lipidów żółtka jaja na komórki czerniaka ludzkiego

Badanie cytotoksyczności hydrolizatu lipidów żółtka jaja kurzego na komórki linii WM793 i WM3211, przeprowadzono przez oznaczenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w medium komórkowym. Dezintegracja błony komórkowej wywołana procesem nekrozy w odpowiedzi na czynnik toksyczny, powoduje uwalnianie tego enzymu do medium komórkowego. Hydrolizat KT + CLA o stężeniu 0,12 i 0,36 mg/ml nie wywoływał wzrostu aktywności LDH po 24-, 48- i 72-godzinnej inkubacji z komórkami, a obliczone wartości cytotoksyczności nie przekraczały 10% (dane nie przedstawione). Wartość poniżej 10% oznacza, iż działający czynnik nie wywiera cytotoksycznego efektu na badane komórki. Dla obydwu linii wyższe stężenie hydrolizatu (0,73 mg/ml) powodowało ponad 10% cytotoksyczność w każdym punkcie czasowym (dane nie przedstawione), co jednoznacznie świadczy o nekrozie komórek.

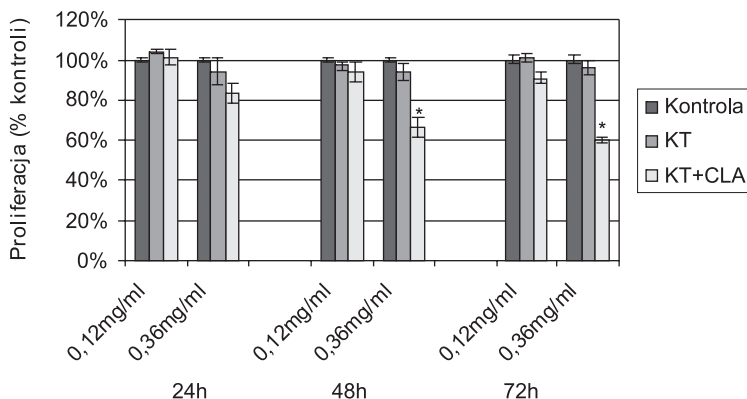
Wpływ hydrolizatu lipidów żółtka jaja kurzego na proliferację komórek czerniaka ludzkiego

Zdolność komórek linii WM793 i WM3211 do proliferacji pod wpływem hydrolizatu lipidów żółtka jaja kurzego o stężeniu 0,12 i 0,36 mg/ml, sprawdzano poprzez barwienie komórek fioletem krystalicznym. Jak przedstawiono na rycinie 1 wzrost komórek obydwu linii spadał pod wpływem KT+CLA, dając maksymalne ok. 40% zahamowanie proliferacji w przypadku najwyższego stężenia (0,36 mg/ml) i najdłuższego punktu czasowego (72 godz.). Różnice w spadku proliferacji były istotne sta-

A. WM793



B. WM3211



Ryc. 1. Wpływ hydrolizatu lipidów żółtka jaja kurczego na proliferację komórek: A. WM793 i B. WM3211. Słupki przedstawiają średnie \pm SD z trzech niezależnych doświadczeń (n=9). * $p < 0,01$ vs KT w teście U *Manna-Whitneya*.

Fig. 1. Effect of lipids hydrolysate of egg yolk on proliferation of cells: A. WM793 and B. WM3211. Bars represent means \pm SD from three separate experiments (n=9). * $p < 0,01$ vs KT in the U *Manna-Whitneya* test.

tystycznie nie tylko w stosunku do komórek nietraktowanych (kontrola), ale również w stosunku do hydrolizatu żółtka jaja nie wzbogaconego w izomery CLA.

Przedstawione wyniki potwierdzają korzystny wpływ funkcjonalnej żywności, jako potencjalnego źródła do walki z nowotworami oraz wskazują na skuteczność działania lipidów żółtka jaja kurczego z wbudowanymi izomerami CLA. Jajo kurcze cechuje się wysoką podatnością na modyfikację żywieniową, powszechną dostępnością na rynku, a przede wszystkim wysoką wartością żywieniową, co czyni je atrakcyjnym surowcem do zastosowań biomedycznych (8) i przemawia za dalszymi badaniami nad możliwością stosowania jako nutraceutyku w profilaktyce chorób nowotworowych.

WNIOSKI

1. Hydrolizat w stężeniach 0,12 i 0,36 mg/ml KT+CLA nie powodował nekrozy badanych komórek, jednak wyższe stężenia mogą prowadzić do ich nekrozy,
2. Lipidy żółtka jaja kurzego wzbogaconego w izomery CLA-*cis*9,*trans*11 i *trans*10,*cis*12, hamują proliferację komórek czerniaka ludzkiego, a efekt ten jest zależny od stężenia i czasu działania lipidów.

A. Koronowicz, K. Żwawa, B. Szymczyk, P. Pisulewski, P. Laidler

EFFECT OF EGG YOLK LIPIDS NATURALLY ENRICHED WITH CONJUGATED LINOLEIC ACID ON PROLIFERATION OF HUMAN MELANOMA CELLS

Summary

Conjugated linoleic acid (CLA) has anticarcinogenic properties mainly due to its ability to suppress the growth of different cancer cell lines *in vitro*. The present research trends are focused on functional food, which besides the basic nutritional components contains also substances with health-related effects. This is of a considerable practical significance, since functional food may be a preventive factor and aid treatment of many civilization diseases, including malignancies.

The objective of the study was the investigation of the effect of CLA - enriched egg yolk lipids on proliferation of human melanoma cells.

Egg yolk was naturally enriched with CLA isomers through feeding laying hens with a mixture of CLA isomers: *cis*9,*trans*11 and *trans*10,*cis*12 (1). The cells (WM793 i WM3211) were incubated with hydrolysate of CLA - enriched egg yolk lipids. In the range of concentrations of hydrolysate that had not caused necrosis, proliferation was detected.

In both cell lines hydrolysate of CLA - enriched egg yolk lipids inhibited cells proliferation about 40% and the hydrolysate CLA - unenriched egg yolk lipids had no effect.

The results indicate that egg yolk lipids with incorporated CLA isomers are effective in inhibiting growth of human melanoma cells *in vitro*. Presented results confirm the positive influence and anticancer potential of functional food.

PIŚMIENNICTWO

1. Franczyk-Żarów M., Kostogryś R.B., Szymczyk B., Jawień J., Gajda M., Cichocki T., Wojnar L., Chłopicki S., Pisulewski P.M.: Functional effects of eggs, naturally enriched with conjugated linoleic acid, on the blood lipid profile, development of atherosclerosis and composition of atherosclerotic plaque in apo-lipoprotein E and low-density lipoprotein receptor double-knockout mice (apoE/LDLR *-/-*). *Brit J Nutr.* 2008; (1) 99: 49-58. – 2. Pariza M.W., Ashoor S.H., Chu F.S.: Effect of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Lett.* 1979; (2-3) 7: 63-69. – 3. Koronowicz A., Dulińska-Litewka J., Pisulewski P.M., Laidler P.: Wpływ izomerów sprzężonego kwasu linolowego na proliferację komórek nowotworowych piersi. *Roczniki PZH.* 2009; 3: przyjęta do druku. – 4. Ochoa J.J., Farquharson A.J., Grant I., Moffat L.E., Heys S.D., Wahle K.W.: Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers. *Carcinogenesis.* 2004; (7) 25: 1185-1191. – 5. Huang G., Zhong X., Cao Y., Chen Y.: Antiproliferative effects of CLA on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007; (Suppl 1) 16: 432-436. – 6. Shultz T.D., Lueddecke L.O., Chew B.P., Seaman W.R.: Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene on the *in vitro* growth of human cancer cells. *Cancer Lett.* 1992; (2) 63: 125-133. – 7. De La Torre A., Debiton E., Juaneda P., Durand D., Chardigny J.M., Barthomeuf C., Bauchart D., Gruffat D.: Beef conjugated linoleic acid isomers reduce human cancer cell growth even when associated with other beef fatty acids. *Br J Nutr.* 2006; (2) 95: 346-352. – 8. Gebczyński P., Jaworska G.: Żywność wzbogacona i nutraceutyki. *Polskie Towarzystwo Technologów Żywności.* Kraków 2009; 76-89.